



HAL
open science

Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon

Cynthia Cellier

► **To cite this version:**

Cynthia Cellier. Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon. [Stage] Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV), Avignon, FRA. 2011, 48 p. hal-02810564

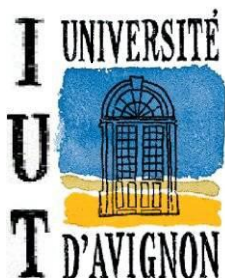
HAL Id: hal-02810564

<https://hal.inrae.fr/hal-02810564>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



IUT d'Avignon
Université d'Avignon
et des Pays du Vaucluse
337, Chemin des Meinajaries,
BP 1207, 84911 Avignon
Cedex 9
+33(0)4 90 84 14 00

Institut National de la Recherche
Agronomique-Centre PACA UR-
407 Pathologie végétale Domaine
Saint Maurice
BP 94 84143 Montfavet Cedex
04 32072 2840



Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène *Vat* du melon

Présenté par Cynthia Cellier

18 Avril 2011 au 12 Août 2011



Tutrice à l'IUT : Magali Rault
Maître de stage : Alexandra Schoeny

Rapport de stage pour l'obtention du DUT génie Biologique option Agronomie



Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène *Vat* du melon de Cellier Cynthia est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/).

Remerciements :

Je remercie mon maître de stage Alexandra Schoeny pour le temps et l'aide qu'elle m'a accordée tout au long de mon stage notamment pendant la correction de mon rapport.

Je tiens également à remercier ma tutrice à l'IUT, Magali Rault.

Je remercie Patrick Gognalons pour son aide dans l'identification des pucerons et lors des tests.

Je remercie la directrice de l'unité, Cindy Morris de m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche en pathologie végétale.

Enfin je remercie toute l'équipe de virologie pour leur accueil et leur gentillesse ainsi que toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide durant ce stage.



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. Présentation générale de la structure d'accueil.....	1
2. Contexte de l'étude.....	2
MATERIELS ET METHODES	4
1. Dispositif expérimental.....	4
1.1. Localisation.....	4
1.2. Traitements expérimentaux.....	4
1.3. Matériel végétal	5
1.4. Mise en place de l'essai	7
2. Suivi du développement des bandes fleuries.....	9
3. Suivi des pucerons ailés visitant les parcelles de melon.....	10
3.1. Capture.....	10
3.2. Traitement des captures	10
4. Suivi des virus infestant les parcelles de melon	11
4.1. Echantillonnage.....	11
4.2. Tests sérologiques	11
RESULTATS	15
1. Développement des bandes fleuries	15
1.1. Couverture du sol et fréquences relatives des espèces.....	15
1.2. Stades de développement.....	16
2. Dynamiques des populations de pucerons ailés	17
2.1 Captures	17
2.2 Espèces de pucerons présentes.....	18
3. Epidémies virales	21



3.1. CABYV.....	22
3.2. CMV	22
3.3. WMV	22
3.4. ZYMV	22
DISCUSSION	23
1. Développement des bandes fleuries	23
2. Dynamiques des pucerons ailés	23
3. Epidémies virales	24
AUTRES MISSIONS	25
LISTE DES ABREVIATIONS	27
GLOSSAIRE.....	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
ANNEXES.....	31

Les mots suivis d'un astérisque (*) sont définis dans le glossaire.



INTRODUCTION

1. Présentation générale de la structure d'accueil

L'Inra (Institut National de la Recherche Agronomique) est un organisme public de recherche agronomique avec un budget annuel de 772 millions d'euros. Cet institut est placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire. L'Inra est créé en 1946. A la fin de la seconde guerre mondiale, la France se trouve en pénurie d'aliments en raison d'un important retard concernant les techniques agricoles, l'institut a pour but de combler ce retard. Ses objectifs étaient de mener des travaux de recherche concernant les techniques de production (animales et végétales) ainsi que leur amélioration dans le but de subvenir aux besoins alimentaires de la population. Aujourd'hui les recherches concernent l'agriculture durable, une alimentation de qualité et depuis les années 90, l'environnement. Soixante ans après sa création, l'Inra occupe la première place au niveau européen et la deuxième au niveau mondial pour les publications concernant les sciences agricoles, animales et végétales. L'institut compte 14 départements scientifiques et 19 centres où travaillent 1800 chercheurs, 2500 ingénieurs, 4500 techniciens et 2000 doctorants et stagiaires (www.inra.fr).

Le centre Inra PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) résulte de la fusion des centres d'Avignon et de Sophia-Antipolis en janvier 2010. Cette fusion place le centre au quatrième rang national. Le centre comprend deux sites principaux : Avignon et Sophia-Antipolis et sept autres sites : Aix-en-Provence, Gotheron, Grenoble, Le Cap d'Antibes, Les Vignères, Manduel et Marseille.

L'unité de recherche en pathologie végétale est implantée sur le domaine Saint Maurice à Montfavet (Annexe 1). Elle comprend 42 agents permanents ainsi que de jeunes scientifiques en formation. Les recherches se concentrent sur les maladies bactériennes, fongiques et virales des fruits et légumes du pourtour méditerranéen afin de mettre en place des méthodes de lutte alternatives et raisonnées.

L'équipe de virologie s'intéresse à l'étiologie* et l'épidémiologie des maladies virales et au développement de méthodes de lutte. Les recherches concernent notamment les principaux virus des Cucurbitacées (Annexe 2).



2. Contexte de l'étude

Les pucerons sont responsables de dégâts sérieux en agriculture de part leur mode d'alimentation (piqueur suceur) mais également par leur reproduction extrêmement rapide (Tomlinson 1987 ; Astier et al. 2001 ; Simon et al. 2002). Ces dégâts sont variés et peuvent être directs ou indirects. Les dommages directs sont liés à la prise de nourriture. En effet, lorsqu'une colonie s'est développée, elle va s'alimenter en prélevant d'importantes quantités de sève, ce qui entraîne un affaiblissement de la plante et va provoquer une diminution voire un arrêt de la croissance. En outre, les pucerons sont également responsables de dégâts indirects. Ils vont, par exemple, excréter un miellat dessicant brûlant le feuillage en cas de forte chaleur. De plus, par sa richesse en sucre ce miellat est favorable au développement de champignons saprophytes*, synthétisant de la fumagine. Ce composé noir, superficiel peut, lorsqu'il est produit en grande quantité, bloquer la respiration ou la photosynthèse. Enfin, les pucerons sont les principaux vecteurs de virus de part leur mode d'alimentation (Tomlinson 1987).

La lutte chimique est une des méthodes de lutte existant contre les pucerons. Bien qu'elle soit utilisée depuis de nombreuses années, elle présente certains inconvénients. Les traitements à répétition peuvent engendrer des pertes d'efficacité des insecticides par adaptation des pucerons (Hooks & Fereres 2006). Ils peuvent également entraîner une augmentation de l'activité et de la mobilité des pucerons favorisant la transmission des virus (Budnik et al. 1996, cités par Hooks & Fereres 2006). Lorsque des gènes de résistance aux pucerons sont disponibles chez l'espèce cultivée, la lutte génétique peut être une alternative à la lutte chimique plus respectueuse de l'environnement.

Le melon (*Cucumis melo* L.) est une culture majeure du Sud Est de la France avec 6000 hectares de production et 126000 tonnes produites en 2010 ce qui représente de 35 à 40% de la production française.

Le gène *Vat* (*Virus aphid transmission*) confère au melon une résistance à la colonisation par le puceron *Aphis gossypii* Glover par antixénose (fuite du puceron) et antibiose (diminution de la fécondité du puceron), mais également une résistance aux virus non persistants transmis par ce puceron tels que le CMV (*Cucumber mosaic virus*) ou le WMV (*Watermelon mosaic virus*) (Pitrat & Lecoq 1982). Cependant ce gène ne confère pas de résistance vis-à-vis des pucerons non colonisateurs (par exemple *Myzus persicae* Sulzer) c'est-à-dire les pucerons effectuant uniquement des piqûres d'essais sur les melons et transmettant ainsi des virus non persistants (Lecoq et al. 1980 ; Astier et al. 2001). L'utilisation du gène *Vat* est donc généralement couplée à l'utilisation d'insecticides contre les pucerons non colonisateurs. En outre la variabilité intra-spécifique d'*Aphis gossypii* lui confère une grande capacité d'adaptation, ce qui implique un contournement possible du gène *Vat*. La question de la durabilité du gène *Vat* est d'autant plus préoccupante que ce dernier est présent dans 80% des melons cultivés dans le Sud Est. Plus la taille de la



population d'*A. gossypii* est grande, plus le risque de contournement est important. On peut donc penser que toute technique diminuant la taille de la population pourrait limiter ce risque.

Les bandes enherbées et les bandes fleuries sont des techniques culturales possibles pour lutter contre la propagation des pucerons et la transmission des virus (Fernandez et al. 2007). Ces bandes sont généralement semées le long des cultures. Leur composition est très variée : il peut s'agir d'un mélange de fleurs de type messicole, d'un couvert unique de graminées, de plantes cultivées (sorgho) (Thomas et Marshall 1999 ; Damicone et al. 2007 ; Haaland et al, 2010). Différents modes d'action ont été signalés. Lorsque les plantes des bandes sont hautes, elles peuvent jouer un rôle de barrière physique et limiter le nombre de pucerons accédant à la parcelle (Simmons 1957). Lorsque les pucerons pratiquent leurs piqûres d'essai sur les plantes des bandes, ils perdent leur capacité virulifère avant d'accéder à la parcelle (Hooks & Fereres, 2006). Enfin, les bandes attirent une grande diversité d'auxiliaires* qui, par leur action prédatrice ou parasitoïde, peuvent réduire la population de pucerons et limiter la propagation des virus (Pfiffner et al 2005 ; Ronzon 2005 ; Garzo et al. 2004 cités par Hooks & Fereres 2006).

L'hypothèse testée dans cette étude est qu'un aménagement adéquat de l'environnement de la parcelle de melon peut contribuer à réguler les populations de pucerons et/ou les épidémies virales et ainsi à renforcer l'efficacité de la résistance génétique médiée par *Vat*.

Trois types d'aménagements (sol nu, bandes enherbées et bandes fleuries) sont évalués au champ.

L'expérimentation est conduite dans le cadre du projet Parcel-R 2010-2012 financé par le département Santé des Plantes et Environnement de l'Inra.



MATERIELS ET METHODES

1. Dispositif expérimental

1.1. Localisation

L'essai Parcel-R est implanté sur une parcelle du domaine expérimental Inra de St Paul à Montfavet. Cette parcelle est située dans la zone codifiée EFGHI5 du domaine et a une superficie de 1,3 ha. L'essai occupe approximativement 50% de la parcelle (Figure 1).

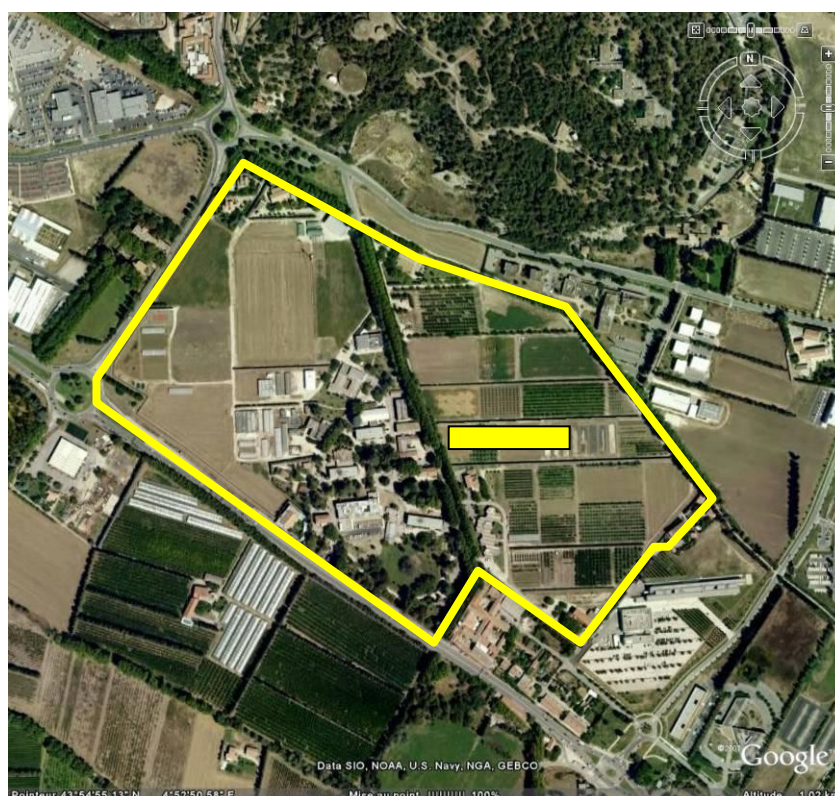


Figure 1 : Image satellite montrant le domaine expérimental Inra de St Paul à Montfavet et l'emplacement de l'essai Parcel-R (position GPS : 43° 54'N, 4°52'E).

1.2. Traitements expérimentaux

Deux facteurs expérimentaux sont étudiés dans cet essai :

- 1) le type d'aménagement de l'environnement de la culture de melon ; trois modalités sont testées : bandes enherbées (BE), bandes fleuries (BF) et sol nu (SN) ;
- 2) le niveau de résistance génétique à *Aphis gossypii* ; deux modalités sont testées : melons résistants possédant le gène *Vat* (R) et melons sensibles dépourvus du gène *Vat* (S).

Les six traitements expérimentaux qui résultent du croisement des modalités de ces deux facteurs sont comparés dans un dispositif de type split-plot où l'aménagement de l'environnement de la culture est le facteur principal (Figure 2).

Les couples de modalités R et S sont séparés les uns des autres par des zones tampons afin d'éviter les interactions entre les effets des différents aménagements parcellaires. Ces zones tampons sont constituées de melons de variétés commerciales ayant le même niveau de résistance à la colonisation par *Aphis gossypii* que les modalités expérimentales à côté desquelles elles sont implantées (R ou S) ainsi qu'une tolérance à l'oïdium (causé par deux champignons *Golovinomyces cichoracearum* et *Podosphaeria xanthii*).

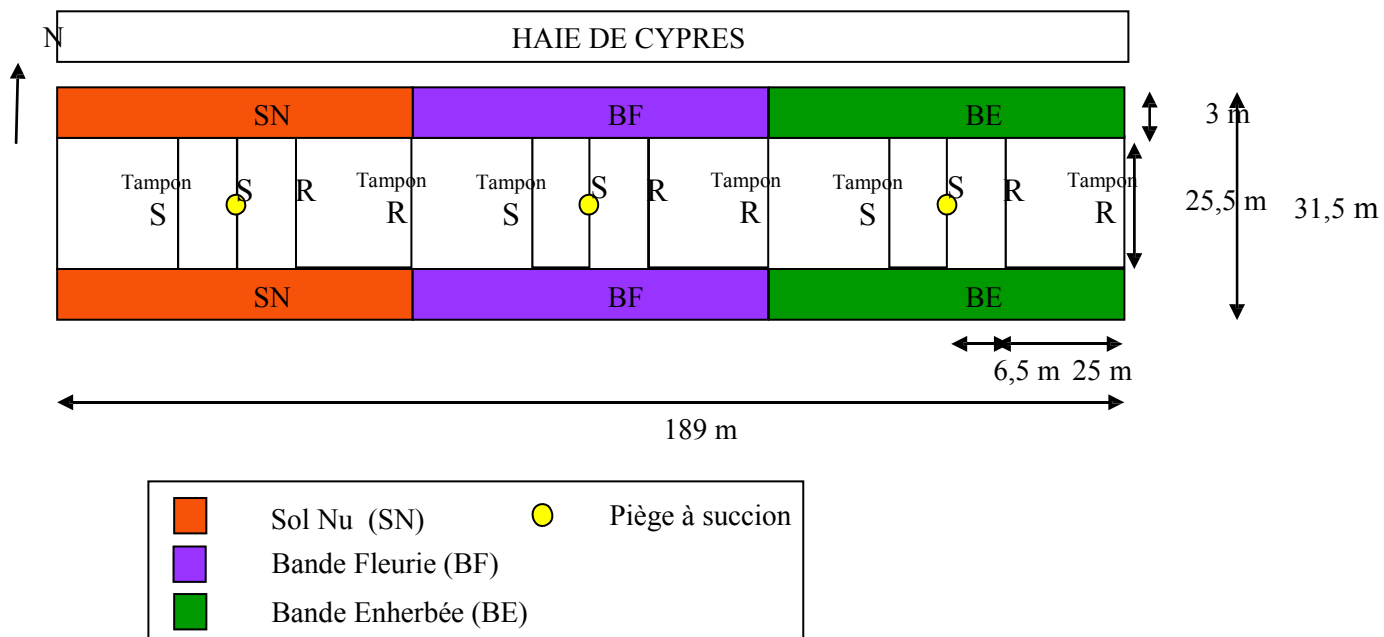


Figure 2 : Dispositif expérimental de l'essai Parcel-R implanté à St Paul

1.3. Matériel végétal

1.3.1. Melons des modalités expérimentales et des zones tampons

Les modalités R et S sont des lignées expérimentales dérivant respectivement des variétés Margot (possédant le gène *Vat*) et Védrantais (dépourvue du gène *Vat*). Les zones tampons R et S sont respectivement constituées de melons des variétés F1 Felino (possédant le gène *Vat*) et F1 Cisco (dépourvu du gène *Vat*) toutes deux commercialisées par la société Clause. Le semis est effectué le 29/04/11 à la station de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL) du centre Inra PACA. Les graines sont semées dans des godets de 7 en plastique à raison d'une graine par pot remplis de terreau (Seedling Substrat, Klassman). Les pots sont placés pendant une semaine sur des tablettes chauffantes à 30°C jusqu'à la levée et sont arrosés quotidiennement (Figure 3a). Quinze jours après le semis, les plantules sont placées en tunnel pépinière (16°C) afin de les endurcir jusqu'à la plantation (Figure 3b).

Aucun traitement insecticide n'est appliqué. Un engrais contenant 4 unités d'azote, 2 de phosphore et 6 de potassium est apporté aux plantules à trois reprises.



Figure 3 : a) Tablette chauffante utilisée dans les serres de la station du GAFL ; b) Plants de melon dans le tunnel pépinière de la station du GAFL

1.3.2. Bandes enherbées et fleuries

Les espèces végétales des bandes enherbées et fleuries sont choisies pour constituer respectivement un couvert homogène et un couvert hétérogène de plantes non hôtes des pucerons *Aphis gossypii* et non hôtes des principaux virus qu'ils transmettent (CMV, WMV, ZYMV, CABYV).

Les bandes enherbées sont constituées d'un ray-grass anglais (RGA) (*Lolium perenne*).

Les bandes fleuries sont constituées d'un mélange de cinq espèces : sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), gesse (*Lathyrus sativus*), pimprenelle (*Sanguisorba minor*), bleuet (*Centaurea cyanus*) et marjolaine (*Origanum majorana*) (Figure 4). Le choix de ces espèces est détaillé en Annexe 3.



Figure 4 : Les différentes espèces de la bande fleurie : a) sainfoin, b) gesse, c) pimprenelle, d) bleuet, e) marjolaine

1.4. Mise en place de l'essai

L'itinéraire technique complet de l'essai est présenté en Annexe 4.

1.4.1. Semis des bandes enherbées et fleuries

Chaque bande mesure 63 m de long et 3 m de large. Le semis est réalisé à la volée le 22/03/11 soit deux mois avant la plantation des melons (Figure 5). Les bandes fleuries sont semées en deux passages (d'abord les grosses graines, puis les graines plus fines) séparés d'un passage de rouleau. Les densités de semis sont présentées dans le Tableau 1.



Figure 5 : Semis à la volée des graines des bandes enherbées et fleuries

Tableau 1 : Densités de semis des espèces des bandes enherbées et fleuries.

Modalité	Espèce	% dans le mélange	Densité de semis (kg/ha)	Quantité à semer pour 400m ² (kg)
BE	RGA	100	50	2
BF	Sainfoin	40	22	0,88
	Gesse	30	16,5	0,66
	Pimprenelle	20	11	0,44
	Bleuet	5	2,75	0,11
	Marjolaine	5	2,75	0,11

Les bandes enherbées et fleuries sont irriguées tous les deux jours durant 1h15 grâce à des sprinklers (Figure 6). Elles sont désherbées manuellement pour éliminer les plantes des espèces indésirables.



Figure 6 : Sprinklers dans la bande enherbée.

1.4.2. *Plantation des melons*

Les melons sont plantés le 24/05/11 au stade 2-3 feuilles. Les rangs sont plantés parallèlement à la haie de cyprès (Figure 7).



Figure 7 : a) Plantation des rangs parallèlement à la haie de cyprès ; b) Plantation d'un melon

Les modalités R et S sont constituées de 16 rangs (inter-rang de 1.5 m) de 13 plantes (espace inter-plante de 50 cm).

Les zones tampons R et S sont constituées de 16 rangs (inter-rang de 1.5 m) de 25 plantes (espace inter-plante de 1 m).

Les melons sont irrigués grâce à un système de goutte à goutte (Annexe 4).

2. Suivi du développement des bandes fleuries

A trois reprises au cours de l'essai (29/04/11, 10/05/11 et 20/05/11) un quadrat de 1m² est positionné dans chacune des deux bandes examinées (bande Nord et bande Sud) : 1) le pourcentage de couverture du sol par la végétation est déterminé visuellement ; 2) le nombre de plantes de chaque espèce est compté afin de calculer les fréquences relatives de chaque espèce (Figure 8).

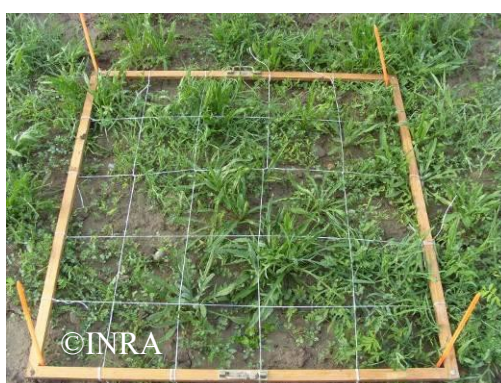


Figure 8 : Quadrat de 1m² utilisé pour suivre le développement des bandes fleuries

De plus, à partir de la plantation, le stade végétatif de 10 individus pour chaque espèce est déterminé tous les 10 jours (26/05/11, 06/06/11, 17/06/11, 26/06/11 et 06/07/11).

3. Suivi des pucerons ailés visitant les parcelles de melon

3.1. Capture

Pour chacune des trois modalités d'aménagement parcellaire, un piège à suction est installé au centre de la parcelle de melons entre les rangs N°8 et N°9 et à la jonction des modalités R et S (Figures 2 et 9a).

Les pièges ont été construits par l'équipe Atelier de la Station de Pathologie végétale selon le modèle décrit par Labonne et al. (1982). Ils sont constitués d'un caisson d'aspiration dans lequel s'insère un collecteur d'insectes (Figure 9b). Les insectes volant au-dessus de la bouche d'aspiration sont aspirés et entraînés dans le pot de collecte contenant 100mL d'eau additionnée d'un mouillant (Teepol 5µL/L).



Figure 9 : a) Piège à suction installé dans la parcelle ; b) Principe de fonctionnement du piège à suction

Les pièges sont installés la veille de la plantation (J0). Ils fonctionnent 14 h par jour de 8h à 22h. Les captures sont relevées tous les jours avant la mise en route des pièges. L'opération consiste à soulever délicatement le collecteur, à prendre le pot de collecte contenant les insectes (du jour J) et à le remplacer par un nouveau pot de collecte (du jour J+1). Le suivi est effectué pendant 65 jours.

3.2. Traitement des captures

Les pots de collecte sont ramenés à la station où ils sont traités dans les 48 heures maximum. Le traitement consiste à rincer la collecte à l'eau du robinet afin d'éviter une macération (et donc une dégradation) des insectes dans le pot de collecte. La collecte est versée sur un carré de tulle posé dans un entonnoir. L'entonnoir est lui-même posé sur une bouteille pour plus de stabilité. La collecte est délicatement rincée par des jets de pissette. Les insectes sont délicatement prélevés grâce à un pinceau et transférés dans un tube étiqueté de 12mL contenant de l'alcool 70°. Ce tube est appelé le « culot ».

Les culots sont triés sous une loupe binoculaire en deux catégories : pucerons et non pucerons. L'identification des pucerons est faite sur la base de leurs critères

morphologiques (Annexe 5) à l'aide du manuel d'identification des pucerons de Taylor (1984). Le tri et l'identification des espèces sont des étapes très longues. De plus, l'identification nécessite une expertise longue à acquérir. C'est la raison pour laquelle, seuls les individus capturés au cours de la première semaine ont été déterminés dans le cadre de ce stage.

4. Suivi des virus infestant les parcelles de melon

4.1. Echantillonnage

Un prélèvement de feuilles est réalisé chaque semaine pendant 9 semaines. Pour chaque date de prélèvement, 240 plantes (40 plantes x 6 traitements) sont échantillonnées (plan d'échantillonnage en Annexe 6). Les mêmes plantes sont suivies d'un prélèvement à l'autre. L'emplacement de ces plantes est repéré par des piquets à la plantation. L'échantillonnage consiste à prélever une jeune feuille (environ 5-10cm de diamètre) pour chacune des 240 plantes. Dans la mesure du possible, pour une même plante, les feuilles sont prélevées toujours sur la même tige (repérée par un lien de couleur). Le premier prélèvement est réalisé une semaine après la plantation. La probabilité de détecter les virus dès la première semaine étant faible, seuls les échantillons positifs au deuxième prélèvement sont testés rétroactivement. Les feuilles échantillonnées sont conservées en chambre froide jusqu'aux tests sérologiques.

4.2. Tests sérologiques

4.2.1. Virus recherchés

Les virus WMV (*Watermelon mosaic virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*) et CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) sont recherchés dès le premier prélèvement. En raison d'une arrivée plus tardive dans la culture, le ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) est recherché uniquement à partir du 8^{ème} prélèvement. Les virus sont recherchés par DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) dont le principe a été décrit par Clark & Adams en 1977 (Annexe 7).

4.2.2. Etapes du DAS-ELISA

4.2.2.1. Etape 1 : broyage des échantillons

Les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur à rouleaux (figure 10) : un morceau de feuille d'environ 0,5g est prélevé et placé entre les rouleaux du broyeur. Le jus extrait est entraîné dans 4mL de tampon de broyage (composition en Annexe 8).



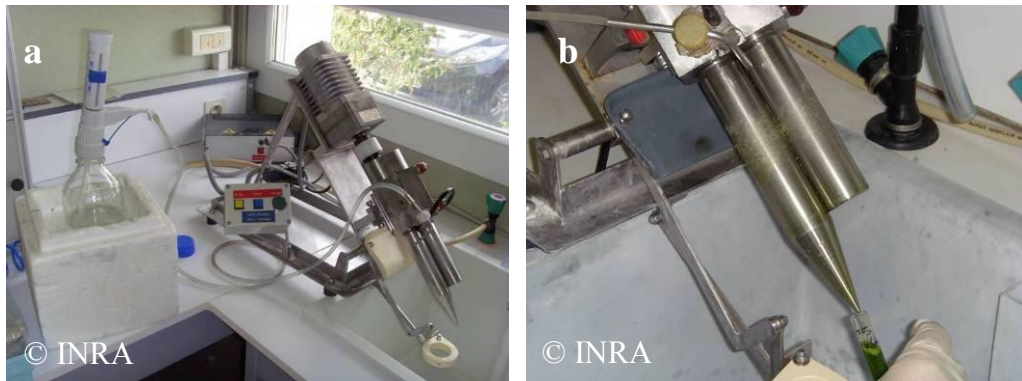


Figure 10 : a) Broyeur à rouleaux ; b) Broyage d'un échantillon

4.2.2.2. Etape 2 : fixation des anticorps (coating)

Cette étape permet la fixation des anticorps sur la plaque ELISA à 96 puits.

Les anticorps sont dilués au 1/1000^{ème} dans un tampon de fixation (composition en Annexe 8). Les anticorps sont déposés à raison de 150µL par puits. Les plaques sont fermées avec un couvercle, déposées dans une boîte contenant un papier humidifié afin d'éviter le dessèchement de la plaque et mises à incuber 3h à 37°C. Après incubation, les plaques sont vidées afin d'éliminer le surplus d'anticorps, rincées trois fois à l'eau avant d'être remplies avec du PBS Tween (composition en Annexe 8).

4.2.2.3. Etape 3 : dépôt des échantillons

Cette étape permet la fixation des antigènes aux anticorps.

Les échantillons sont déposés à raison de 150µL par puits (Figures 11a et 11b).

Chaque échantillon est doublé afin de mettre en évidence une éventuelle contamination par une différence importante de valeurs entre les deux puits.

Les puits « blancs » contiennent 150µL de tampon de broyage.

Les puits « témoins sains ou témoins négatifs » contiennent 150µL de broyat de feuille de melon sain cultivé en serre insect-proof.

Les puits « témoins positifs » contiennent 150µL de broyat de feuille infectée par la souche de référence du virus recherché (pour chacun des virus, les témoins positifs des différents tests correspondent à des aliquots d'un même broyat, effectué à partir d'une plante virosée de la collection de souches).

Les plaques, fermées avec un couvercle sont ensuite placées au réfrigérateur à 4°C pendant la nuit.

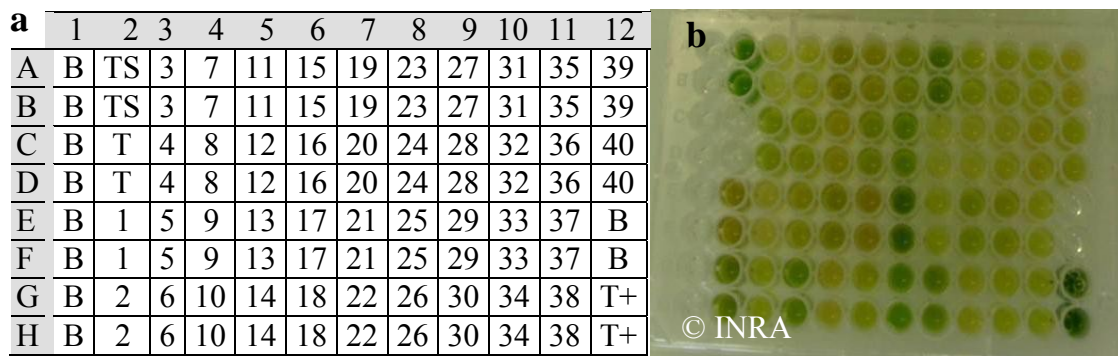


Figure 11 : a) Plan d'une plaque ELISA permettant de tester 40 échantillons (B : Blanc ; TS : Témoin sain ; T+ : Témoin positif) ; b) Plaque ELISA après le dépôt des échantillons

4.2.2.4. Etape 4 : dépôt du conjugué

Cette étape permet la fixation du conjugué (anticorps-enzyme phosphatase alcaline) à l'antigène.

Après élimination des échantillons par aspiration, la plaque est rincée trois fois à l'eau du robinet, puis elle est remplie avec du PBS Tween. Après avoir été vidés et rincés, les puits de la plaque sont remplis avec 150µL de la solution contenant le conjugué anticorps-enzyme dilué dans un tampon spécifique (composition en Annexe 8). Les dilutions sont variables en fonction du virus recherché (Tableau 2).

Tableau 2 : Dilutions des conjugués en fonction des virus

Virus	Dilution du conjugué
CMV	1/4000 ^{ème}
WMV	1/2000 ^{ème}
CABYV	1/2500 ^{ème}
ZYMV	1/4000 ^{ème}

Les plaques sont fermées et mises à incuber 2h30 à 37°C dans une boîte contenant un papier humide.

4.2.2.5. Etape 5 : dépôt du substrat

Cette étape permet de visualiser les puits où la fixation entre l'antigène et le conjugué s'est faite en apportant le substrat de l'enzyme qu'elle va dégrader, provoquant une réaction colorée.

La plaque est rincée pour éliminer le surplus de conjugué, non fixé à un antigène.

Le substrat de l'enzyme, le pNPP (para Nitro Phényl Phosphate) est déposé à raison de 150 μ L par puits. Pour cela le substrat (sous forme de pastille) est dissous dans un tampon spécifique (composition en Annexe 8) à raison de 1mg par mL.

Les lectures des plaques se font à une heure, deux, trois et quatre heures. Les puits positifs (mettant en évidence la présence de virus) prennent une coloration jaune. L'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre relié à un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse (Ascent) (Figure 12a). Plus la couleur est intense plus l'échantillon contient de virus (Figure 12b). Un échantillon est considéré comme positif lorsque sa DO (Densité Optique) corrigée (DO brute-DO blanc) est supérieure ou égale à 0,1 unité ou que sa DO est au minimum égale à trois fois celle du témoin sain.

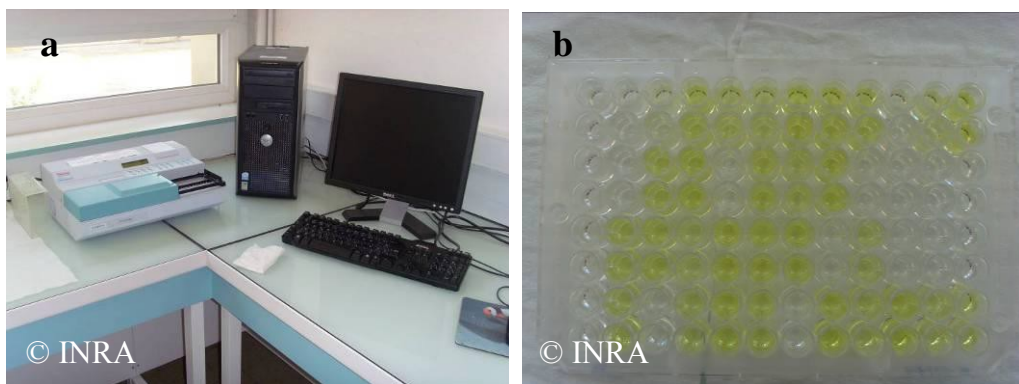


Figure 12 : a) Spectrophotomètre relié à l'ordinateur ; b) Plaque ELISA après le dépôt du substrat

RESULTATS

1. Développement des bandes fleuries

1.1. Couverture du sol et fréquences relatives des espèces

Le pourcentage de couverture du sol par la végétation a été déterminé dans des quadrats de 1m² à trois reprises avant la plantation des melons (Figure 13).

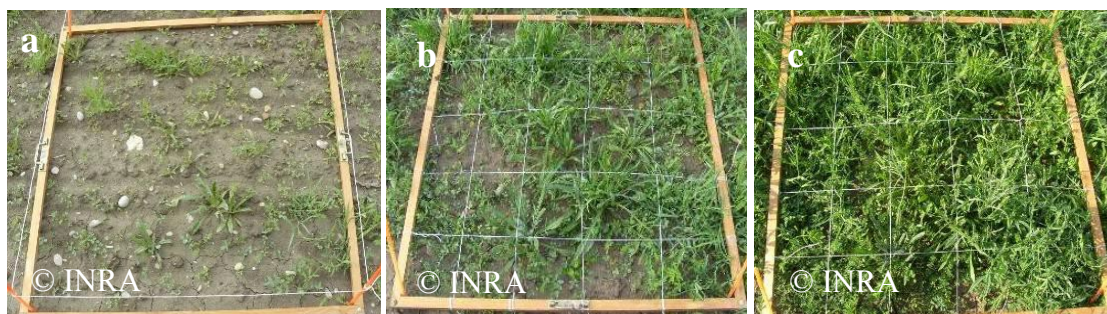


Figure 13 : Couverture du sol par la végétation dans la bande fleurie nord le 29/04/11 (a), 10/05/11 (b) et 20/05/11 (c)

Le pourcentage de couverture dans le quadrat de la bande nord est d'environ 40% au premier comptage, 80% au second et 100 % au dernier (Figure 13). Pour la bande sud, les pourcentages sont légèrement inférieurs et sont d'environ 30% au premier comptage, 75% au second et 95 % au dernier. La couverture du sol dans les bandes fleuries et enherbées est totale à la plantation des melons.

La composition floristique des quadrats a été déterminée aux mêmes dates (Figure 14).

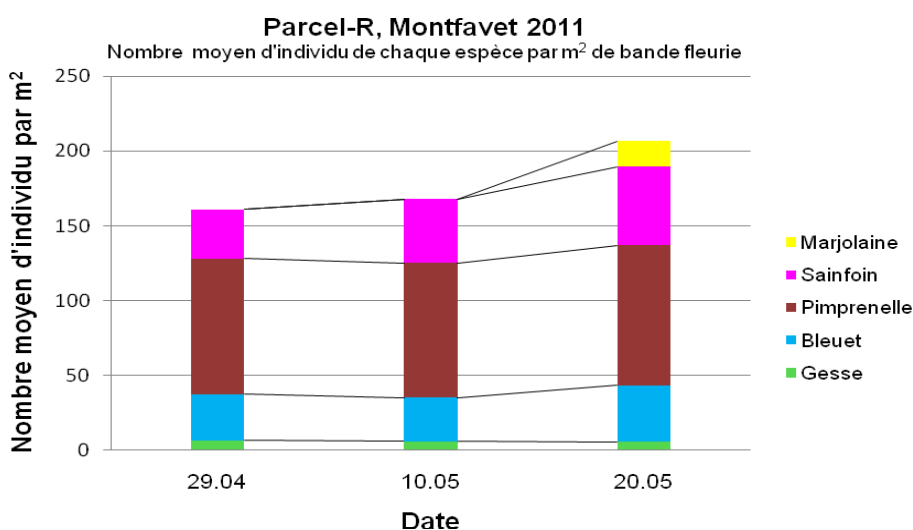


Figure 14 : Composition floristique des bandes fleuries les 29/04/11, 10/05/11 et 20/05/11.

Pour la gesse, le bleuet et la pimprenelle, le nombre d'individus varie très peu d'un comptage à l'autre : pour ces espèces la levée est complète dès la fin avril. Les densités de peuplement moyennes sont respectivement de 6, 38 et 94 individus par m².

Pour le sainfoin, la levée s'échelonne sur une période plus longue. Elle s'achève fin mai avec une densité de peuplement moyenne de 53 individus par m².

Pour la marjolaine, la levée est très tardive. Les premiers individus sont repérés lors du troisième comptage.

Fin mai, la pimprenelle représente 45% du peuplement mais la couverture du sol est principalement assurée par le bleuet et la gesse, beaucoup plus développés à cette date.

1.2. Stades de développement

Les stades de développement des plantes des bandes fleuries ont été mesurés à plusieurs reprises, en mettant notamment l'accent sur la floraison (Figure 15)

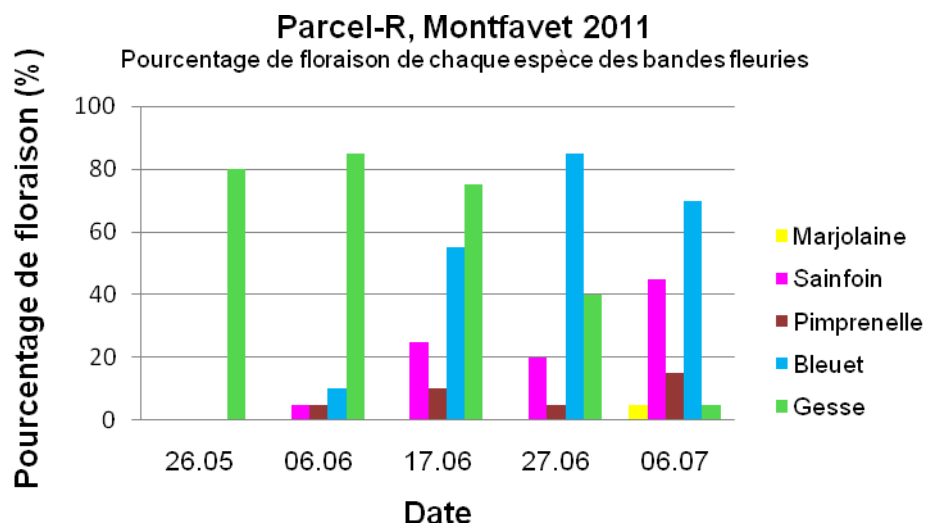


Figure 15 : Evolution du pourcentage d'individus portant des fleurs à partir de la plantation.

Au moment de la plantation, seule la gesse est en fleur. Lorsque la floraison de la gesse diminue, celle du bleuet et des autres espèces démarre. Finalement, l'association des différentes espèces permet d'avoir une floraison échelonnée pendant toute la durée de l'essai.

2. Dynamiques des populations de pucerons ailés

2.1 Captures

Pour chacune des trois modalités (bande enherbée, bande fleurie et sol nu) un piège à suction a été installé. Chaque jour les individus ailés piégés ont été dénombrés (Figure 16).

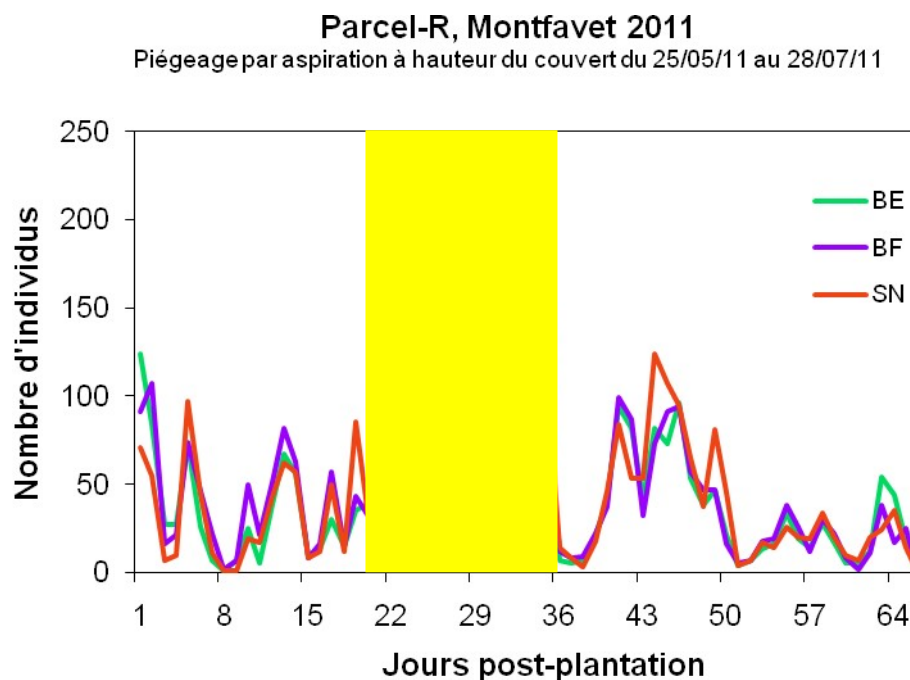


Figure 16 : Comparaison du nombre de pucerons ailés capturés chaque jour à partir de J1 (lendemain de la plantation) pour les trois modalités : bande enherbée (BE), bande fleurie (BF) et sol nu (SN)

Les dynamiques observées pour les trois modalités d'aménagement parcellaire ont des allures semblables. Globalement, les pics et creux d'activité ont lieu aux mêmes moments pour les trois modalités. Par contre, l'intensité de ces périodes d'activité (notamment les pics) peut être variable d'une modalité à une autre.

Pendant les trois premières semaines, l'activité de vol est légèrement plus intense dans la modalité BF (862 individus capturés) que dans BE (771 individus) et SN (718 individus). Pour BF, 25% des individus capturés pendant l'essai le sont au cours des 17 premiers jours de l'essai. Cette proportion est atteinte à J21 pour BE et à J23 pour SN (Figure 17). Pour les modalités BE et BF, le pic d'activité maximale est atteint respectivement à J22 (175 individus capturés) et J23 (165 individus). Pour SN, il est atteint plus tardivement à J34 (225 individus).

Si les trois premières semaines sont globalement plus favorables à l'activité de vol dans les modalités BE et BF, la tendance s'inverse par la suite avec des effectifs capturés dans la modalité SN régulièrement supérieurs à ceux capturés dans BE et BF.

Pendant la durée du suivi (65 jours), 3029, 3081 et 3318 individus sont capturés respectivement dans les modalités BE, BF et SN. Trois quarts des individus sont capturés au cours des 42 premiers jours. (Figure 17)

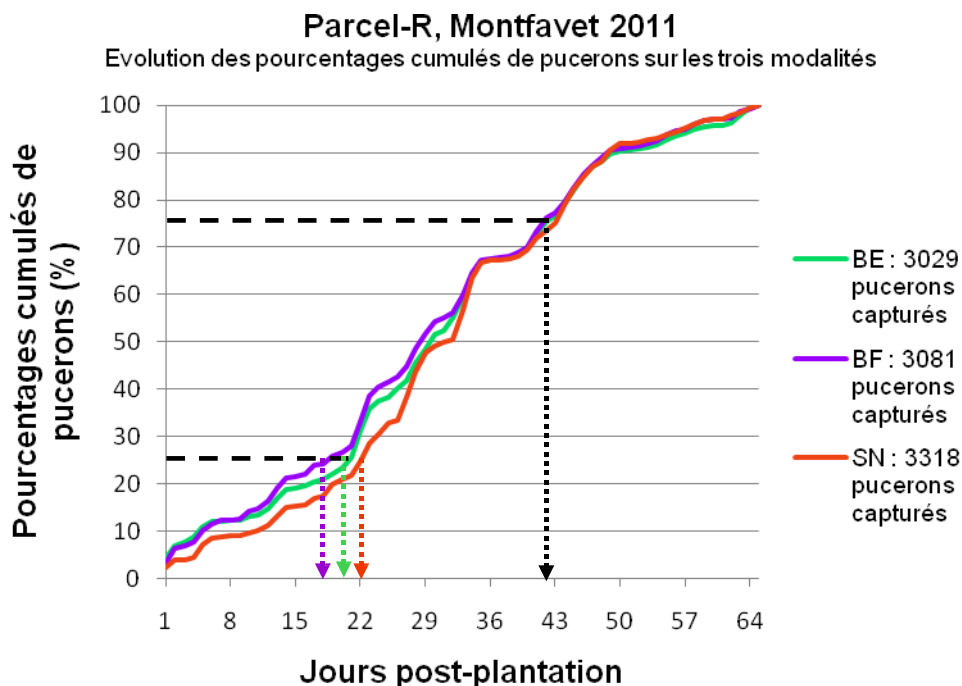


Figure 17 : Evolution des pourcentages cumulés de pucerons pour les trois modalités : bande enherbée (BE), bande fleurie (BF) et sol nu (SN)

2.2 Espèces de pucerons présentes

Les individus capturés entre J1 et J7 ont été déterminés pour les trois modalités.

Au total, 377 individus représentant 23 espèces ont été capturés dans la modalité BF, 368 individus représentant 28 espèces ont été capturés dans la modalité BE et 295 individus représentant 27 espèces ont été capturés dans la modalité SN.

Parmi ces espèces, 15 présentent au moins deux individus capturés dans BF, 17 dans BE et 18 dans SN (Figure 18).

Le genre *Aphis* correspond au genre majoritaire capturé dans les trois modalités. En effet les différentes espèces d'*Aphis* représentent 68% des individus capturés dans la modalité BF, 64% dans la modalité BE et 71% dans la modalité SN (Figure 18).

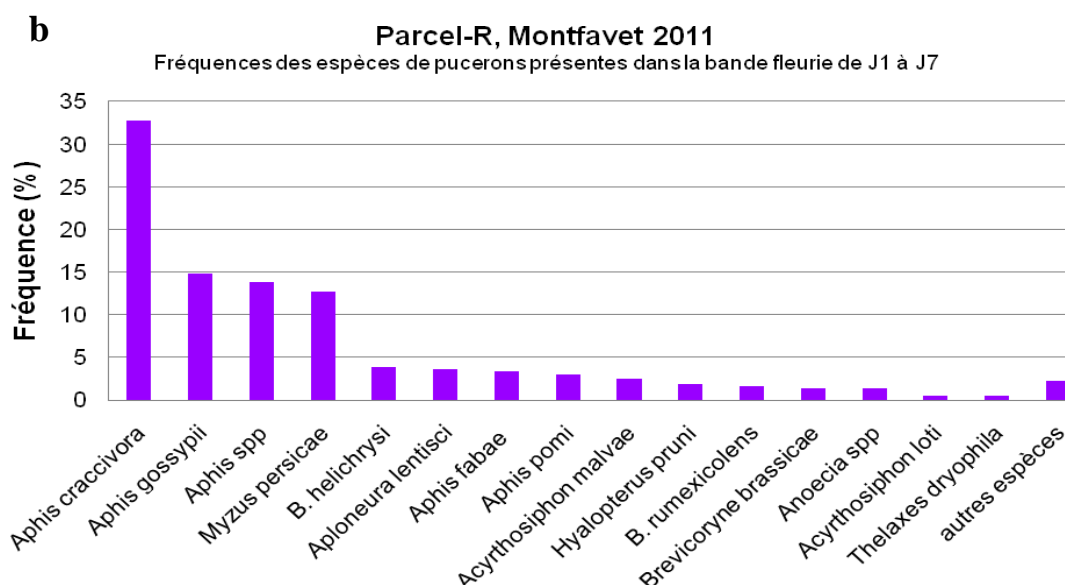
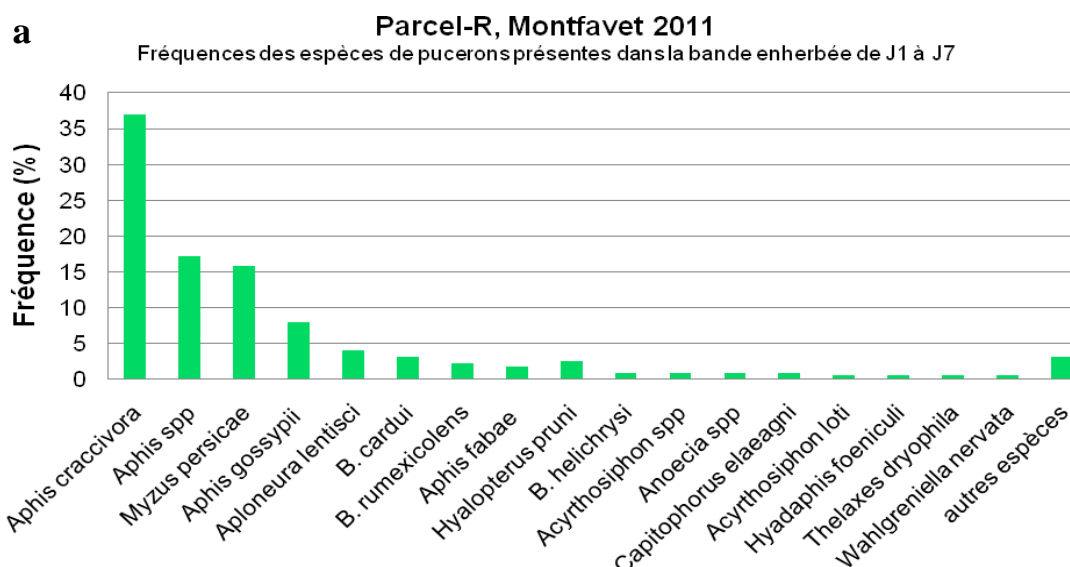
L'espèce *Aphis gossypii* représente 15% de ce genre pour BF, 8% pour BE et 14% pour SN.

L'espèce *Mysus persicae* est également très présente dans les trois modalités allant de 9% des individus capturés dans la modalité SN à 15 % dans la modalité BE.

Pour les trois modalités, 80% des individus capturés appartiennent au genre *Aphis* ou à l'espèce *Myzus persicae* (Figure 18 et Annexe 9).

D'autres espèces telles que *Aploneura lentisci* ou appartenant au genre *Brachycaudus* (désigné par la lettre B. dans la figure 18) sont également récurrentes aux trois modalités mais dans de plus faibles proportions (3 à 6% selon les modalités).

Certaines espèces présentent un seul individu capturé sur la semaine : 8 dans la modalité BF, 11 dans la modalité BE et 9 dans la modalité SN (Tableau 3). Ces espèces minoritaires représentent 2 à 3% des espèces capturées et sont regroupées dans la catégorie « autres espèces » de la Figure 18. Une seule espèce est commune aux trois modalités, il s'agit de *Macrosiphum rosae* (les plantes hôtes de ce puceron appartiennent au genre *Rosa sp*). Deux espèces sont communes aux modalités BF et SN : *Diuraphis noxia* (les plantes hôtes de ce puceron sont l'orge et le blé) et *Tuberculatus borealis* (tableau 3).



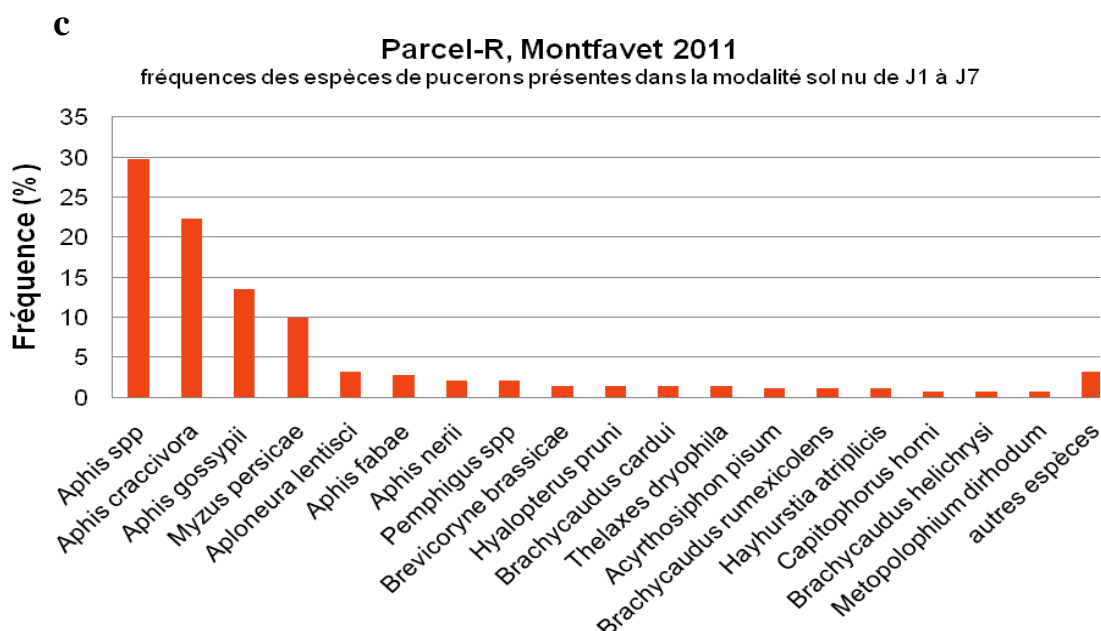


Figure 18 : Fréquences des espèces de pucerons capturés au cours de la première semaine pour les trois modalités : a) bande enherbée ; b) bande fleurie ; c) sol nu

Tableau 3 : Espèces minoritaires (un seul individu capturé au cours de la première semaine) classées dans la catégorie « autres espèces »

BF	BE	SN
<i>Capitophorus elaeagni</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Acyrtosiphon loti</i>
<i>Capitophorus hippophaes</i>	<i>Aphis nerii</i>	<i>Acyrtosiphon malvae</i>
<i>Diuraphis noxia</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Adelges spp</i>
<i>Hayhurstia atriplicis</i>	<i>Metopolophium dirhodum</i>	<i>Chaitophorus populeti</i>
<i>Hyadaphis foeniculi</i>	<i>Myzocallis castanicola</i>	<i>Cryptomyzus ribis</i>
<i>Macrosiphum rosae</i>	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	<i>Diuraphis noxia</i>
<i>Pemphigus spp</i>	<i>Adelges spp</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>
<i>Tuberculatus borealis</i>	<i>Hoplocallis pictus</i>	<i>Tuberculatus borealis</i>
	<i>Macrosiphum rosae</i>	<i>Wahlgreniella nervata</i>
	<i>Myzocallis spp.</i>	
	<i>Tetraneura ulmi</i>	

Espèces communes aux trois modalités

Espèces communes aux modalités BF et SN

3. Epidémies virales

Quatre virus ont été recherchés par DAS-ELISA : CABYV, CMV, WMV et ZYMV (Figure 19).

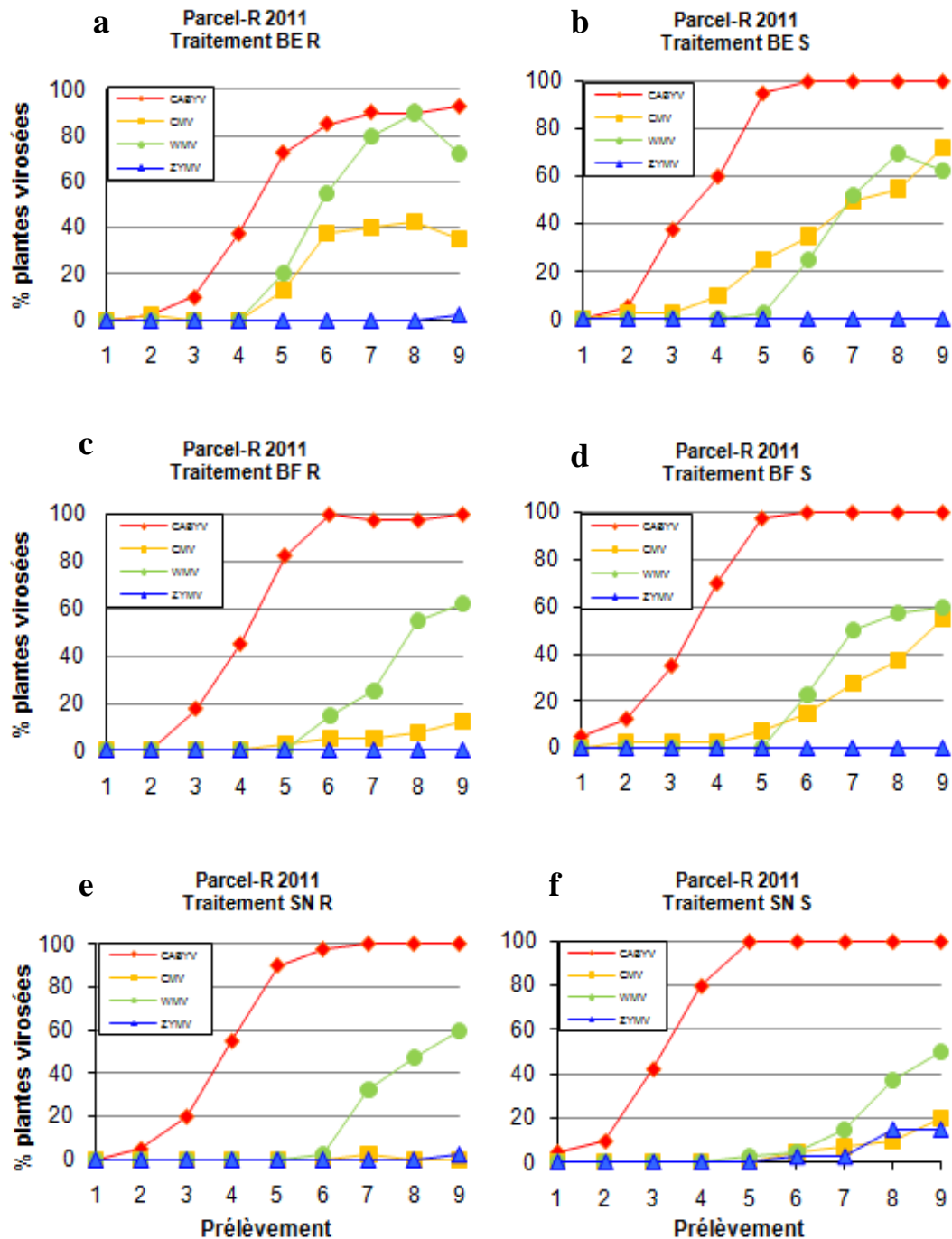


Figure 19: Evolution du pourcentage de plantes infectées par les virus CABYV, CMV, WMV et ZYMV pour les traitements bande enherbée R (a), bande enherbée S (b), bande fleurie R (c), bande fleurie S (d), sol nu R (e) et sol nu S (f)



3.1. CABYV

L'initiation de l'épidémie a lieu au cours de la 1^{ère} semaine pour les traitements BFS et SNS (deux plantes positives dès le premier prélèvement). L'initiation est retardée d'une semaine pour BES, BER et SNR et de deux semaines pour BFR. Selon les traitements, il faut trois à cinq semaines pour atteindre 90% de plantes virosées. Ce niveau d'infestation est détecté dès la 5^{ème} semaine pour les traitements BES, BFS, SNS et SNR, à la 6^{ème} semaine pour BFR et à la 7^{ème} semaine pour BER. Le gène *Vat* a permis de retarder l'initiation de l'épidémie pour les modalités BF et SN et de ralentir légèrement sa vitesse de propagation pour la modalité BE.

3.2. CMV

L'initiation a lieu au cours de la deuxième semaine pour BES et BFS. Pour ces deux traitements, les dynamiques virales augmentent progressivement pour atteindre respectivement 73% et 55% au dernier prélèvement.

Pour BER, une plante positive au 2^{ème} prélèvement est perdue suite à un coup de mistral. Il faut attendre le 5^{ème} prélèvement pour détecter à nouveau le virus dans ce traitement tout comme dans BFR. Les dynamiques virales évoluent toutefois de manières différentes puisqu'au dernier prélèvement le pourcentage de plantes virosées est de 43% dans BER et de 13% dans BFR.

L'initiation est détectée encore plus tardivement dans SNS (6^{ème} semaine) et SNR (7^{ème} semaine). Les dynamiques virales évoluent peu et atteignent au dernier prélèvement 20% dans SNS et 3% (une seule plante) dans SNR. Pour ce virus, le gène *Vat* a un effet marqué sur la vitesse de propagation de l'épidémie.

3.3. WMV

L'initiation est globalement tardive : 5^{ème} semaine pour BES, SNS et BER et 6^{ème} semaine pour BFS, BFR et SNR. Pour BES et BER, le pourcentage de plantes virosées atteint respectivement un maximum de 70% et 90% au 8^{ème} prélèvement. Pour les autres traitements, le pourcentage de plantes virosées au dernier prélèvement varie entre 50 et 63%. Le gène *Vat* semble avoir un effet inverse à celui observé pour le CABYV et le CMV : le pourcentage de plantes virosées est supérieur dans la modalité R que dans la modalité S.

3.4. ZYMV

L'épidémie est très tardive et limitée à certains traitements. Pour SNS, l'initiation a lieu au cours de la 6^{ème} semaine. La propagation de l'épidémie est très limitée et atteint 15% au 9^{ème} prélèvement. Pour BER et SNR, une seule plante est positive au 9^{ème} prélèvement. La modalité BF n'est pas infectée.



DISCUSSION

1) Développement des bandes fleuries

Au moment de la plantation, le pourcentage de couverture du sol est de 100% et le pourcentage de floraison est de 80% pour la gesse. L'objectif visé, à savoir obtenir un couvert dense et fleuri, a été atteint. Il semblerait donc que le semis des espèces de la bande fleurie deux mois avant la plantation des melons soit adéquat. De plus le mélange choisi permet un étalement de la floraison durant toute la durée de l'essai même si la marjolaine pourrait éventuellement être éliminée du mélange au vu de sa levée tardive et de sa petite taille qui la cantonne en dessous du couvert créé par les autres espèces.

2) Dynamiques des pucerons ailés

Au cours des trois premières semaines, l'activité de vol est légèrement supérieure pour les modalités bande fleurie et bande enherbée que pour la modalité sol nu. Cette tendance s'inverse par la suite mais globalement la période J22-J34 est une période d'activité intense au cours de laquelle se produisent les pics d'activité maximale pour les trois modalités. Cependant ces pics n'ont pas les mêmes valeurs selon les modalités. Le pic d'activité maximale est supérieur pour la modalité sol nu que pour les deux autres modalités où les valeurs sont assez proches. Les bandes enherbées et fleuries semblent donc avoir eu un léger effet régulateur sur la dynamique des pucerons ailés à partir de la quatrième semaine. Cet effet peut être lié à une possible présence d'auxiliaires dans ces bandes. En effet, de part leur couvert végétal et leur floraison (pour les bandes fleuries), elles peuvent améliorer la diversité et l'abondance des parasitoïdes et prédateurs des pucerons (Pfiffner et al. 2005). De plus, ces bandes peuvent jouer un rôle d'écotone autrement dit de transition entre un milieu naturel et un milieu cultivé facilitant le passage de certaines espèces d'insectes comme les carabes. Ce mécanisme de régulation biologique des bandes enherbées et fleuries sera approfondi dès 2012 grâce au suivi de certaines espèces phares de l'entomofaune auxiliaire.

Lors de la première semaine de capture, 23 à 29 espèces ont été recensées selon les modalités pour un total de 39 espèces différentes capturées sur l'ensemble de la semaine. Cette diversité est faible au regard des 700 espèces recensées en France métropolitaine et des 4500 espèces recensées dans le monde (Martinez & Gauvrit, 1997). *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii* et *Myzus persicae* représentent 46% des individus capturés dans la modalité sol nu et 61% dans les modalités bandes fleuries et bandes enherbées. Ces trois espèces sont connues pour coloniser le melon.

Quelqu'unes des espèces capturées ne sont représentées que par un seul individu. Parmi ces espèces minoritaires, aucune ne réalise son cycle biologique sur Cucurbitacées. *Nasonovia ribis-nigri* et *Cryptomyzus ribi* peuvent cependant



transmettent des virus provoquant des mosaïques sur concombre. De plus *Acyrtosiphon loti* et *Acyrtosiphon pisum* réalisent une partie de leur cycle biologique respectivement sur une espèce de sainfoin et sur la gesse. Ces espèces sont présentes dans la bande fleurie ce qui pourrait expliquer leur présence dans les captures. Ces espèces non colonisatrices des Cucurbitacées vont donc se contenter de pratiquer des piqûres d'essai sur les melons et éventuellement leur transmettre des virus.

3) **Epidémies virales**

Les épidémies sont très différentes selon les virus. Les effets des deux facteurs expérimentaux (résistance génétique et aménagement parcellaire) sont plus ou moins marqués selon les virus.

Pour le CABYV, l'épidémie est précoce et rapide. L'initiation est détectée dès le premier prélèvement pour certains traitements et au deuxième pour les autres. Les infections primaires ont donc lieu au cours des deux premières semaines et sont à mettre en relation avec l'activité aphidienne mesurée pendant cette période. Les légères différences d'activité aphidienne mesurées entre les différentes modalités d'aménagement parcellaire ne se sont pas répercutées sur l'initiation des épidémies. Les espèces aphidiennes responsables de ces infections étaient donc présentes pour toutes les modalités. La présence de *Vat* (modalité R) a permis de retarder l'initiation dans deux des trois modalités d'aménagement parcellaire : une semaine de décalage pour SN et deux semaines pour BF. De plus, *Vat* a permis de ralentir légèrement la progression de l'épidémie dans BE. *Vat* a donc eu des effets variables sur les infections primaires et sur les infections secondaires selon les modalités. L'efficacité de *Vat* étant dirigée exclusivement vis-à-vis d'*Aphis gossypii*, on peut penser que cette espèce est partiellement responsable des infections primaires dans les modalités BF et SN et qu'elle est partiellement responsable des infections secondaires dans BE. La modalité BE étant située à proximité d'un autre essai melon mis en place un mois avant Parcel-R (essai VirAphid), il est possible qu'il y ait eu des flux d'*Aphis gossypii* virulifères à partir de cet essai. La détermination des abondances spécifiques pour toute la durée de l'essai permettra éventuellement d'apporter des éléments de réponse à cette question.

Pour le CMV, l'épidémie est précoce pour les modalités BE et BF mais tardive pour SN. La propagation de l'épidémie est plus lente que pour le CABYV. Elle est particulièrement limitée au cours de deux à trois semaines qui suivent les initiations précoces. La présence de *Vat* permet à la fois de retarder l'initiation et de ralentir la progression de l'épidémie. Cet effet marqué de *Vat* semble indiquer que les pucerons *Aphis gossypii* ont été impliqués dans les infections primaires et secondaires de manière plus importante pour le CMV que pour le CABYV. De plus, le développement épidémique est plus faible dans la modalité BF que dans BE. Même si une contamination préférentielle de BE par l'essai VirAphid peut être envisagée pour expliquer cette différence, il est également possible que les bandes fleuries aient



permis de réduire la pression puceron via le développement de l'entomofaune auxiliaire.

Pour le WMV, l'épidémie est tardive. Pour tous les traitements, l'initiation est détectée entre le 5^{ème} et le 6^{ème} prélèvement. Elle peut être mise en relation avec la période d'activité aphidienne intense identifiée entre J22 et J34 pour toutes les modalités d'aménagement parcellaire. Le présence de *Vat* ne semble pas avoir d'effet sur l'initiation. De même, la progression des épidémies ne semblent pas réduite en présence de *Vat* ; au contraire, pour BE et SN, les pourcentages de plantes virosées sont supérieurs dans la modalité R que dans la modalité S. L'absence d'effet de *Vat* semble indiquer que pour ce virus, l'espèce aphidienne *Aphis gossypii* a été peu impliquée dans les infections qu'elles soient primaires ou secondaires.

Pour le ZYMV, l'épidémie est très tardive et concerne quasi exclusivement la modalité SN. La présence de *Vat* permet de réduire à la fois l'initiation et la progression de l'épidémie. Ceci suggère que, pour ce virus, les infections primaires et secondaires ont résulté au moins partiellement de l'activité de pucerons *Aphis gossypii* arrivés tardivement sur la parcelle. Les captures journalières ont d'ailleurs montré que l'activité aphidienne était supérieure dans la modalité SN que dans les autres modalités en fin de cycle. Le fait que l'épidémie se cantonne quasi exclusivement à la modalité SN semble également indiquer un possible effet filtre à virus des bandes. L'épidémie observée pourrait ainsi résulter d'un plus grand nombre de pucerons ailés arrivant directement sur les melons sans décharge virale préalable sur les bandes.

Les résultats obtenus semblent suggérer que l'effet des bandes fleuries sur les épidémies virales est variable selon les virus. Pour le CABYV et le WMV, les bandes ne semblent pas avoir eu d'effet marqué. Pour le CMV, les bandes fleuries semblent avoir permis une réduction de l'activité aphidienne réduisant ainsi la progression épidémique, tandis que pour le ZYMV, elles semblent avoir permis une réduction du potentiel virulifère. Ces deux effets ont été décrits dans la littérature. Il a notamment été montré que les bandes fleuries favorisaient non seulement la présence des auxiliaires mais qu'elles prolongaient également leur durée de vie (Bianchy & Wackers 2008 ; Haenke et al. 2009). De plus, elles permettent de « purifier » les pucerons lorsque ces derniers effectuent leur piqûres d'essai (Fereres 2000). Afin de vérifier le rôle d'*Aphis gossypii* dans les diverses infections, il sera nécessaire de déterminer l'ensemble des pucerons capturés afin de pouvoir calculer la proportion relative d'*Aphis gossypii* au cours de l'essai. De plus, il serait intéressant de mettre en relation les captures journalières et les données météorologiques afin de voir si les dynamiques aphidiennes peuvent être expliquées partiellement par le climat. Un suivi de certaines espèces de l'entomofaune auxiliaire sera effectué à partir de 2012 afin d'évaluer l'impact de la biodiversité fonctionnelle sur ces dynamiques.

Enfin, il est recommandé de planter l'essai 2012 à bonne distance des autres essais Cucurbitacées afin d'éviter les éventuelles contaminations à partir de ces sources d'infection potentielles.



AUTRES MISSIONS

Participation au projet VirAphid (ANR)

Ce projet est mené en parallèle du projet Parcel-R. Les essais ont été implantés sur deux domaines expérimentaux de l'Inra : Godet en Guadeloupe (plantation le 30/03/11) et St Paul à Avignon (plantation le 28/04/11). Un piège à suction a été installé dans chaque site. Chaque semaine, les captures de Guadeloupe ont été expédiées à la Station de Pathologie Végétal pour y être traitées. J'ai été chargée du tri pucerons/non pucerons des captures des deux sites (3500 pucerons au total).

Mise en place d'un élevage d'*Uroleucon juncae*

Au cours d'un des comptages effectués sur les bandes fleuris, de nombreux pucerons ont été observés sur le bleuet. Une colonie a été prélevée afin de : 1) déterminer l'espèce et 2) dénombrer le nombre d'individus constituant cette colonie. Le puceron déterminé est *Uroleucon juncae*, appelé communément puceron du bleuet. Après comptage, la colonie s'élevait à 677 individus.

Afin de déterminer le potentiel biotique de cette espèce, un élevage en conditions contrôlées a été initié. Pour cela, une colonie a été échantillonnée. Dix adultes ont été déposés sur cinq plantules de bleuet âgées de 25 jours. Après 48h, les adultes sont dénombrés et éliminés afin qu'ils ne pondent plus. Leurs descendants sont comptés cinq jours plus tard. Un élevage d'*Aphis gossypii* sur melon a été initié de la même manière afin de servir de témoin. J'ai été chargée du suivi de ces élevages.

Les résultats préliminaires suggèrent une fécondité moyenne de 5 descendants pour *Uroleucon juncae* et de 12 descendants pour *Aphis gossypii*.



LISTE DES ABREVIATIONS

CABYV : Cucurbit aphid-borne yellows virus

CMV : Cucumber mosaic virus

DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

WMV : Watermelon mosaic virus

ZYMV : Zucchini yellow mosaic virus

GLOSSAIRE

Antibiose : Diminution de la capacité de reproduction ici du puceron

Antixénose : Provoque un comportement de fuite

Auxiliaires : Animaux favorable au développement d'une culture. Ici il s'agit d'insectes pouvant être prédateurs de pucerons (les consommant) ou parasitoïde (c'est-à-dire qu'ils pondent leurs œufs à l'intérieur de l'insecte. Ces derniers en se développant vont nuire à sa santé.)

Etiologie : Il s'agit de l'étude des causes des maladies.

Saprophytes : Qui se nourrit de matière organique en décomposition.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Astier S, Albouy J, Maury Y & Lecoq H. 2001. Principes de virologie végétale. INRA Editions, Paris 444p
- Bianchi FJJA & Wackers FL. 2008. Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biological control* 46(3):400-408
- Budnik K, Laing MD, da Graca JV. 1996. Reduction of yield losses in pepper crops caused by potato virus Y in KwaZulu-Natal, South Africa, using plastic mulch and yellow sticky traps. *Phytoparasitica* 24:119-124.
- Clark MF & Adams AN. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
- Damicone JP, Edelson JV, Sherwood JL, Myers LD & Motes JE .2007. Effects of border crops and intercrops on control of cucurbit virus diseases. *Plant disease*. 91(5)509-516
- Desbiez C, Wipf-Scheibel C & Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. *Virus research* 85:5-16.
- Fereres A. 2000. Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Virus research* 71:221-231
- Fernandez-Calvino L, Lopez-Abella D, Lopez-Moya JJ. 2007. Integrated management of insect borne viruses by means of transmission interference as an alternative to pesticides. *General concepts in integrated pest and disease management*.section 3:269-293
- Gallitelli D. 2000. The ecology of *Cucumber Mosaic Virus* and sustainable agriculture. *Virus research*. 71:9-21
- Garzo EI, Duque M, Fereres A.2004. Transmission efficiency of different non-persistent viruses infecting melon by four aphid species. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2:369-376.
- Haaland C, Naisbit RE & Bersier LF. 2010. Sown wildflower strips for insect conservation: a review. *Insect Conservation and Diversity* 4(1):60-80.
- Haenke S, Scheid B, Schaefer M, Tschardt T & Thies C. 2009. Increasing syrphid fly diversity and density in sown flower strips within simple vs. complex landscapes. *Journal of applied ecology* 46(5):1106-1114.
- Hooks CRR & Fereres A. 2006. Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses : A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus research* 120:1-16.



- Labonne et al. 1982. Description d'un piège à succion : son emploi dans la recherche des aphides vecteurs de virus transmis sur le mode non persistant. *Agronomie* 2:773-776
- Lecoq H, Labonne G & Pitrat M. 1980. Specificity of resistance to virus transmission by aphids in *Cucumis melo*. *Annales de phytopathologie* 12(2):139-144.
- Lecoq H, Bourdin D, Wipf-Scheibel C, Bon M & Lot H. 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* 41:749-761
- Lecoq H, Fabre F, Joannon B, Wipf-Scheibel C, Chandeysson C, Schoeny A, Desbiez C. In press. Search for factors involved in the rapid shift in *Watermelon mosaic virus* (WMV) populations in South-eastern France. *Virus Research*.
- Martin B, Rahbé Y & Fereres A. 2003. Blockage of stylet tips as the mechanism of resistance to virus transmission by *Aphis gossypii* in melon lines bearing the Vat gene. *Annals of applied Biology* 142:245-250.
- Martinez M & Gauvrit B. 1997. Combien y a-t-il d'espèces d'insectes en France ? *Bulletin de la Société entomologique de France* 102(4):319-332.
- Palukaitis P & Garcia –Arenal F. 2003. Cucumoviruses. *Advances in virus research* 62 :241-323
- Pfiffner L, Luka H & Schlatter C. 2005. L'aménagement de l'environnement comme moyen de lutte contre les ravageurs en cultures annuelles. Journées techniques fruits & légumes et viticulture biologiques.
- Pitrat M & Lecoq H. 1982. Relations génétiques entre les résistances par non-acceptation et par antibiose du melon à *Aphis gossypii*. Recherche de liaisons avec d'autres gènes. *Agronomie* 2(6):503-508.
- Ronzon B. 2005-2006. Utilisation des bandes fleuries comme réservoir d'insectes auxiliaires. ENITA de Clermont-Ferrand.
- Simon JC, Rispe C & Sunnucks P. 2002. Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology & Evolution*. 17:34-39.
- Simmons JN. 1957. Effects of insecticides and physical barriers on field spread of pepper veinbanding mosaic virus. *Phytopathology* 47:139-145.
- Taylor LR. 1984. *A handbook for aphid identification*. Nicklen J. Rothamsted Experimental Station, England, 171 p.
- Thomas CFG & Marshall EJP. 1999. Arthropod abundance and diversity in differently vegetated margins of arable fields. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 72:131-144.



Tomlinson JA.1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables.
Annals of applied Biology 110:661-681.



Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon de Cellier Cynthia est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

ANNEXES

ANNEXE 1 : Localisation des deux domaines Inra à Avignon

(http://www.paca.inra.fr/le_centre_inra_paca/implantations/sites_principaux)



ANNEXE 2: Principaux virus de Cucurbitacées étudiés dans l'équipe en fonction de leur mode de transmission par les pucerons (*d'après Astier et al. 2001*)

Les virus non persistants

Ces virus sont acquis et transmis par les pucerons lors de brèves piqûres d'essai (servant à goûter la plante). Le puceron perd son potentiel virulifère dès lors qu'il effectue une nouvelle piqûre. Ces virus se trouvent dans l'épiderme des végétaux. Ces virus sont également non circulants : les particules virales restent à l'extrémité du stylet et ne pénètrent pas dans l'insecte.

CMV (Cucumber mosaic virus)

Le CMV a été décrit pour la première fois en 1916 par Doolittle. Il apparaît aujourd'hui comme un des plus importants virus des cultures annuelles dans le monde. Dans le bassin méditerranéen il cause de nombreux dégâts sur tomate, poivron et melon (Galitelli 2000). Il appartient au genre des cucumovirus dans la famille des Bromoviridae. Ces virus possèdent trois brins positifs d'ARN (ARN 1, ARN2, ARN3) et deux brins d'ARN subgénomique (ARN 4 et 4A) (Palukaitis & Garcia-Arenal 2003). Il est transmis sur le mode non persistant par plus de 80 espèces de pucerons (Galitelli 2000).

WMV (Watermelon mosaic virus)

En France le WMV a été isolé pour la première fois en 1974 à partir d'un melon. Il est connu pour être un des virus majeurs de l'infection des Cucurbitacées en climats tempérés ou méditerranéen. C'est un potyvirus de la famille des Potyviridae (virus à ARN simple brin positif). Sur le melon il va provoquer des mosaïques, une déformation des feuilles et une décoloration des fruits (Lecoq et al. 2011).

ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus)

Le ZYMV est observé pour la première fois en Italie en 1973. Actuellement il est présent dans une cinquantaine de pays. C'est un potyvirus de la famille des Potyviridae (virus à ARN simple brin positif). Il est transmis sur le mode non persistant par des pucerons, mais également par les graines. Il va provoquer des mosaïques et une distorsion des feuilles (Desbiez et al. 2002).

Les virus persistants circulants

Ces virus sont acquis lors des piqûres d'alimentation. Dans ce cas le puceron enfonce son stylet profondément dans les tissus jusqu'à atteindre le phloème. Dans ce cas les temps d'acquisition et de transmission sont relativement longs. Le virus effectue un passage dans le corps du puceron avant d'être inoculé, ce dernier peut donc rester virulifère plusieurs heures voire toute sa vie.



CABYV (Cucurbit aphid-borne yellows virus)

Ce virus observé depuis les années 80 est un polérovirus de la famille des Luteoviridae. Il est transmis de manière persistante par les pucerons (*A. gossypii* et *M. persicae* entre autre). Il va provoquer un jaunissement des vieilles feuilles. Il n'altère pas la qualité des fruits cependant il va provoquer une baisse de rendement en raison d'une mauvaise fécondation (Lecoq et al. 1992).



ANNEXE 3 : Choix des espèces de la modalité « bande fleurie »

L'objectif de la modalité « bande fleurie » étant de favoriser le développement de l'entomofaune auxiliaire et particulièrement les insectes prédateurs et parasitoïdes de pucerons, il s'agissait de créer un couvert fleuri hétérogène constitué de plusieurs espèces à la fois non hôtes pour les virus du melon (CABYV, CMV, WMV et ZYMV) et non hôtes pour les pucerons colonisateurs du melon, ceci afin d'éviter de créer un réservoir à virus et/ou à pucerons à proximité de la culture.

Cette modalité a nécessité la conception d'un mélange d'espèces ad hoc permettant de satisfaire à plusieurs conditions :

- 1) des espèces annuelles permettant d'obtenir une floraison précoce contemporaine de la culture du melon
- 2) des espèces présentes dans le Vaucluse
- 3) un approvisionnement en semences facile
- 4) des espèces non hôtes pour les pucerons
- 5) des espèces non hôtes pour les virus du melon

Dans un premier temps, douze espèces remplissant les trois premières conditions ont été présélectionnées : anthémis des champs, bleuet, bourrache, compagnon blanc, chrysanthème des moissons, gesse, marjolaine, nigelle, phacélie, pimprenelle, sainfoin et sarrasin.

Dans un deuxième temps, le comportement de ces douze espèces vis-à-vis des virus et des pucerons a été évalué en conditions contrôlées.

Une série de tests a été réalisée afin d'évaluer le comportement de fuite (antixénose) et le potentiel biotique (fécondité) d'*Aphis gossypii* et de *Myzus persicae*. Pour chacune des douze espèces, dix pucerons adultes (*Aphis gossypii* ou *Myzus persicae*) sont placés par plante sur dix plantes. Les individus présents sur chaque plante sont dénombrés 48 heures après. Si les dix individus sont retrouvés cela signifie que la plante est un hôte convenable pour le puceron. Au contraire, si moins d'individus sont retrouvés, la plante exerce un effet d'antixénose sur le puceron. Après ce premier comptage, les adultes sont enlevés et la descendance se développe pendant une semaine à partir du dépôt des pucerons. Les descendants sont comptés pour connaître le nombre d'individus engendrés par puceron.

Les tests viraux ont portés sur deux souches assez différentes de WMV, deux souches de ZYMV, une souche de CMV et une souche de CABYV. Le CABYV a été transmis par puceron (*Myzus persicae*) tandis que le CMV, le WMV et le ZYMV ont été inoculés mécaniquement à 3-4 plantes par espèce ainsi qu'au ray-grass anglais (utilisé dans la modalité « bande enherbée ») et au melon (témoin). Les tests ont été répétés deux fois. Les virus ont été recherchés par DAS-ELISA.



Dans un troisième temps, les résultats des tests en conditions contrôlées ont été croisés afin de sélectionner les espèces étant non hôtes pour les pucerons et étant le moins infectées par les virus recherchés : bleuet, gesse, marjolaine, pimprenelle et sainfoin.

Dans un quatrième temps, les proportions relatives de chacune des espèces ont été définies en se basant sur l'expertise du grainetier contacté pour l'approvisionnement en semences (Ets Girerd au Thor).



ANNEXE 4 : Informations complémentaires concernant l’itinéraire technique de l’essai Parcel-R.

-Travail du sol

Trois mois avant la plantation (le 07/02/11), un labour est effectué. Trois semaines avant la plantation (les 03/05/11 et 05/05/11), un chisel et une herse rotative sont utilisés pour briser les mottes et ameublir la couche arable (Figure A4-1). Les tuyaux destinés à l’irrigation ainsi que le paillage plastique sont mis en place le 09/05/11 (Figure A4-2).



Figure A4-1 : Travail du sol à l’aide du chisel (a) et de la herse rotative (b)



Figure A4-2 : Mise en place du paillage plastique après l’installation des tuyaux

-Fertilisation

Trois semaines avant la plantation (le 04/05/11), 60 kg d’ammonitrate sous forme de granulés sont apportés à la parcelle, ce qui correspond à 40 unités d’azote par hectare. Le jour de la plantation, 46kg de phosphate monoammonique pour la

parcelle ainsi que 12 unités d'azote et 6 unités de phosphore par hectare sont apportés via l'irrigation.

- Irrigation

Le lendemain de la plantation les melons ont reçu 9,2mm d'eau (durée d'irrigation de 125min avec un débit de 4,4mm/h). Le reste du temps, l'irrigation journalière varie entre 0 à 5,8mm. Le volume d'eau à apporter quotidiennement est déterminé en fonction des précipitations et d'un calcul d'ETP qui prend en compte le stade de la végétation (Figure A4-3).

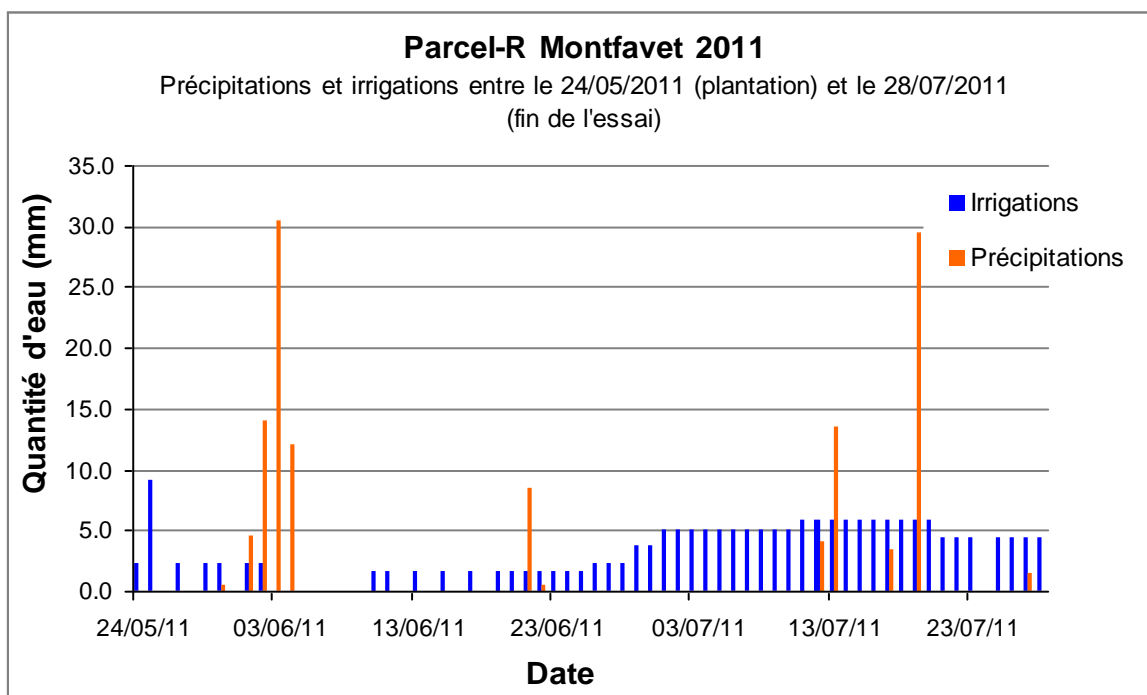


Figure A4-3 : Précipitations et irrigations entre le 24/05/11 et le 28/07/11

-Traitements phytosanitaires

Sur les melons S et R, un premier traitement contre l'oïdium et le mildiou est réalisé le 09/07/11 avec le produit ORTIVA (Syngenta, 0,8mL/L). Un deuxième traitement ciblant uniquement l'oïdium est réalisé le 13/07/11 avec SYSTHANE NEW (Dow Agrosience, 1,66mL/L). Un troisième traitement est réalisé le 18/07/11 avec SYSTHANE NEW (1,66mL/L) contre l'oïdium et FOLIOGOLD (Syngenta, 2 mL/L) contre le mildiou.

Sur les bandes enherbées, un traitement contre la rouille est réalisé le 28/06/11 avec HORIZON ARBO (Bayer, 1g/L).



ANNEXE 5 : Caractères morphologiques des pucerons

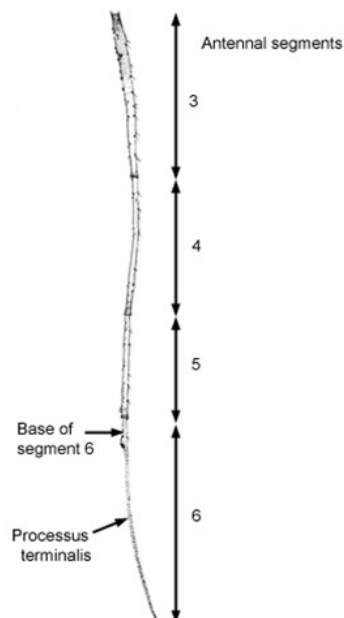
Le corps d'un puceron est composé de trois parties présentes chez tous les insectes : tête, thorax, abdomen (Figure A5-1).



Figure A5-1 : Schéma d'un puceron ailé

(<http://www.alyon.org/InfosTechniques/biomedical/biologie/animale/insectes>)

Un puceron se reconnaît au dernier article antennaire. Celui-ci se compose de deux parties : une plus épaisse à la base suivie par une zone amincie : le processus terminalis (Figure A5-2).

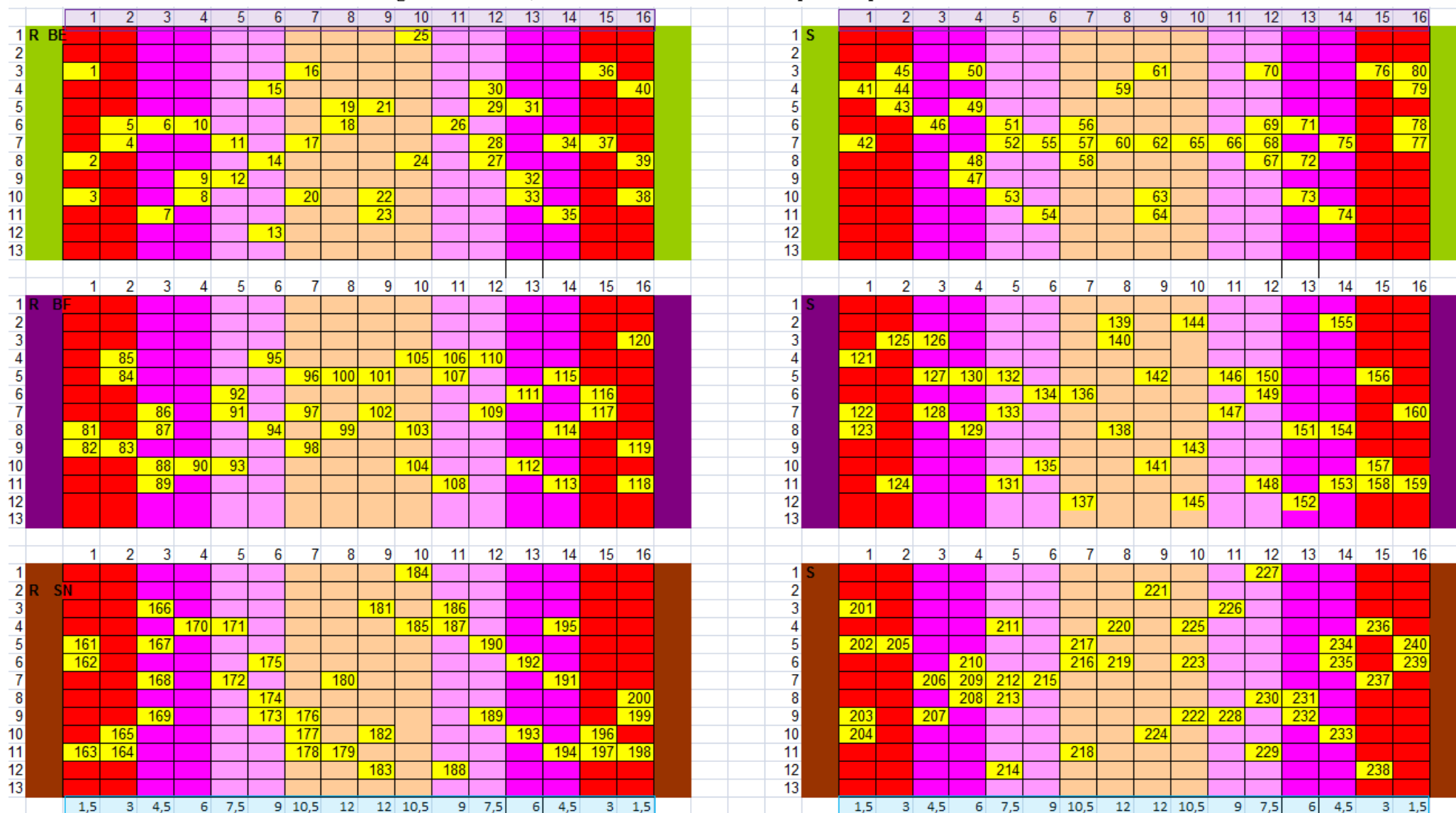


(modified from Eastop 1966)

Figure A5-2 : Schéma détaillé d'une antenne de puceron

(<http://www1.dpi.nsw.gov.au/keys/aphid/aphid.htm>)

ANNEXE 6 : Plan d'échantillonnage de Parcel-R, déterminé aléatoirement : 5 plantes par zone de distance à la bande



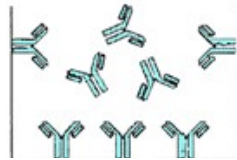
Distance à la bande (m)



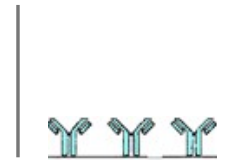
ANNEXE 7: Schéma présentant les différentes étapes du test DAS-ELISA (<http://www.srpv-midi-pyrenees.com>)



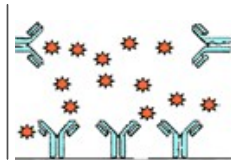
Puits d'une plaque ELISA.



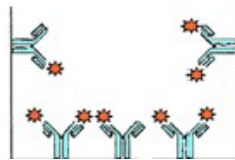
Dépôt des anticorps de fixation dilués dans un tampon de fixation.



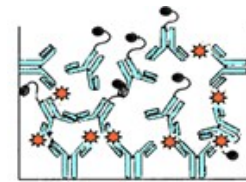
Lavages : élimination des anticorps non fixés aux parois du puits.



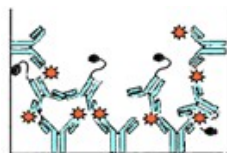
Dépôt des échantillons (contient les particules virales).



Lavages : élimination de tout ce qui n'a pas été retenu par les anticorps.



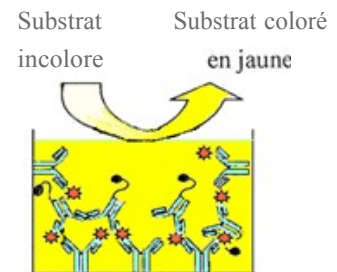
Dépôt des anticorps conjugués dilués dans un tampon et couplés à une enzyme (phosphatase alcaline).



Lavages : élimination des anticorps non fixés.



Dépôt de la solution de substrat



Coloration du substrat en jaune en présence de la phosphatase alcaline.

Y Anticorps de fixation

Q Particule virale (porteuse d'antigènes)

Â Anticorps conjugué couplé à la phosphatase alcaline

Sd'l'érna SRPV Aquitaine



Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon de Cellier Cynthia est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

ANNEXE 8 : Composition des différents tampons utilisés lors du test DAS-ELISA

Tampon de broyage

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	10,74g
DIECA	2g
Eau distillée (qsp)	1L

Tampon de fixation des anticorps

Na ₂ CO ₃	1,6g
NaHCO ₃	3g
Eau distillée (qsp)	1L

Tampon de rinçage : PBS tween

NaCl	8g	
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	2,9g	
KCl	0,2g	
KH ₂ PO ₄	0,2g	
Tween 20	500μL	
Eau distillée (qsp)	1L	pH = 7,4

Tampon de dilution du conjugué

NaCl	8g	
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	2,9g	
KCl	0,2g	
KH ₂ PO ₄	0,2g	
NaN ₃	0,2g	
Eau distillée	950 mL	
Tween 20	500μL	
Mettre sous agitation		pH = 7,45

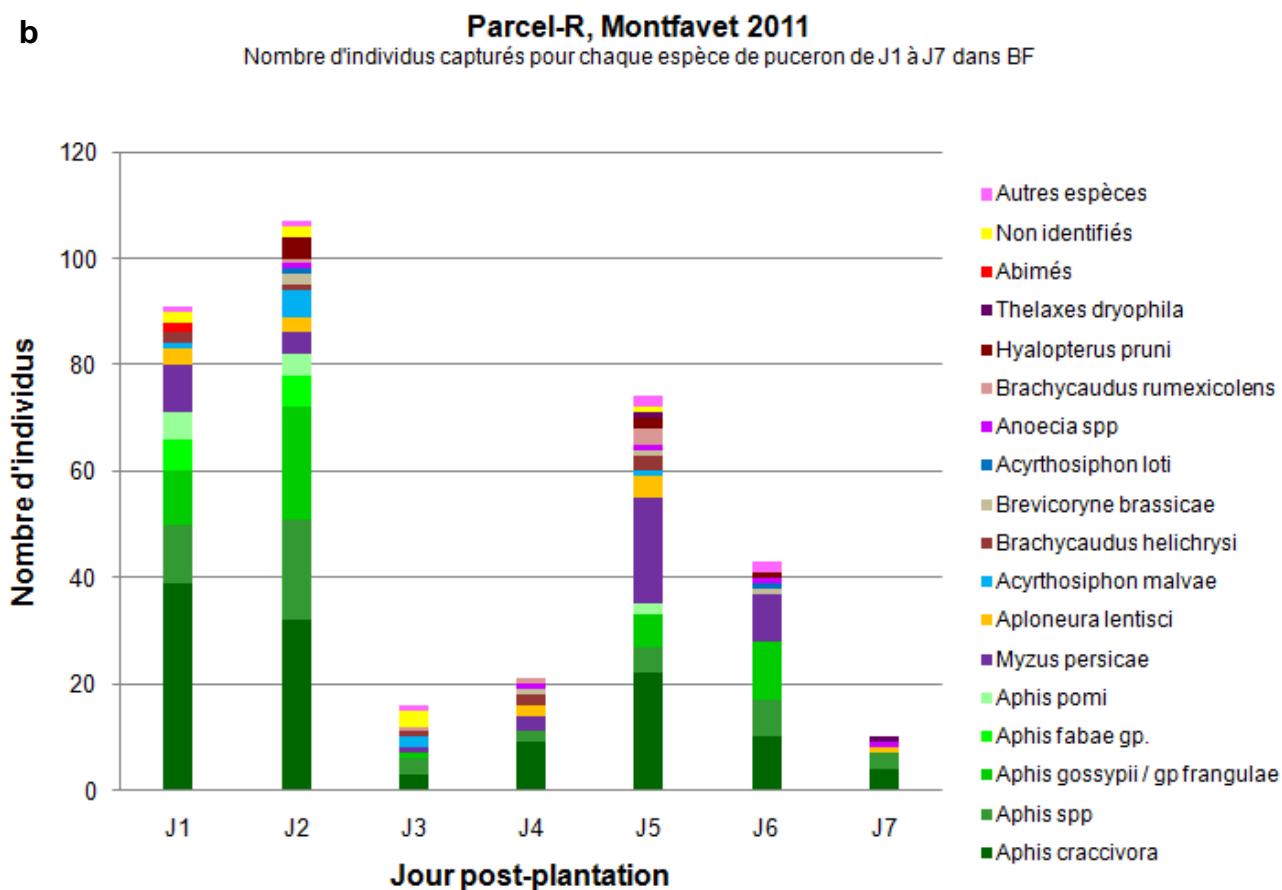
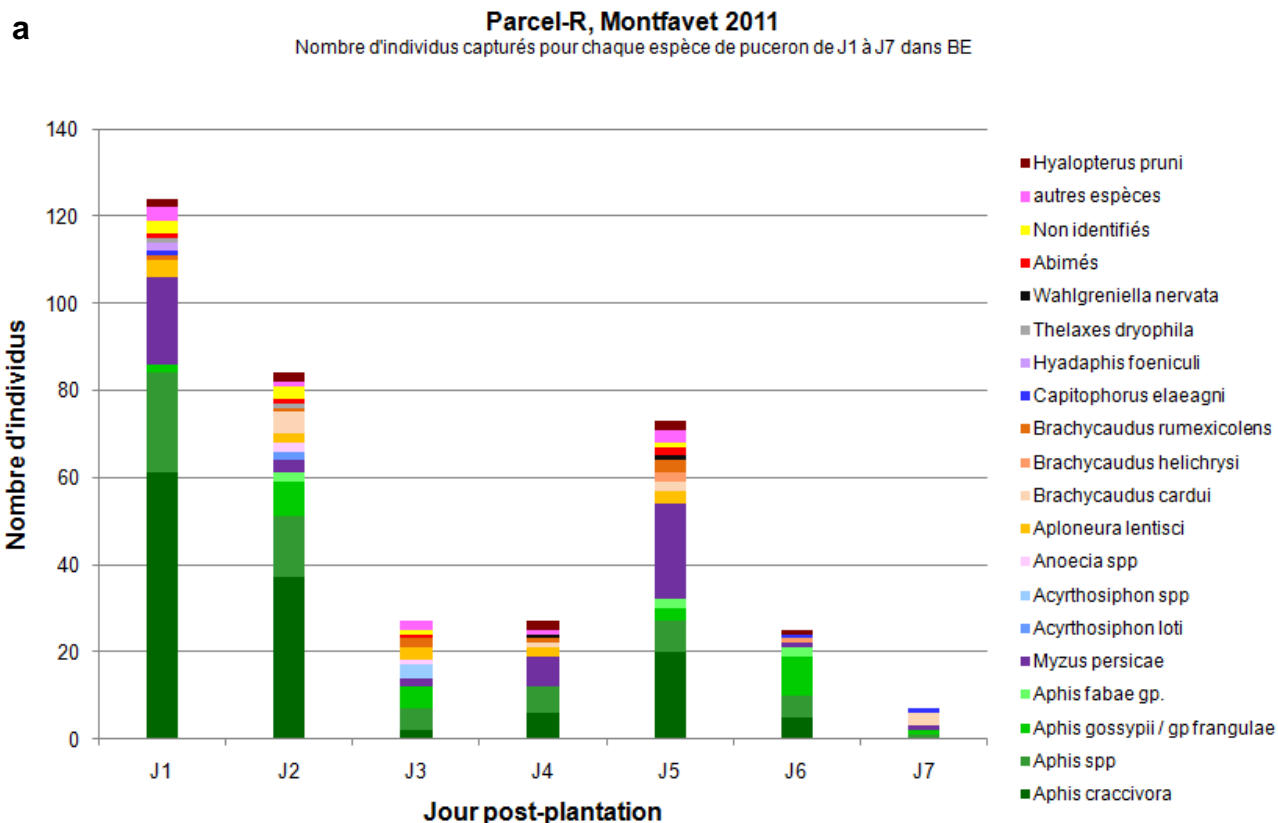
PVP	20g
Ovalbumine	2g
Vérifier que 7,1 < pH < 7,5 et ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée	

Tampon de dissolution du substrat

Eau distillée	800mL
Diéthanolamine	97mL
Amener à pH = 9,8 avec HCl fumant et ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée	



ANNEXE 9: Nombre d'individus capturés par espèce de J1 à J7 dans la modalité a) bande enherbée, b) bande fleurie et c) sol nu

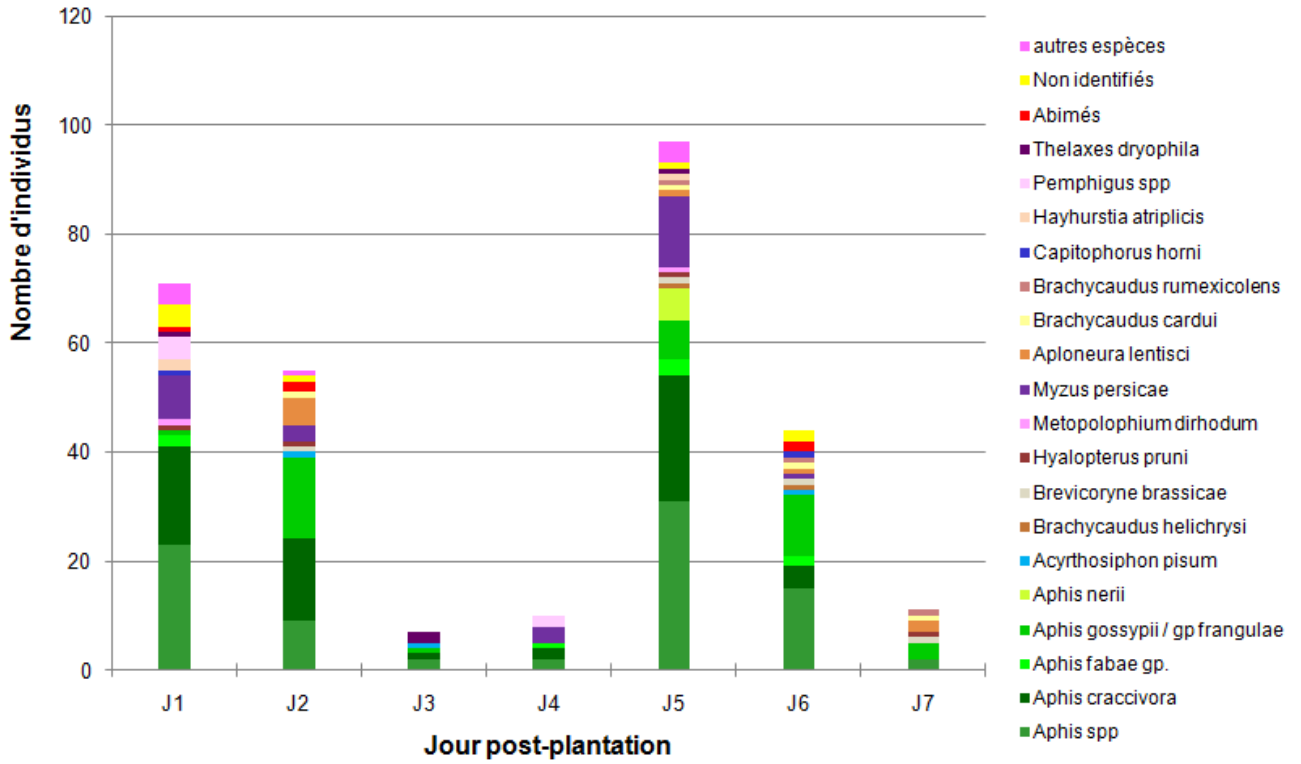


Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon de Cellier Cynthia est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

c

Parcel-R, Montfavet 2011

Nombre d'individus capturés pour chaque espèce de puceron de J1 à J7 dans SN



Effet de l'aménagement parcellaire sur l'efficacité d'une résistance génétique : cas du gène Vat du melon de Cellier Cynthia est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Résumé

Le gène *Vat* (Virus aphid transmission) confère au melon une résistance à la colonisation par le puceron *Aphis gossypii* et aux virus transmis par ce dernier. Il est toutefois inefficace pour bloquer la transmission des virus porté par les autres espèces de pucerons. L'utilisation de *Vat* est donc généralement couplée à des traitements aphicides. Mais l'évolution de la réglementation en matière de produits phytosanitaires incite à concevoir des stratégies plus respectueuses de l'environnement permettant d'abaisser la taille de la population aphidienne afin de limiter les épidémies virales tout en réduisant le risque de contournement de la résistance. L'hypothèse testée est que l'implantation de bandes de plantes non hôtes (enherbées ou fleuries) à la périphérie de la culture permet de renforcer l'efficacité du gène *Vat*. L'effet de ces deux facteurs est variable selon les virus. La présence de *Vat* permet de retarder l'initiation et la progression du CMV (Cucumber mosaic virus) démontrant l'implication majeure de l'espèce *Aphis gossypii* dans l'épidémie de ce virus. Elle a un effet moins marqué sur les épidémies de CABYV (Cucurbit aphid-borne yellows virus), de WMV (Watermelon mosaic virus) et de ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) suggérant l'implication d'autres espèces aphidiennes dans la transmission de ces virus. Pour le CMV et le ZYMV, la présence de bandes fleuries renforce l'effet de *Vat* soit en réduisant le nombre de pucerons ailés visitant la parcelle via le développement des ennemis naturels, soit en réduisant le potentiel virulifère des pucerons lors de leur passage sur les bandes.

Mots-clés : aménagement parcellaire, *Aphis gossypii*, *Cucumis melo*, protection intégrée, *Vat*

Abstract

The *Vat* (Virus aphid transmission) gene confers to the melon a resistance to the colonization by the *Aphis gossypii* and to the viruses transmitted by this aphid species. It is however ineffective to block the transmission of the viruses carried by the other aphid species. The use of *Vat* is thus generally coupled with aphicid treatments. But the evolution of the regulation of phytosanitary products imposes to conceive environment-friendlier strategies allowing to lower the size of the aphid population to limit the viral epidemics while reducing the risk of bypassing of the resistance. The tested hypothesis is that the management of field margins (strips sown with non host grass or flower mixtures) could strengthen the efficiency of *Vat*. The effect of these two factors is variable according to the viruses. The presence of *Vat* allows to delay the initiation and the progress of CMV (Cucumber mosaic virus) demonstrating the major implication of *Aphis gossypii* in the epidemic of this virus. It has a less marked effect on the epidemics of CABYV (Cucurbit aphid-limits yellows virus), of WMV (Watermelon mosaic virus) and of ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) suggesting the implication of the other aphid species in the transmission of these viruses. For CMV and ZYMV, the presence of flower strips strengthens the effect of *Vat* either by reducing the number of winged aphids visiting the crop (development of natural enemies), or by reducing the viral load of the aphids during their passage on the strips.

Key-words: *Aphis gossypii*, *Cucumis melo*, field margins, integrated pest management, *Vat*