



Développement d'un outil de lutte biologique basé sur l'utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar*, et évaluation de son impact sur les ravageurs et entomophages présent dans les vergers

Rapport final

Bruno Fréchette

Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel

Mars 2009

Ce rapport final est une adaptation des textes des rapports d'étapes rédigés par Claude Guertin (2006, 2007, INRS-IAF) et par Jamal Ziani (2008, CRAM).

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à la participation financière des partenaires suivants :

- INRS-Institut Armand-Frappier
- Laboratoire d'entomologie du Réseau-pommier, IRDA
- Développement économique Canada (DEC) pour les régions du Québec de Laval-Laurentides-Lanaudière
- Ministère du développement économique, de l'innovation et de l'exportation (MDEIE), direction de la valorisation et du transfert
- Conférence régionale des élus (CRÉ) des Laurentides
- Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), direction régionale Outaouais-Laurentides, secteur Laurentides
- Syndicat des producteurs de pommes des Laurentides
- Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ)
- Société des établissements de plein air du Québec (SEPAQ)

Ce travail a été rendu possible grâce à l'importante implication des chercheurs Claude Guertin (Ph.D.) de l'INRS-Institut Armand-Frappier et Daniel Cormier (Ph.D.) du laboratoire d'entomologie du Réseau-pommier de l'IRDA. Les personnes suivantes ont aussi collaborer de près à ce travail : Denis Bouchard, Stefano Campagnaro, Karine Dubé, Étienne Jobin, Steve Lamothe, Rachid Sabahi et Jamal Ziani.

Résumé

Dans l'est de l'Amérique du Nord, le charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), est un ravageur important des fruits à noyaux et à pépins. Au Québec, ce ravageur cause des dommages particulièrement importants dans les vergers de pommiers où 90% des fruits peuvent être endommagés en absence de contrôle phytosanitaire. Actuellement, les populations de charançon de la prune sont essentiellement contrôlées à l'aide d'insecticides chimiques. L'objectif général de ce projet était donc d'évaluer l'utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin comme outil de lutte contre le charançon de la prune. *Beauveria bassiana* est un agent de lutte biologique naturellement présent dans les écosystèmes et sécuritaire pour l'être humain.

L'étude, qui a porté sur trois ans, comportait trois volets. Au cours du premier volet, deux isolats de *B. bassiana* (*INRS-CFL* et *INRS-IP*) ont été évalués en laboratoire pour leur effet insecticide contre deux générations de charançon de la prune (printemps et été). L'impact de ces souches a également été évalué sur un insecte entomophage utile, soit la coccinelle maculée, *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae). Les résultats ont démontré que les deux souches ont la même virulence (i.e. infectent et tuent les charançons à la même vitesse), mais que la pathogénicité de la souche *INRS-CFL* est supérieure à celle de la souche *INRS-IP* (i.e. moins de conidies sont requises pour infecter les individus). Les résultats indiquent aussi que les souches *INRS-CFL* et *INRS-IP* sont inoffensives pour la coccinelle maculée et n'augmentent pas significativement la mortalité des adultes.

L'objectif du deuxième volet était d'évaluer l'efficacité de *B. bassiana* contre le charançon de la prune en conditions semi-contrôlées en verger. Aucune diminution de dommages liée au charançon de la prune n'a été observée en présence de *B. bassiana* au cours de cette expérience. Ce résultat pourrait s'expliquer en partie par des contraintes expérimentales liées à l'inadéquation entre les exigences du projet de recherche et les besoins agronomiques du producteur. Aussi, l'application foliaire d'une formulation de *B. bassiana* expose le champignon à des conditions défavorables et, donc, exigerait l'apport d'adjuvants pour faciliter la survie et la germination de ce dernier.

Au cours du troisième volet, en plus de mesurer à nouveau l'impact des applications foliaires de *B. bassiana* contre le charançon de la prune en conditions semi-contrôlées, des applications au sol de *B. bassiana* ont aussi été mesurées. Aussi, des adjuvants ont été ajoutés à la formulation de *B. bassiana* afin d'augmenter la survie et la germination des conidies. Les résultats indiquent que l'application foliaire de *B. bassiana* durant la période de ponte des femelles de *C. nenuphar* ne semble pas offrir les conditions propices à l'utilisation de cet agent de lutte. Par contre, lorsque *B. bassiana* est appliqué au sol, la mortalité du charançon de la prune est

significativement plus élevée dans les sites traités que dans les témoins. Aussi, une prolifération plus importante de *B. bassiana* est observée chez les charançons exposés aux préparations de *B. bassiana*.

Ces résultats indiquent donc que *B. bassiana* est un agent de lutte biologique prometteur contre le charançon de la prune, particulièrement si les traitements sont appliqués au sol contre les adultes sortant d'hibernation. Cependant, afin d'obtenir un résultat satisfaisant, de multiples applications de *B. bassiana* devraient être effectuées tout au long de la période d'activité des adultes au sol (laquelle s'étend sur une période de 3 à 4 semaines).

Table des matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
Introduction.....	11
Le charançon de la prune.....	11
La lutte biologique à l'aide de champignons entomopathogènes.....	12
Objectifs.....	14
Volet 1 (année 2006).....	14
Méthodologie.....	14
Matériel biologique.....	14
Criblage des isolats.....	15
Pathogénicité des isolats INRS-CFL et INRS-IP chez le charançon de la prune.....	15
Analyses statistiques.....	15
Résultats et discussion.....	16
Criblage des isolats.....	16
Pathogénicité des isolats INRS-CFL et INRS-IP chez le charançon de la prune.....	16
Volet 2 (année 2007).....	17
Méthodologie.....	17
Sites expérimentaux.....	17
Matériel biologique.....	17
Dispositif expérimental.....	18
Prise de données.....	19
Suivi journalier des charançons.....	20
Analyses statistiques.....	20
Résultats.....	21
Échantillonnages - Mortalité des charançons.....	21
Échantillonnages - Nombre de pommettes détachées.....	21
Échantillonnages - Nombre de trous d'alimentation.....	21
Échantillonnages - Nombre de trous de ponte.....	22
Échantillonnages - Nombre de larves et taux de mortalité.....	23
Échantillonnages - Indice de dommages aux pommettes.....	23
Suivi journalier – Mortalité des insectes et devenir des insectes vivants.....	23
Suivi journalier – Nombre de trous d'alimentation.....	24
Suivi journalier – Nombre de trous de ponte.....	24
Suivi journalier – Nombre de larves et taux de mortalité.....	24
Suivi journalier – Indice de dommages aux pommettes.....	24
Discussion.....	24
Volet 3 (année 2008).....	26
Méthodologie.....	26
Sites expérimentaux.....	26
Matériel biologique.....	26
Dispositif expérimental.....	27
Applications foliaires.....	27

Applications au sol.....	27
Application des traitements.....	28
Prise de données.....	28
Analyses statistiques.....	29
Résultats.....	29
Applications foliaires – Effet insecticide de Beauveria bassiana.....	29
Applications foliaires – Nombre de trous de ponte.....	30
Applications foliaires – Nombre de trous d'alimentation.....	31
Applications foliaires – Suivi de l'infection par Beauveria bassiana.....	32
Applications au sol – Effet insecticide de Beauveria bassiana.....	32
Applications au sol – Nombre de trous de ponte.....	33
Applications au sol – Nombre de trous d'alimentation.....	34
Applications au sol – Suivi de l'infection par Beauveria bassiana.....	34
Discussion.....	35
Conclusion.....	36
Bibliographie.....	37

Liste des figures

Figure 1: Adulte du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar*. Les caractéristiques représentatives sont : A) une série de bosses portées par chaque élytre, B) une bande claire transversale sur les élytres et C) un rostre large et court portant les antennes. Photographie INRS-IAF (2007).

Figure 2: Cicatrices en forme de demi-lune associées à la ponte des charançons. Photo tirée de *Common Tree Fruit Pests*, d'Angus J. Howitt (1993).

Figure 3: Photographie au microscope de *Beauveria bassiana* (Mycologie online, 2007).

Figure 4. Différents stades de développement de la muscardine de *Beauveria bassiana* sur un cadavre de charançon de la prune (INRS-IAF, 2007).

Figure 5. Photographie du dispositif expérimental du verger d'Oka où chaque arbre représente un bloc (INRS-IAF, 2007).

Figure 6. Représentation schématique de la disposition des blocs en fonction des cinq points cardinaux au verger de Saint-Bruno-de-Montarville.

Figure 7. Application de solutions à base de *Beauveria bassiana* dans des manchons (INRS-IAF, 2007)

Figure 8. Nombre de femelles mortes (N_F) (I), de pommets détachés ($N_{pom.}$) (II) et de trous d'alimentation ($N_{alim.}$) (III) observés par traitement et par journée d'échantillonnage pour les vergers d'Oka (a) et de Saint-Bruno-de-Montarville (b). T = témoin, T7 = 10^7 conidies/ml, T9 = 10^9 conidies/ml.

Figure 9. Nombre de trous de ponte (N_{ponte}) (I), de larves (N_L) (II) et indice des dommages des pommets (I_{Dom}) (III) observés par traitement et par journée d'échantillonnage pour les vergers d'Oka (1) et de Saint-Bruno-de-Montarville (b). T = témoin, T7 = 10^7 conidies/ml, T9 = 10^9 conidies/ml.

Figure 10. Unité expérimentale représentée par un pot de plastique enfoncé dans le sol. Photographie INRS-IAF (2008).

Figure 11. Activité insecticide de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les femelles (A, B) et les mâles (C, D) de charançon de la prune lors d'applications foliaires aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Figure 12. Nombres de trous de ponte (A, B) et de trous d'alimentation (C, D) associés aux différents traitements foliaires de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Figure 13. Activité insecticide de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les femelles (A, B) et les mâles (C, D) de charançon de la prune lors d'applications au sol aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Figure 14. Nombres de trous de ponte (A, B) et de trous d'alimentation (C, D) associés aux différents traitements au sol de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Liste des tableaux

Tableau 1. Estimation des concentrations létales chez les adultes des deux cohortes de charançon de la prune soumis aux isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *Beauveria bassiana*.

Tableau 2. Taux de développement de muscardine sur les cadavres des femelles (T_F) et des mâles (T_M) du charançon de la prune en fonction des traitements foliaires suivants : T1 = *B. bassiana* sans formulation, T2 = *B. bassiana* avec formulation, T3 = témoin, avec formulation, T4 = témoin sec, sans formulation (non traité).

Tableau 3. Taux de développement de muscardine sur les cadavres des femelles (T_F) et des mâles (T_M) du charançon de la prune en fonction des traitements au sol suivants : T1 = *B. bassiana* sans formulation, T2 = *B. bassiana* avec formulation, T3 = témoin, avec formulation, T4 = témoin sec, sans formulation (non traité).

Introduction

La culture de la pomme constitue la plus importante production fruitière au Québec. À titre d'exemple, 87 775 tonnes métriques de pommes ont été mises en marché en 2006 dans cette province (FFPQ, 2008). Cependant, la pression des insectes ravageurs est forte dans les pommiers du Nord-Est de l'Amérique du Nord. La pommiculture requiert donc un important programme de phytoprotection dans cette région et figure parmi les cultures exigeant les plus grandes quantités de pesticides par unité de surface.

Le charançon de la prune

Le charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera : Curculionidae) (Fig. 1), est un des principaux ravageurs de la pomme au Québec (Chouinard et al. 2001). En absence de traitements phytosanitaires, les dommages causés par cet insecte peuvent entraîner le déclassement de plus de 85% des pommes (Vincent et Roy 1992).

Au Québec, le charançon de la prune est une espèce univoltine (i.e. il n'y a qu'une seule génération par année) (Racette et al. 1992). Les adultes sortent d'hibernation au printemps et migrent vers les vergers à partir du moment de la floraison des pommiers (Paradis 1956). Après l'accouplement, les femelles pondent leurs œufs sous l'épicarpe des jeunes fruits, lorsque ceux-ci atteignent 6 mm de diamètre (Boulé et al. 1997). Cette ponte laisse une cicatrice caractéristique en forme de demi-lune sur les fruits (Fig. 2). Quelques jours plus tard (de 3 à 12 jours), les œufs éclosent et les larves se nourrissent de la chair du fruit et de ses pépins. Les larves causent ainsi des dommages internes aux fruits. Aussi, la sécrétion d'enzymes par ces larves entraînerait l'abscission prématurée de la majorité des fruits infectés (Levine & Hall 1978). De 2 à 3 semaines après l'éclosion, les larves quittent le fruit et vont s'enfouir dans le sol (environ 3 cm de profondeur) où elles se transformeront en pupes. Les adultes de la nouvelle génération sortent ensuite de ces pupes au mois d'août (Boulé et al. 1997). Ces adultes endommagent à leur tour les fruits en y enfonçant leur rostre pour s'y nourrir. Ils provoquent ainsi des dommages circulaires à travers l'épicarpe, généralement à côté du pédoncule. Ces adultes demeurent dans le verger jusqu'à la fin de la saison, après quoi ils migrent vers des boisés d'arbres feuillus à la recherche d'un site d'hibernation.

Les dommages les plus importants sont causés par la ponte des femelles. Chaque femelle peut pondre jusqu'à 200 fois en quelques semaines. Les adultes étant peu mobiles, les dommages sont souvent concentrés dans certains secteurs du vergers, voir dans certains arbres.

La lutte biologique à l'aide de champignons entomopathogènes

Actuellement, les populations de charançon de la prune sont essentiellement contrôlées à l'aide d'insecticides chimiques. Or, l'utilisation d'insecticides chimiques soulève de plus en plus de préoccupations pour l'environnement et la santé publique. Il est donc important de développer des moyens alternatifs pour lutter contre le charançon de la prune. Les insecticides biologiques, comme le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina : Hyphomycetes), constituent une telle alternative (Fig. 3).

Beauveria bassiana est un champignon microscopique et cosmopolite. Ce champignon infecte et tue les insectes, tout en étant inoffensif pour les humains et autres vertébrés. Les insectes sont infectés par contact avec les conidies (spores) du champignon, lesquelles produisent ensuite des hyphes (cellules en forme de filament ramifiés) et pénètrent la cuticule des insectes grâce à des enzymes de dégradation. Lorsque les mécanismes immunitaires de l'insecte n'arrivent pas à combattre le champignon, ce dernier envahit l'hémolymphe (sang) de l'insecte et l'infection se produit. S'ensuit une phase dite saprophyte, caractérisée par la momification de l'insecte, alors transformé en sclérote (forme de conservation du champignon). Les hyphes traversent ensuite le tégument de l'insecte, puis le recouvre muscardine (feutrage mycélien cotonneux et blanc) (Fig. 4).

Il est facile et relativement peu coûteux de maintenir et de reproduire plusieurs souches de *B. bassiana* en laboratoire. Aussi, des solutions contenant des conidies de *B. bassiana* peuvent facilement être appliquées au champ d'une façon similaire à l'application d'insecticides. Pour cette raison, l'utilisation de *B. bassiana* comme insecticide biologique représente une alternative potentielle aux insecticides chimiques.

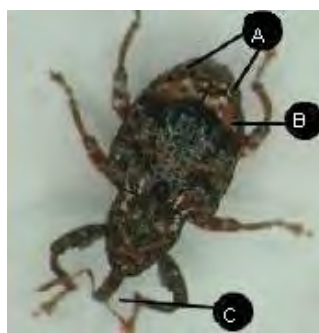


Figure 1. Adulte du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar*. Les caractéristiques représentatives sont : A) une série de bosses portées par chaque élytre, B) une bande claire transversale sur les élytres et C) un rostre large et court portant les antennes. Photographie INRS-IAF (2007).



Figure 2. Cicatrices en forme de demi-lune associées à la ponte des charançons. Photo tirée de *Common Tree Fruit Pests*, d'Angus J. Howitt (1993).



Figure 3. Photographie au microscope de *Beauveria bassiana* (Mycologie online, 2007).

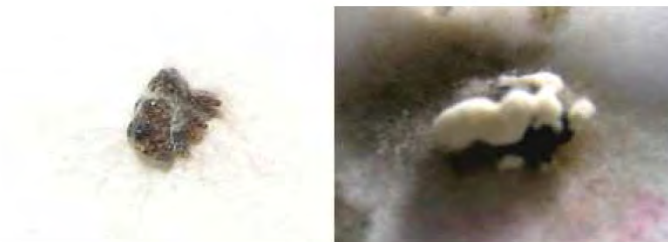


Figure 4. Différents stades de développement de la muscardine de *Beauveria bassiana* sur un cadavre de charançon de la prune (INRS-IAF, 2007).

Objectifs

L'objectif général du présent projet était donc d'étudier l'utilisation potentielle de *B. bassiana* pour lutter contre le charançon de la prune en vergers de pommiers. Plus précisément, les objectifs spécifiques du projet étaient (1) d'identifier un isolat de *B. bassiana* à forte virulence et pathogénicité contre le charançon de la prune et à faible pathogénicité contre les insectes bénéfiques et (2) d'évaluer l'impact des applications de *B. bassiana* en conditions semi-contrôlées sur les populations de charançons de la prune et sur les dommages infligés par ceux-ci.

Volet 1 (année 2006)

Méthodologie

Matériel biologique

Les charançons de la prune utilisés au cours de cette expérience ont été prélevés au printemps (par une technique de battage) et à la fin du mois de juillet (récolte de pommettes infestées). La grande partie de cet échantillonnage s'est effectuée dans la région de Deux-Montagnes (Laurentides), bien que quelques individus aient été prélevés sur la Rive-Sud de Montréal (Montréal). Les charançons ont été maintenus en cages ou dans les pommettes (20°Cm, 70% RH, 16L:8D) jusqu'à leur utilisation subséquente.

À l'automne, des adultes de la coccinelle maculée, *Coleomegilla maculata lengi* (Timberlake) ont été prélevés dans un site d'hibernation situé près de Saint-Hyacinthe (Montréal). Maintenu à 5°C, ils ont ensuite été placés à 25°C (70% RH, 16L:8D) pendant 24 heures avant le début des essais.

Les expériences ont été effectuées avec les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana*, lesquels provenaient de la banque de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Ces isolats sont reconnus pour leur pathogénicité contre différentes espèces de charançons. En outre, l'isolat *INRS-CFL* a pour particularité d'être indigène au Québec. Ces isolats ont été cultivés sur un milieu nutritif Sabouraud (10% néopeptone, 40% glucose, 15% Agar, pH 5,6) à 24°C, 80% RH. Ils ont ensuite été utilisés pour la fermentation sur un milieu solide (à base de céréale) afin de produire des conidies. Cette production s'est effectuée dans des sacs à mycélium comprenant 50g de substrat, 20ml d'eau distillée et 10ml d'une suspension fongique de 1×10^6 conidies/ml, le tout conservé 16 jours à 25°C, 60% RH. Les conidies sont ensuite prélevées en ajoutant 100ml d'une solution de Tween 80 (0,1%) à chacun des sacs, en agitant ces derniers, puis en filtrant la suspension de conidies ainsi générée.

Criblage des isolats

Cette expérience visait à déterminer l'effet de différentes souches de *B. bassiana* sur la coccinelle maculée (insecte entomophage). Le criblage des isolats devait aussi être effectué sur le charançon de la prune, mais trop peu d'individus ont été récoltés au cours de la saison pour effectuer le criblage des isolats sur cette espèce. Seize isolats ont été testés sur la coccinelle maculée. Pour chaque isolat, 20 adultes ont été immergés individuellement dans une suspension contenant 1×10^7 conidies/ml pendant 5 secondes (Butt et al. 1994). Par la suite, les insectes ont été déposés individuellement sur des papiers filtres humides se trouvant dans des boîtes de Pétri et placés dans une chambre environnementale (25°C, 70% RH, 16:8 L:D). La mortalité a été suivie quotidiennement pendant 14 jours. L'expérience a été répétée 3 fois par isolat. Un classement des isolats a été effectué en fonction du pourcentage de mortalité observé.

Pathogénicité des isolats INRS-CFL et INRS-IP chez le charançon de la prune

Cette expérience avait pour objectif de mesurer le potentiel insecticide des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* contre le charançon de la prune. Pour chaque cohorte (printanière et estivale), les charançons récoltés sur les différents sites ont été regroupés afin de réduire l'effet possible de l'origine des insectes sur la réponse mesurée. Pour chaque isolat de *B. bassiana*, des adultes charançons ont été soumis à des concentrations de 0, 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 conidies/ml afin de déterminer les concentrations létales (CL_{10} , CL_{50} et CL_{90}). Pour chaque concentration, 30 individus ont été soumis à la préparation de *B. bassiana*. La mortalité a été notée aux 48 heures pendant 14 jours. Chaque expérience a été répétée cinq fois, pour un total de 1 500 charançons testés.

L'inoculation a été réalisée par contact direct en immergeant les insectes dans 10ml d'une suspension de conidies pendant cinq secondes (Butt et al. 1994). Les insectes des groupes témoins ont été immergés dans une solution stérile sans conidie. Les charançons ont ensuite été transférés dans des boîtes de Pétri, lesquelles contenaient un papier filtre humidifié avec 0,5ml d'eau distillée. Les boîtes ont ensuite été placées à 25°C, 70% RH, 16:8 L:D.

Le taux moyen de survie (TMS) a été déterminé pour chaque isolat et chaque cohorte de charançons à partir de la valeur de la CL_{50} . La méthode d'immersion a été utilisée. La mortalité a été enregistrée quotidiennement pendant 14 jours.

Analyses statistiques

Les analyses de probabilité (*Probit procedure*) et les analyses de taux de survie (*Lifereg procedure*) ont été réalisées à l'aide de SAS, version 9,1 (SAS Institute, USA). Pour l'expérience portant sur le criblage, le

pourcentage de mortalité a été corrigé en fonction des témoins en appliquant la formule d'Abbott (1925).

Résultats et discussion

Criblage des isolats

Parmi les 16 isolats testés, trois (*ARSEF2991*, *ARSEF2988* et *ARSEF1395*) ont eu un effet significatif direct sur la mortalité des coccinelles (Fig 4). Les 13 autres isolats, dont *INRS-CFL* et *INRS-IP*, occasionnent des taux de mortalité inférieurs à 10% et peuvent donc être considérés comme inoffensifs. Aucune différence significative est observée entre ces 13 isolats inoffensifs.

Pathogénicité des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* chez le charançon de la prune

L'estimation des concentrations létales pour les charançons des deux cohortes (printanière et estivale) est présentée au Tableau 1. Aussi bien au sein de la cohorte printanière que de l'estival, une différence significative est observée entre les valeurs de concentrations létales obtenues avec les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* ($P < 0,05$). Dans les deux cas, l'isolat *INRS-CFL* possède un titre insecticide plus important puisque la concentration de conidies requise pour obtenir un niveau de mortalité équivalent est moindre que pour l'isolat *INRS-IP*. Les valeurs obtenues pour les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* sont les mêmes pour les cohortes printanière et estivale.

Tableau 1. Estimation des concentrations létales chez les adultes des deux cohortes de charançon de la prune soumis aux isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *Beauveria bassiana*.

Cohorte	Isolat	Concentration létale	Valeur	Intervalles de confiance (95%)	
				Limite inférieure	Limite supérieure
Printanière	<i>INRS-CFL</i>	CL ₅₀	2,00 x 10 ⁷	6,20 x 10 ⁶	5,62 x 10 ⁷
		CL ₉₀	1,32 x 10 ¹¹	2,26 x 10 ¹⁰	1,99 x 10 ¹²
	<i>INRS-IP</i>	CL ₅₀	7,22 x 10 ⁷	2,21 x 10 ⁷	2,28 x 10 ⁸
		CL ₉₀	1,25 x 10 ¹²	1,39 x 10 ¹¹	4,36 x 10 ¹³
Estivale	<i>INRS-CFL</i>	CL ₅₀	7,24 x 10 ⁴	6,99 x 10 ³	3,09 x 10 ⁵
		CL ₉₀	1,63 x 10 ⁸	4,76 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁹
	<i>INRS-IP</i>	CL ₅₀	1,03 x 10 ⁵	1,25 x 10 ⁴	3,91 x 10 ⁵
		CL ₉₀	1,63 x 10 ⁸	4,93 x 10 ⁷	9,65 x 10 ⁸

Par contre, pour les deux cohortes, les taux moyens de survie des charançons soumis aux isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* ne montrent pas de différences significatives (Tab. X; $P > 0,05$). Ce résultat suggère que la virulence des deux isolats est similaire (i.e. la rapidité avec laquelle les charançons infectés meurent est la même pour les deux isolats).

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ces expériences de laboratoire ont démontré le fort potentiel des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana* pour son utilisation contre le charançon de la prune. Aussi, ils ont démontré le faible impact qu'aurait ces isolats sur la coccinelle maculée. Finalement, ils indiquent que les deux isolats ont une virulence similaire, mais que *INRS-CFL* possède un titre insecticide plus important.

Volet 2 (année 2007)

Méthodologie

Sites expérimentaux

Les expériences ont été effectuées sur 10 pommiers *Malus domestica* Borkh. n'ayant subi aucun traitement phytosanitaire. Cinq de ces pommiers (*M. domestica* cv. *Cortland*) étaient situés dans un verger situé à Oka (Laurentides), alors que les 5 autres (*M. domestica* cv. *McIntosh*,) se trouvaient dans un verger de Saint-Bruno-de-Montarville (Montérégie). Les pratiques phytosanitaires des deux sites étaient basées sur l'utilisation de pesticides chimiques.

Matériel biologique

Les charançons de la prune ont été prélevés par battage au début du mois de juin dans une section abandonnée (sans traitements phytosanitaires) d'un verger d'Oka avant d'être rapportés au laboratoire de l'IRDA (Saint-Hyacinthe). Le sexe des individus a été déterminé selon la méthodologie de Thompson (1932). Les mâles et les femelles ont ensuite été maintenus séparément dans des cages (23°C, 70% RH, 16L:8D) jusqu'à leur utilisation subséquente.

L'isolat *INRS-CFL*, qui a obtenu les meilleurs résultats au cours du volet 1, a été sélectionné pour cette expérience. Afin d'éviter la pseudo-réplication, toutes les solutions ont été préparées à partir de la même solution mère. Des solutions de deux concentrations différentes de *B. bassiana* ont été préparées, soit de 10^7 conidies/ml (T7) et de 10^9 conidies/ml (T9). Ces concentrations correspondent respectivement à des applications de 10^{11} conidies/ha et de 10^{13} conidies/ha. Chaque solution était constituée de 95% de suspension de conidies et de 5% d'un produit naturel ayant des propriétés nutritives. Ce produit naturel joue également un rôle adhésif pour les conidies. Le traitement témoin (T) était constitué à 95% d'eau stérile déionisée et à 5% du produit naturel.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental a été élaboré en blocs aléatoires complets. Au site d'Oka, un bloc était représenté par un arbre (Fig. 5), alors qu'un bloc était un point cardinal à Saint-Bruno-de-Montarville (un arbre étant divisé en 5 points cardinaux) (Fig. 6).



Figure 5. Photographie du dispositif expérimental du verger d'Oka où chaque arbre représente un bloc (INRS-IAF, 2007).

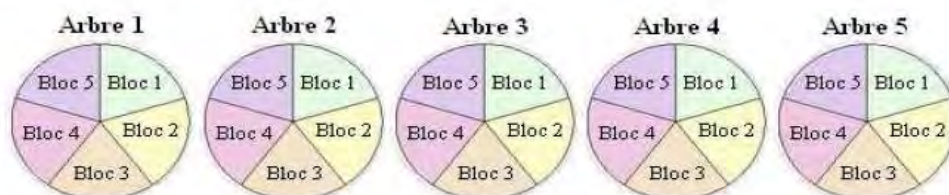


Figure 6. Représentation schématique de la disposition des blocs en fonction des cinq points cardinaux au verger de Saint-Bruno-de-Montarville.

Trois concentrations de conidies (T7, T9 et T) et 3 délais d'échantillonnage ont été testés dans chaque bloc, pour un total de 9 traitements par bloc. Les délais d'échantillonnage étaient de 5 jour (J5), 10 jours (J10) et 15 jours (J15). Dans tous les cas, l'unité expérimentale était représentée par une branche d'environ 45 cm et portant 10 pommettes de 0,6 cm de diamètre. Ces branches étaient sélectionnées en fonction du nombre de pommettes présentes et de l'absence de dommages liés au charançon de la prune. Lorsque nécessaire, les pommettes supplémentaires ont été prélevées afin de standardiser leur nombre à 10 pommettes par branche expérimentale. Les branches ont ensuite été battues pour déloger les insectes pouvant s'y trouver de façon naturelle, avant d'être recouverte par un manchon de mousseline (Fig. 6). Au verger d'Oka, 3 femelles et 2 mâles de charançons de la prune ont été introduits dans les manchons avant de refermer ceux-ci. Chaque manchon possédait une ouverture en Velcro® pour permettre les applications ultérieures de traitements. À Saint-Bruno-

de-Montarville, les manchons ont été placés 20 jours avant l'introduction des charançons. Les insectes ont été introduits le jour des traitements. Lorsque des traitements chimiques avaient lieu, des sacs de plastiques étaient placés autour des manchons, avant d'être enlevés en fin de journée.

Les traitements étaient appliqués en fin d'après-midi à l'aide d'un pulvérisateur électrique de 15 L Propack *Rechargeable Electric Backpack Sprayer* (marque SHURflo®, ultra-low volume). L'embout du pulvérisateur était introduit dans les ouvertures en Velcro® des manchons (Fig. 7). Un mouvement de va-et-vient était effectué avec l'embout afin d'assurer une application homogène du produit. Une quantité de 60 ml était nécessaire pour assurer la saturation de la totalité des feuilles et des pommettes.



Figure 7. Application de solutions à base de *Beuveria bassiana* dans des manchons (INRS-IAF, 2007)

Prise de données

Des données ont été récoltées aux jours 5, 10 et 15 suivant l'application des traitements. Pour ce faire, les branches échantillonnées étaient coupées puis placées dans un sac de coton épais (pour éviter la contamination entre les traitements). Au laboratoire, les manchons ont été ouverts, en commençant par les témoins et en finissant par la plus haute concentration de conidies. Les charançons présents sur les branches ont été récupérés et leur sexe a été déterminé. Les charançons vivants ont été placés et conservés individuellement dans des godets de plastiques de 29,6 ml contenant une pommette (25°C, 50% RH, 16L:8D). Ces charançons ont été suivis jusqu'au jours 15 (voir plus bas).

Les insectes morts ont été placés individuellement dans des boîte de Pétri contenant un papier filtre humide, puis laissés à l'obscurité et à température ambiante pendant environ 10 jours afin de favoriser le développement

de muscardine (et donc de détecter la présence de champignon). Lorsque de la muscardine était détectée, celle-ci était récupérée et transférée dans des boîte de Petri contenant un milieu sélectif afin d'identifier *B. bassiana*. Par la suite, les pommettes ont été détachées et les trous de ponte et d'alimentation ont été dénombrés. Lorsque des trous de ponte étaient observés, les pommettes étaient conservées individuellement dans des godets de plastique de 29,6 ml (25°C, 50% RH, 16L:8D). Dix jours plus tard, les pommettes ont été ouvertes afin de dénombrer les larves et le taux de mortalité de ces dernières. Aussi, un indice de dommages aux pommettes a été attribué : cet indice a été calculé par la somme des pourcentages de dégâts des pommettes d'un même manchon et divisé par le nombre de pommettes, puis a été ramené à 10 :

$$I_{\text{Dom}} = \Sigma (\% \text{ dégât}) / (N \times 10)$$

Les charançons échantillonnés au jour 15 n'ont pas été suivis quotidiennement. Ces derniers ont plutôt été placés dans des boîtes de Petri avec un papier filtre humide et conservés à température de la pièce. Ces conditions sont favorables au développement de *B. bassiana* et permettent donc de savoir s'il y a présence ou non du champignon. Lorsque de la muscardine était observée, celle-ci était transférée dans des boîte de Petri contenant un milieu sélectif afin d'identifier *B. bassiana*.

Suivi journalier des charançons

Les charançons suivis de façon journalière étaient conservés à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les observations ont été effectuées en matinée, jusqu'au jour 15. Ce suivi consistait à dénombrer les dégâts de ponte et d'alimentation, ainsi que le taux de mortalité. Les pommettes ont été changées aux jours 8, 10, 12 et 15 pour les charançons récoltés au jour 5, alors que les pommettes ont été changées aux jours 12 et 15 pour les charançons échantillonnés au jour 10. Les pommettes présentant des trous de ponte ont été conservées de la façon décrite précédemment afin de dénombrer les larves, d'évaluer leur taux de mortalité et de déterminer un indice de dommages. Au jour 15, les charançons encore vivants ont été regroupés dans des boîtes de Petri avec un papier filtre humide, tel que décrit précédemment, afin de favoriser le développement de muscardine et de détecter la présence de *B. bassiana*.

Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées à l'aide d'analyses de variances (ANOVA) et de tests de Tukey.

Résultats

Les résultats de la section *échantillonnage* (i.e. les résultats observés dans les manchons aux jours 5, 10 et 15) sont présentés dans un premier temps. Les résultats de la section *suivi journalier* (i.e. les résultats observés au laboratoire suite au suivi des charançons dans les godets de plastique) sont présentés en deuxième lieu.

Échantillonnages - Mortalité des charançons

Lorsque les mâles et les femelles sont confondus, aucune différence significative entre les traitements n'a été observée en ce qui concerne la mortalité des adultes. Par contre, lorsque seules les femelles sont prises en considération, le nombre de charançons morts est significativement supérieur dans le traitement T7-J10 par rapport aux traitements T9-J5 et T-J5 au site d'Oka (Fig. 8; $P = 0,024$). D'une manière générale, la mortalité a été plus importante à Oka (73) qu'à Saint-Bruno-de-Montarville (29). Aussi, le suivi des insectes morts indique que la muscardine s'est développée sur 49,3% des insectes morts d'Oka et sur 64,7% des insectes morts de Saint-Bruno-de-Montarville. Finalement, de la muscardine s'est aussi développée sur 36,4% des insectes témoins d'Oka et sur 66,7% des insectes témoins de Saint-Bruno-de-Montarville.

Échantillonnages - Nombre de pommettes détachées

Au verger d'Oka, le nombre de pommettes détachées était significativement supérieur pour les traitements T7-J15 et T9-J15 que pour le traitement T7-J5 ; aussi, le traitement T7-J15 avait plus de pommettes détachées que le traitement T-J10 (Fig. 8; $P = 0,0027$). Par contre, aucune différence significative n'a été observé sur le site de Saint-Bruno-de-Montarville. Globalement, il y a eu plus de pommettes détachées au site de Saint-Bruno-de-Montarville (252) qu'au site d'Oka (69).

Échantillonnages - Nombre de trous d'alimentation

Plusieurs différences significatives ont été observées en ce qui a trait au nombre de trous d'alimentation au site d'Oka ($P = 0,0202$) : (1) les traitements T9-J10 et T9-J15 ont plus de trous que les traitement T7-J5, T9-J5 et T5; (2) les traitements T7-J10 et T-J10 ont plus de trous que le traitement T-J5; (3) le traitement T7-J10 par rapport aux traitements T9-J5 et T-J5 (Fig. 8). Aucune différence significative n'a été observé au site de Saint-Bruno-de-Montarville.

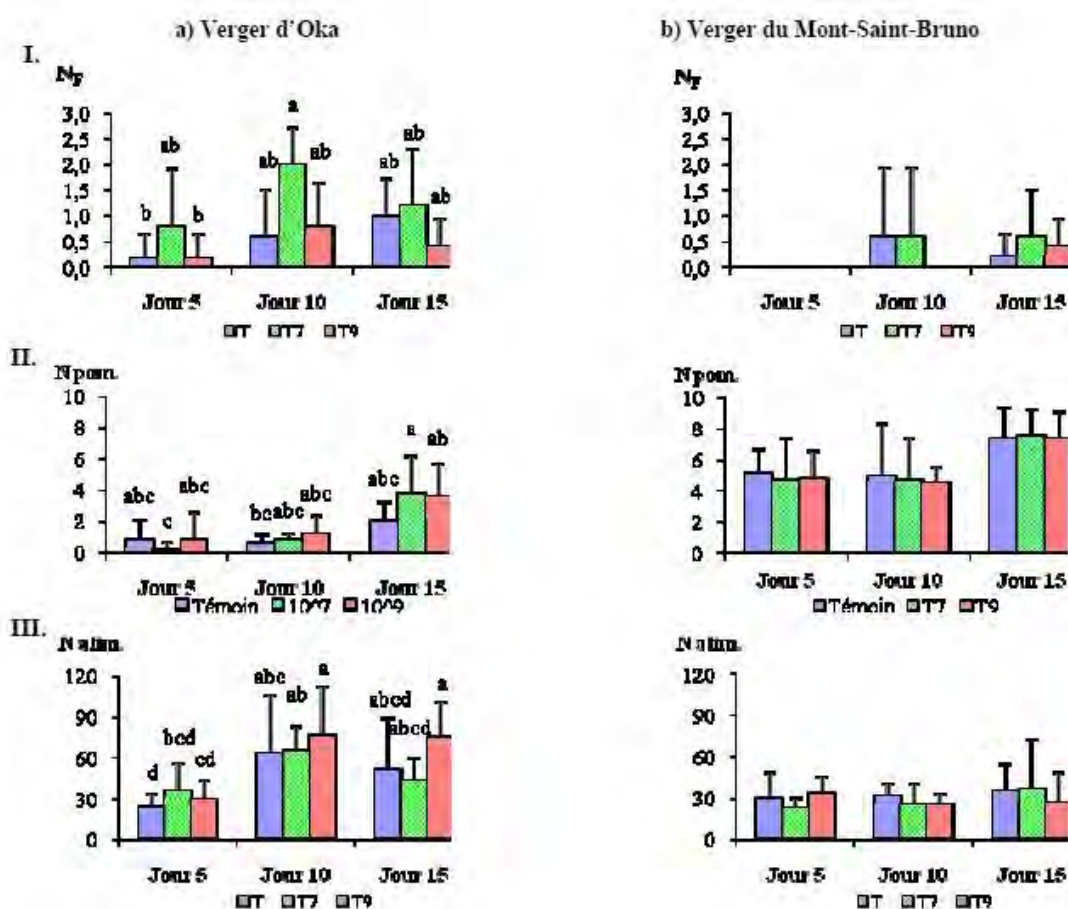


Figure 8. Nombre de femelles mortes (N_f) (I), de pommettes détachées (N pom.) (II) et de trous d'alimentation (N alim.) (III) observés par traitement et par journée d'échantillonnage pour les vergers d'Oka (a) et de Saint-Bruno-de-Montarville (b). T = témoin, T7 = 10⁷ conidies/ml, T9 = 10⁹ conidies/ml.

Échantillonnages - Nombre de trous de ponte

Au site d'Oka, des différences significatives ont été observées en ce qui a trait aux trous de ponte (Fig. 9; $P = 0,0001$) ; (1) le traitement T9-J15 avait plus de trous de ponte que les traitements T9-J5, T7-J10, T-J10, T-J5, T7-J5 et T9-J10 ; (2) le traitement T-J15 avait plus de trous de ponte que les traitements T9-J5, T7-J10, T-J10, T-J5 et T7-J5. Aucune différence significative n'a été observée au site de Saint-Bruno-de-Montarville.

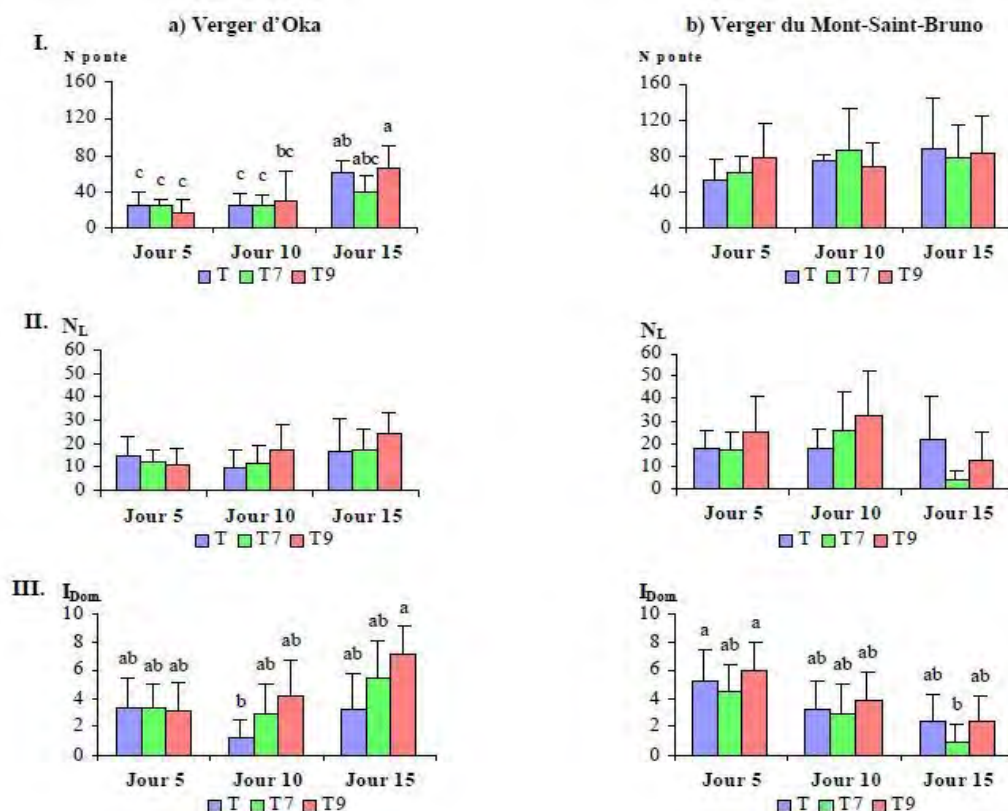


Figure 9. Nombre de trous de ponte (N_{ponte}) (I), de larves (N_L) (II) et indice des dommages des pommets (I_{Dom}) (III) observés par traitement et par journée d'échantillonnage pour les vergers d'Oka (1) et de Saint-Bruno-de-Montarville (b). T = témoin, T7 = 10⁷ conidies/ml, T9 = 10⁹ conidies/ml.

Échantillonnages - Nombre de larves et taux de mortalité

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le nombre de larves et le taux de mortalité de ces dernières (Fig. 9).

Échantillonnages - Indice de dommages aux pommets

Au site d'Oka, l'indice de dommage aux pommets était significativement plus grand pour le traitement T9-J15 que pour le traitement T-J10 (Fig. 9; $P = 0,0159$). À Saint-Bruno-de-Montarville, l'indice de dommage était significativement supérieur sur les traitements T9-J5 et T-J5 que sur les traitements T7-J15 ($P = 0,0099$).

Suivi journalier – Mortalité des insectes et devenir des insectes vivants

Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements au cours du suivi journalier des charançons. Lorsque les charançons encore vivants au jour 15 sont morts, le suivi a démontré l'apparition de

muscardine chez 37,8% des cadavres de charançon d'Oka et chez 40,9% des cadavres de charançon de Saint-Bruno-de-Montarville. Aussi, 40% des insectes témoins d'Oka et 13,3% des témoins de Saint-Bruno-de-Montarville ont développé de la muscardine.

Suivi journalier – Nombre de trous d'alimentation

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui a trait au nombre de trous d'alimentation.

Suivi journalier – Nombre de trous de ponte

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui a trait au nombre de trous de ponte.

Suivi journalier – Nombre de larves et taux de mortalité

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui a trait au nombre de larves et au taux de mortalité de ces dernières.

Suivi journalier – Indice de dommages aux pommettes

Un indice de dommages supérieur a été observé pour le traitement T9-J10 par rapport au traitement T7-J10 pour le jour 15 suivant la journée d'échantillonnage 10 au site de Saint-Bruno-de-Montarville ($P = 0,0320$). Aucune autre différence significative n'a été observée pour les autres jours d'observation et les autres journées d'échantillonnage.

Discussion

Les résultats de ce 2e volet indiquent que, globalement, aucune tendance ne s'est dégagée concernant l'effet des différents traitements sur la mortalité des charançons de la prune et les dommages infligés par ceux-ci, et ce, malgré des conditions météorologiques favorables au développement de *B. bassiana*.

Quelques facteurs importants pourraient expliquer ces résultats. Premièrement, le pommiculteur du verger d'Oka a appliqué un fongicide contre le mildiou (Captan®) le jour de l'application des traitements à base de *B. bassiana*. Or, ce fongicide a pu altérer la germination et la survie de *B. bassiana*. Les résultats indiquent d'ailleurs que la muscardine a d'avantage été observée chez les cadavres de charançon provenant du site de Saint-Bruno-de-Montarville que de ceux provenant d'Oka. Aussi, un traitement chimique contre le charançon de la prune (Imidan®) a été effectué au verger d'Oka au mois de juin. Malgré les mesures de précaution (les

manchons ont été protégés à l'aide de sacs de plastique), il est possible que les charançons des zones expérimentales aient été affectés par ces traitements. Enfin, un traitement d'éclaircissage avec du Fuitone® et du Sevin® a été effectué au mois de mai au site de Saint-Bruno-de-Montarville quelques jours avant la pose des manchons. Ceci pourrait expliquer la chute plus importante des pommes au vergers de Saint-Bruno-de-Montarville qu'au verger d'Oka. Globalement, tous ces traitements chimiques, requis pour la bonne conduite du verger, on pu nuire à l'expression des résultats de l'expérience avec *B. bassiana*.

Deuxièmement, les journées venteuses ont pu entraîner le déplacement des conidies d'un manchon à l'autre, provoquant ainsi la contamination des traitements témoins. Aussi, puisque *B. bassiana* est sensible au rayonnement ultraviolet, il est possible que le développement et la germination de ce dernier aient été affectés lors des journées ensoleillées.

Enfin, il est possible que les concentrations de conidies choisies pour cette expérience aient été trop faibles pour les conditions qui prévalent sur le terrain. Aussi, il est possible que le temps requis pour l'infection sur le terrain soit plus long que celui observé au laboratoire. Finalement, la production massive du champignon au laboratoire a pu entraîner une diminution de la virulence chez ce dernier.

Le suivi journalier des charançons a démontré que ceux-ci continuent de s'alimenter et que les femelles continuent de pondre suite aux traitements. *Beauveria bassiana* ne semble donc n'avoir aucun impact sur le comportement de ces insectes.

En conclusion, les traitements de *B. bassiana* n'ont pas eu d'effet sur la mortalité des charançons ni sur les dommages infligés par ceux-ci. Lorsque l'expérience sera répétée, il sera nécessaire de sélectionner des vergers ayant une régie en agriculture biologique ou, du moins, avec un nombre de traitements phytosanitaires réduit. L'utilisation de manchons imperméables à la circulation des conidies permettrait également d'améliorer le dispositif expérimental en diminuant la possibilité de contamination des témoins. Aussi, puisque *B. bassiana* est un champignon du sol, son utilisation sur le feuillage peut être rendue difficile par les conditions qui y prévalent (notamment l'exposition aux rayons ultraviolets et le taux d'humidité plus faible). Ainsi, il serait nécessaire d'améliorer la solution de base de *B. bassiana* en y ajoutant des éléments nutritifs nécessaires à son développement et à sa germination et certains adjuvants comme des protecteurs contre les ultraviolets. Une autre voie à explorer serait celle de l'utilisation de *B. bassiana* au sol, lorsque les adultes de charançons s'y trouvent (lorsqu'ils sortent de leur site d'hibernation et arrivent dans les vergers au printemps). Finalement, plusieurs pulvérisations devraient être effectuées au cours d'une saison, particulièrement si les journées sont chaudes et ensoleillées. Plusieurs de ces facteurs ont été pris en considération lors de l'élaboration du volet 3.

Volet 3 (année 2008)

Méthodologie

Sites expérimentaux

Les expériences ont été effectuées sur 8 pommiers *Malus domestica* Borkh. n'ayant subi aucun traitement phytosanitaire. Quatre de ces pommiers (*M. domestica* cv. *Cortland*) étaient situés dans un verger situé à Oka (Laurentides), alors que les 4 autres (*M. domestica* cv. *McIntosh*) se trouvaient dans un verger de Saint-Bruno-de-Montarville (Montérégie). Les pratiques phytosanitaires des deux sites sont basées sur l'utilisation de pesticides.

Matériel biologique

Les charançons de la prune ont été prélevés par battage au début du mois de juin dans une section abandonnée (sans traitements phytosanitaires) d'un verger d'Oka avant d'être rapportés au laboratoire de l'IRDA (Saint-Hyacinthe). Le sexe des individus a été déterminé selon la méthodologie de Thompson (1932) et les mâles et les femelles ont été identifiés à l'aide d'une marque de peinture (blanc pour les mâles, rouge pour les femelles). Les mâles et les femelles ont ensuite été maintenus séparément dans des cages (23°C, 70% RH, 16L:8D) jusqu'à leur utilisation subséquente.

L'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana* a de nouveau été utilisé pour cette expérience. Afin d'augmenter la protection des conidies face aux conditions environnementales adverses, une formulation développée par Sabbahi et al. (2008) a été ajoutée à chaque préparation à base de *B. bassiana*. Cette préparation contenait 1% de lait en poudre, 2% de glycérol, 4% d'huile de canola et 5% d'argile. L'huile de canola a pour rôle d'augmenter la stabilité des substances actives formulées sur les feuilles et de favoriser leur contact avec la cuticule des insectes (Burgues 1998), alors que l'argile favoriserait la protection des conidies contre les rayons ultraviolets (Butt 2002). Tout comme le lait en poudre, le glycérol est un humectant et un nutriment, en plus d'être un adhésif (Moore & Caudwell 1977, Burgues 1998).

Dispositif expérimental

Les expériences se sont déroulées du 16 au 30 juin 2008. Quatre traitements, distribués de façon aléatoire, ont été comparés, soit (1) *B. bassiana* sans formulation = T1, (2) *B. bassiana* avec formulation = T2, (3) témoin, avec formulation = T3 et (4) témoin sec, sans formulation (non traité) = T4. Pour les traitements 1 et 2, une concentration de 1×10^9 conidies de *B. bassiana* a été utilisée. Chacun des traitements a été appliqué une seule fois.

Applications foliaires

Dans un premier temps, l'activité insecticide de *B. bassiana* sur les adultes de charançon de la prune a été évalué à l'aide de pulvérisations foliaires. Chaque arbre était divisé en cinq blocs (zones). Dans chacun des blocs, deux traitements étaient effectués. Les traitements étaient distribués de façon aléatoire dans chacun des deux sites. Pour chaque traitement, une branche d'environ 45cm et portant 10 pommettes de 0,6cm de diamètre était sélectionnée. À Oka, où la plupart des pommettes étaient déjà endommagées au début de l'expérience, 10 pommettes en bon état étaient introduites dans chaque manchon.

Un battage des branches expérimentales a d'abord été effectué afin d'éliminer tout insecte pouvant s'y trouver. Un manchon de mousseline a ensuite été placé sur ces branches. Au site d'Oka, trois femelles gravides et deux mâles de charançon de la prune ont été introduits dans chaque manchon. Ce manchon a ensuite été fermé à l'aide d'une attache de plastique serrant la branche sur un collet de mousse isolante. Chaque manchon possédait une ouverture fermée à son extrémité par du Velcro® pour permettre l'application ultérieure des traitements. Au site de Saint-Bruno-de-Montarville, les manchons ont été placés le même jour que celui de l'application des traitements. Les insectes (3 femelles, 2 mâles) ont été introduits par l'ouverture de Velcro® avant l'application des traitements.

Applications au sol

Cette expérience visait à évaluer l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana* contre les adultes de charançon de la prune qui se retrouvent au sol. Le sol au pied de chaque arbre était divisé en cinq blocs (zones) (Fig. 10). Dans chacun des blocs, deux traitements étaient effectués. Les traitements étaient distribués de façon aléatoire dans chacun des deux sites.

Chaque unité expérimentale était représentée par une surface de sol d'environ 20cm. Des pots de plastique (environ 20cm de diamètre et 25cm de hauteur) y ont été enfoncés jusqu'à une profondeur de 10cm. Ces pots

contenaient de la terre et 10 pommettes. Trois femelles gravides et deux mâles de charançon de la prune ont ensuite été introduits dans chaque pot. Après l'application des traitements, les pots ont été fermés à l'aide d'une mousseline permettant les échanges gazeux.



Figure 10. Unité expérimentale représentée par un pot de plastique enfoncé dans le sol. Photographie INRS-IAF (2008).

Application des traitements

Autant pour les applications foliaires que pour les applications au sol, les traitements ont été effectués en fin d'après-midi. L'application s'est fait à l'aide d'un pulvérisateur électrique de 15L Propack (Rechargeable Electric Backpack Sprayer, Ultra-Low volume, SHURflo®). Lors de la pulvérisation, un va-et-vient a été effectué avec l'embout afin d'assurer une application homogène du produit sur la totalité des feuilles et des pommettes. La quantité de produit appliquée était standardisée à 60mL par manchon / pot. Le jour d'application des traitements correspondait au jour 0 (le 16 juin au site d'Oka, le 17 juin au site de Saint-Bruno-de-Montarville).

Prise de données

Les échantillonnages ont eu lieu aux jours 7 et 14 suivant l'application des traitements. Au jour de récolte, les branches expérimentales ont été coupées et placées dans un sac en coton épais afin d'éviter toute contamination entre les traitements. Les pots ont été placés dans un sac plastique pour les mêmes raisons. Au laboratoire, les manchons et les pots ont été ouverts en commençant par les témoins et en finissant par la plus haute concentration de *B. bassiana*. Le nombre de cicatrices de ponte et d'alimentation a été dénombré sur les pommettes présentes dans les manchons et dans les pots. Les charançons de la prune ont aussi été récupérés. Les insectes morts ont été placés individuellement dans des boîtes de Petri contenant du milieu SDA, puis conservées à l'obscurité et à température ambiante pendant environ 10 jours afin de favoriser le développement de muscardine (ce qui permet de confirmer l'infection par *B. bassiana*).

Les insectes vivants récoltés au jour 7 ont été déposés individuellement avec une pommette (pour alimentation) dans des godets de plastique de 29,6mL fermés par un couvercle perforé, lesquels étaient placés dans des chambres environnementales (25°C, 50% R.H., 16:8 LD). Ces charançons ont été suivis quotidiennement jusqu'au jour 15. Le suivi consistait à dénombrer les dégâts associés à la ponte et l'alimentation, ainsi qu'à déterminer la mortalité des insectes. Les pommettes ont été changées aux jours 3 et 6 du suivi. Au jour 15, les charançons encore vivants ont été placés dans des boîtes de Petri contenant du milieu SDA. Les boîtes de Petri ont ensuite été conservées aux conditions ambiantes afin de d'observer le développement de muscardine sur les insectes morts. Les insectes vivants récoltés au jour 14 ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu SDA puis conservés aux conditions ambiantes afin d'observer le développement de muscardine sur les insectes morts.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA), suivies de tests de Tukey, en utilisant le logiciel JMP v 5.0 (SAS Institute, 1996).

Résultats

Applications foliaires – Effet insecticide de Beauveria bassiana

Les résultats démontrent une différence entre les traitements ($P < 0,001$) : au site de Saint-Bruno-de-Montarville, la mortalité des charançons est plus importante en présence du traitement T2 qu'en présence du traitement T1 (Fig. 11). Aucune différence significative n'a été observée entre T1 et T2 au site d'Oka. Au deux site, les mortalités ont été significativement plus importantes dans les traitements T1 et T2 que dans les témoins (T3 et T4). Enfin, il n'y a aucune différence entre les traitements T3 et T4.

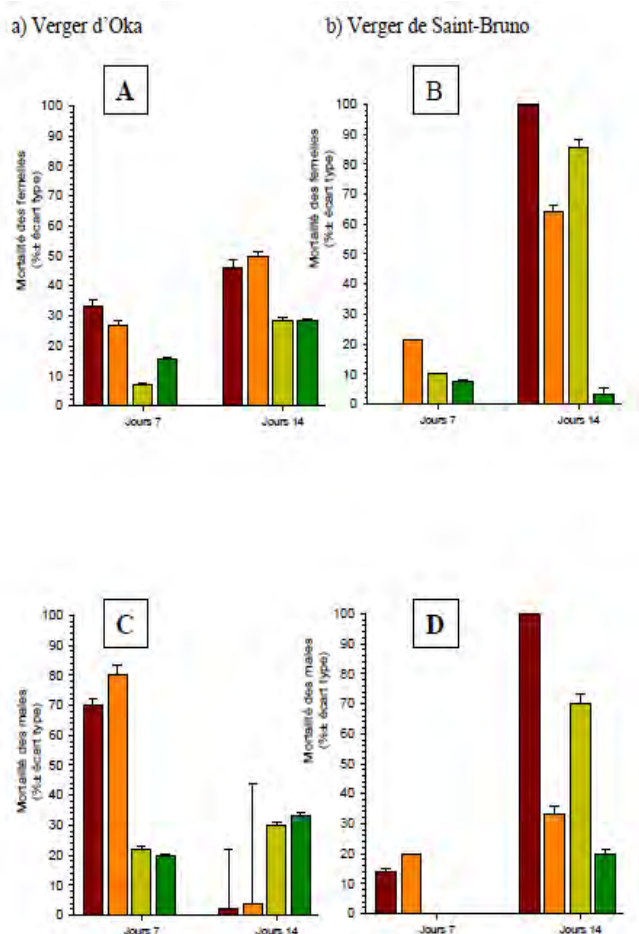


Figure 11. Activité insecticide de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les femelles (A, B) et les mâles (C, D) de charançon de la prune lors d'applications foliaires aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Au site d'Oka, 7 jours après le traitement, la mortalité des mâles étaient supérieure à celle des femelles pour les traitements T1 et T2 ($P < 0,0001$). Par contre, l'inverse a été observée à Saint-Bruno-de-Montarville ($P < 0,0001$).

Applications foliaires – Nombre de trous de ponte

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les traitements T1 et T2 en ce qui a trait au nombre de trous de ponte (Fig. 12; $P > 0,05$). Par contre, le traitement T4 avait significativement plus de trous de ponte que les traitements T1, T2 et T3 ($P < 0,0001$).

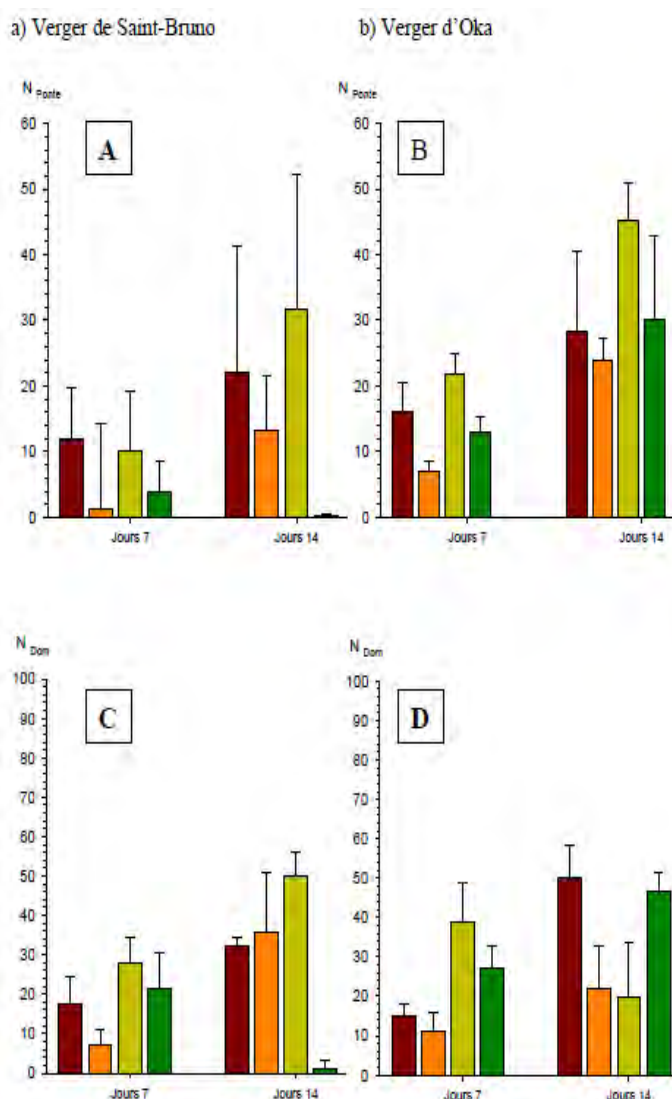


Figure 12. Nombres de trous de ponte (A, B) et de trous d'alimentation (C, D) associés aux différents traitements foliaires de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Applications foliaires – Nombre de trous d'alimentation

Au jour 7, les résultats indiquent qu'il y a significativement plus de trous d'alimentation dans les traitements témoins que dans les traitements avec *B. bassiana* (T1 et T2) (Fig. 12; $P < 0,0001$). Les traitements T1 et T2 ne sont cependant différents l'un de l'autre.

Au jour 14, il y a significativement plus de trous de ponte dans le traitement T1 que dans le traitement T2 au

site d'Oka. Aucune différence n'est observée entre les traitements T1 et T2 au site de Saint-Bruno-de-Montarville.

Applications foliaires – Suivi de l'infection par Beauveria bassiana

Le suivi des insectes morts a révélé que les charançons ayant subi le traitement T2 (*B. bassiana* avec formulation) ont développé plus de muscardine que ceux ayant subi le traitement T1 (*B. bassiana* sans formulation) (Tableau 2). Aussi, les femelles ont développé plus de muscardine que les mâles ($P < 0,0001$). Enfin, aucun charançon n'a développé de muscardine dans les traitements témoins du verger d'Oka, contrairement à celui du site de Saint-Bruno-de-Montarville.

Tableau 2. Taux de développement de muscardine sur les cadavres des femelles (T_F) et des mâles (T_M) du charançon de la prune en fonction des traitements foliaires suivants : T1 = *B. bassiana* sans formulation, T2 = *B. bassiana* avec formulation, T3 = témoin, avec formulation, T4 = témoin sec, sans formulation (non traité).

	Site d'Oka				Site de St-Bruno			
	Jour 7		Jour 14		Jour 7		Jour 14	
	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)
T1	20	14,2	33,3	0	7,1	16,6	0	0
T2	25	37,5	28,6	25	100	100	11,1	0
T3	0	0	0	0	6,7	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	16,7	0	0

Applications au sol – Effet insecticide de Beauveria bassiana

Pour les deux vergers, les résultats indiquent que les traitements avec *B. bassiana* (T1 et T2) causent significativement plus de mortalité que les traitements témoins (Fig.13; $P < 0,0001$). Aussi, il y a significativement plus de mortalité associée au traitement T2 (avec formulation) qu'au traitement T1 (sans formulation). ($P < 0,0001$). Aucune différence de mortalité n'est observée entre les traitements T3 et T4.

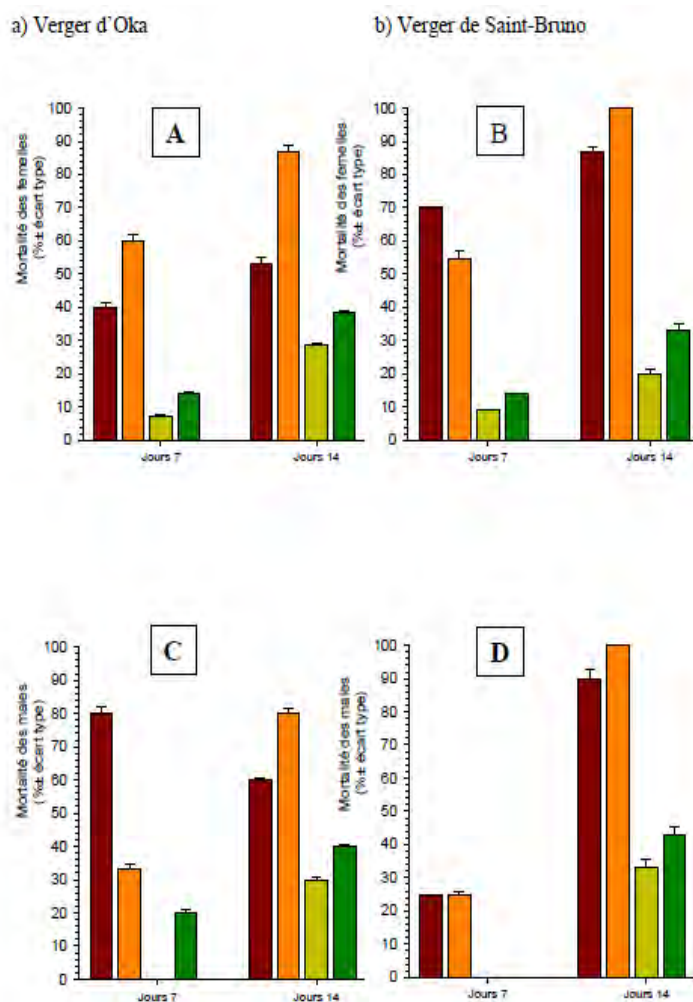


Figure 13. Activité insecticide de l'isolat *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les femelles (A, B) et les mâles (C, D) de charançon de la prune lors d'applications au sol aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Applications au sol – Nombre de trous de ponte

Les résultats indiquent qu'il y a significativement plus de trous de ponte dans le traitement T4 que dans le traitement T3 (Fig 14; $P < 0,0001$). Les autres traitements ne sont pas statistiquement différents les uns des autres en ce qui a trait au nombre de trous de ponte.

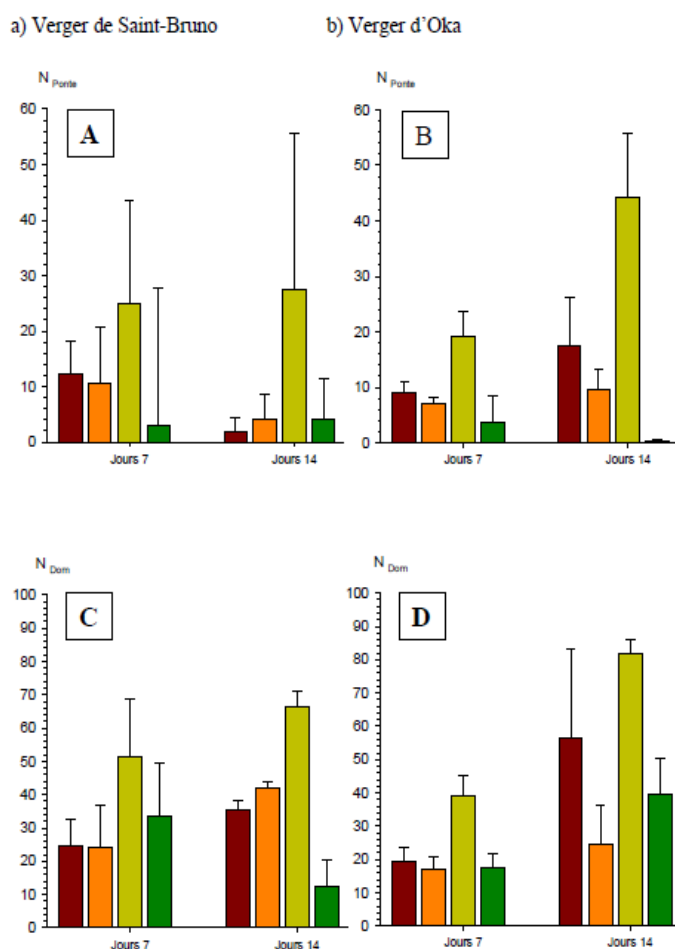


Figure 14. Nombres de trous de ponte (A, B) et de trous d'alimentation (C, D) associés aux différents traitements au sol de l'isolat INRS-CFL de *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune aux jours 7 et 14 de l'échantillonnage. Rouge (●) = T1, Orange (●) = T2, Vert pomme (●) = T4, Vert foncé (●) = T3.

Applications au sol – Nombre de trous d'alimentation

Les résultats indiquent qu'il y a significativement plus de trous d'alimentation dans les traitements témoins que dans les traitements avec *B. bassiana* (T1 et T2) (Fig. 14; $P < 0,0001$). Aussi, un nombre supérieur de trous d'alimentation a été observé dans le traitement T4 que dans le traitement T3 ($P < 0,0001$). Par contre, les traitements T1 et T2 ne sont pas différents l'un de l'autre.

Applications au sol – Suivi de l'infection par *Beauveria bassiana*

Pour les deux vergers, les charançons du traitement T2 (*B. bassiana* avec formulation) ont développés plus de

muscardine que ceux du traitement T1 (*B. bassiana* sans formulation) (Tableau 3). Aussi, les mâles ont développé plus de muscardine que les femelles pour les deux vergers ($P < 0,0001$). Aucun charançon n'a développé de muscardine dans les parcelles témoins.

Tableau 3. Taux de développement de muscardine sur les cadavres des femelles (T_F) et des mâles (T_M) du charançon de la prune en fonction des traitements au sol suivants : T1 = *B. bassiana* sans formulation, T2 = *B. bassiana* avec formulation, T3 = témoin, avec formulation, T4 = témoin sec, sans formulation (non traité).

	Site d'Oka				Site de St-Bruno			
	Jour 7		Jour 14		Jour 7		Jour 14	
	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)	T_F (%)	T_M (%)
T1	66,7	75	62,5	66,7	100	100	92,3	66,7
T2	66,7	100	61,5	87,5	100	100	100	100
T3	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0

Discussion

Les résultats de ce troisième volet indiquent que l'application au sol de *B. bassiana* a été un moyen efficace de contaminer les charançons de la prune. En effet, ces traitements ont augmenté de façon importante la mortalité des adultes. Aussi, de la muscardine s'est développée sur un plus grand nombre de cadavres de charançons lors des expériences impliquant des traitements au sol que dans celles avec traitements foliaires. Ces résultats indiquent donc que *B. bassiana* est un agent de lutte biologique prometteur contre le charançon de la prune, particulièrement si les traitements sont appliqués au sol contre les adultes sortant d'hibernation.

Si les conditions environnementales du feuillages rendent difficile la germination et le développement de *B. bassiana*, ce dernier trouve par contre des conditions plus favorables dans le sol où il est protégé contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy et al. 1990). Ceci dit, en 2008, le nombre de trous de ponte et de trous d'alimentation était généralement plus bas en présence de *B. bassiana* que dans les témoins, aussi bien dans les traitements avec applications foliaires que dans les traitements avec applications au sol. Ces résultats de pulvérisations foliaires sont plus intéressants que ceux observés en 2007. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le problème de contamination des témoins observé en 2007 a été moins important en 2008 : aucun charançon des traitements foliaires témoins n'a développé de la muscardine à Saint-Bruno-de-Montarville, alors que seul 16,6% des insectes des traitements foliaires témoins en ont développé à Oka.

Pour ce qui est des traitements au sol, d'avantage de muscardine s'est développée chez les insectes exposés au

traitement de *B. bassiana* accompagné de formulation que chez ceux en présence du traitement de *B. bassiana* sans formulation. Ce résultat suggère donc que la formulation utilisée au cours de cette expérience est efficace pour augmenter la protection, la germination et / ou le développement de *B. bassiana*. Par contre, la présence ou l'absence de formulation dans les suspensions de conidies n'a pas eu d'impact sur le nombre de trous de ponte et d'alimentation observé. Ceci suggère que la formulation n'a aucun effet significatif sur les activités d'alimentation et de reproduction du charançon de la prune. Aucun charançon des traitements témoins au sol n'a développé de la muscardine.

Afin d'optimiser les procédés d'applications, d'autres travaux devront être effectués. Notamment, de futures études devront déterminer la concentration optimale des conidies dans les solutions de *B. bassiana* et la composition la plus efficace de la formulation. Enfin, comme en 2007, une seule pulvérisation de *B. bassiana* a été effectuée en 2008. Afin d'augmenter l'efficacité des traitements, il serait intéressant d'augmenter le nombre de pulvérisations, particulièrement suite à des journées chaudes et ensoleillées.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de déterminer le potentiel d'utilisation du champignon entomopathogène *B. bassiana* dans un programme de lutte contre le charançon de la prune *C. nenuphar*. Actuellement, les populations de ce charançon sont essentiellement contrôlées à l'aide d'insecticides chimiques. L'étude, qui a porté sur trois ans, comportait des expériences de laboratoire et de terrain.

Au laboratoire, il a été démontré que les isolats (ou souches) *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana* sont très efficaces contre le charançon de la prune et sont pratiquement inoffensifs pour la coccinelle maculée (un insecte utile). La pathogénicité de l'isolat *INRS-CFL* s'est avérée supérieure à celle de *INRS-IP*. L'isolat *INRS-CFL* a donc été sélectionné pour les études de terrain.

La première année de terrain a permis d'identifier les principales difficultés associées à l'utilisation de *B. bassiana* en verger de pommiers. Les applications foliaires utilisées ont exposé le champignon à des conditions défavorables, lesquels ont contribué à rendre *B. bassiana* peu efficace contre le charançon de la prune. Au cours de la deuxième année de terrain, des applications au sol ont donc été testées en plus des applications foliaires. Aussi, des adjuvants ont été ajoutés à la suspension de conidies, afin de favoriser la survie et le développement de *B. bassiana*. Ces expériences de terrain indiquent que les applications au sol de *B. bassiana* sont efficaces et augmentent la mortalité du charançon de la prune.

Ces résultats indiquent donc que *B. bassiana* est un agent de lutte biologique prometteur contre le charançon de

la prune, particulièrement si les traitements sont appliqués au sol contre les adultes sortant d'hibernation. Cependant, afin d'obtenir un résultat satisfaisant, de multiples applications de *B. bassiana* devraient être effectuées tout au long de la période d'activité des adultes au sol (laquelle s'étend sur une période de 3 à 4 semaines). Enfin, un processus d'homologation doit être entrepris auprès de l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) afin de permettre la vente commerciale de produits à base de *B. bassiana* et leur utilisation par les pommiculteurs.

Bibliographie

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol 18: 265–267.

Boulé, J., Chouinard, G., Vincent, C. & Morin, Y. 1997. Biologie et dépistage des principaux insectes et acariens du pommier. In: Manuel de l'observateur : pommier (G. Chouinard, ed.). Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), Québec. Pages 19-99.

Burges, D.H. 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments (H.D. Burges, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pages 31-185.

Butt, T.M. 2002. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: The Mycota Agricultural Applications (F. Kempken, ed.). Springer, Berlin. Pp 111-134.

Butt, T. M. , Ibrahim, L., Ball, B.V. & Clark, S.J. 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. Biocontrol Sci. Technol. 4: 207–214.

Chouinard, G., Morin, Y. & Brodeur, C. 2001. Lutte contre les insectes et acariens. In: Guide de gestion intégrée des ennemis du pommier (G. Chouinard, ed.). Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, Sainte-Foy, Québec. Pages 101-138

FFPQ, 2008. Site internet de la Fédération des producteurs de pommes du Québec. Disponible sur: <http://www.lapommeduquebec.ca>

Levine, E. & Hall, F.R. 1978. Pectinases and cellulases from plum curculio larvae, possible causes of apple and plum fruit abscission. Entomol. Exp. Applic. 23: 259-268.

McCoy, A., Quintela, E.D. & Faria, M. 1990. Environnemental persistence of entomopathogenic fungi. In: New direction in biological control (R.R. Baker & P.E. Dunn, eds.). A.R. Liss, New York. Pages 139-159.

Moore, D. & Caudwell, R.W. 1997. Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locusts. Mem. Entomol. Soc. Can. 171: 49-67.

Paradis, R.O. 1956. Observations sur le cycle évolutif du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* (Hbst.), sur la pomme dans le Québec. Ann. Soc. Entomoi. Qué. 2: 60-70.

Racette, G. Chouinard, G., Vincent, C. & Hill, S.B. 1992. Ecology and management of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. Phytoprotection 73: 85-100.

Thompson, R.R. 1932. Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. J. Econ. Entomol. 25 807-810.

Vincent, C. & Roy, M. 1992. Entomological limits to biological control programs in Québec apple orchards. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 27: 649-657.