

**Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Novembre 2012**

**ÉTUDE DE LA SUSCEPTIBILITÉ DE LA MOUCHE DU CHOU (*DELIA RADICUM* L.)  
AUX MYCÈTES ENTOMOPATHOGENÈS DE L'ORDRE DES HYPOCRÉALES.**

**Par  
Vincent Myrand**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en microbiologie appliquée**

**Jury d'évaluation**

**Dr Pierre Lafontaine, examinateur externe  
Dr Michel Sylvestre, examinateur interne  
Dr Claude Guertin, directeur de recherche**

**© droits réservés Vincent Myrand, 2012**

## RÉSUMÉ

La mouche du chou, *Delia radicum* L., est un ravageur important des plantes cultivées de la famille des Brassicaceae. L'alimentation des larves sur les racines cause des dommages et des pertes pour les producteurs agricoles. Des efforts de recherche sont requis afin de trouver des alternatives à l'utilisation des insecticides de synthèse actuellement utilisés pour lutter contre cet insecte. À cette fin, les propriétés entomopathogènes de certains agents microbiens peuvent s'avérer utiles. Plus particulièrement, les mycètes appartenant à l'ordre des Hypocréales offrent un potentiel intéressant comme agent de lutte biologique contre les insectes.

L'objectif général de cette étude était de vérifier la pathogénicité de certains isolats de mycètes appartenant aux espèces *Tolyocladium cylindrosporium*, *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* de l'ordre des Hypocréales chez les larves et les adultes de *D. radicum*. Plus spécifiquement, la présence de variations intra et interspécifiques relativement à la pathogénicité des isolats a été vérifiée. La première étape de la démarche consistait à établir une colonie stable de *D. radicum* en conditions de laboratoire afin de permettre l'approvisionnement en insectes. Différents isolats ont ensuite été mis en production pour éventuellement être testés sur des larves de troisième stade ainsi que sur les adultes de la mouche du chou. Les résultats obtenus démontrent que tous les isolats appartenant aux espèces *M. anisopliae* et *T. cylindrosporium* sont en mesure d'induire une mortalité notable chez les larves de troisième stade et, subséquemment, une réduction de l'émergence des adultes. Alors que la pathogénicité de *M. anisopliae* et *T. cylindrosporium* semble équivalente, celle des isolats de *B. bassiana* s'avère limitée. D'autre part, sur la base des résultats obtenus avec les différents isolats, aucune différence intra spécifique n'est observée relativement à la pathogénicité des mycètes chez le troisième stade larvaire. Finalement, les résultats obtenus démontrent, pour la première fois, la vulnérabilité des adultes de *D. radicum* à l'isolat INRS 709 (F52) de *M. anisopliae*. Dans son ensemble, l'étude a donc permis d'approfondir les connaissances relatives à la susceptibilité de la mouche du chou aux mycètes Hypocréales, notamment face au mycète *T. cylindrosporium*. Les implications de cette étude concernant le développement d'un agent de lutte biologique sont discutées.

Mots clés : mouche du chou, *Delia radicum*, *Tolyocladium cylindrosporium*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Hypocréales, lutte biologique, lutte microbienne.

## ABSTRACT

Cabbage maggot, *Delia radicum* L., is a major pest of cultivated plants of the Brassicaceae family. Larval feeding on roots is causing damages and losses for producers. Studies are needed in order to find alternative solutions to chemical insecticides actually used to control this pest. Therefore, the entomopathogenic proprieties of some microbes may be useful. In particular, fungi belonging to the order Hypocreales offer a good potential as biological control agents of insects.

The mains purpose of this study was to test the pathogenicity towards *D. radicum* adults and larvae of some fungal isolates belonging to the species *Tolypocladium cylindrosporum*, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the order Hypocreales. The presence of intra and inter specific variations in regards of the pathogenicity of the isolates was investigated. Thus, the first step of the process was to establish a stable colony of *D. radicum* under laboratory conditions to allow the supply of insects. Afterward, different isolates of fungi were produced and tested on third instars larvae and adults of the cabbage maggot. Results shows that all *M. anisopliae* and *T. cylindrosporum* isolates proved to cause a noteworthy mortality toward third instars larvae and consequently reduce adult emergence. While the pathogenicity of *M. anisopliae* and *T. cylindrosporum* seems to be similar, the *B. bassiana* isolates are less pathogenic. Based on the results obtained with the selected isolates, no intra specific differences appear to be present in regard of the pathogenicity of the isolates toward third instars larvae. Also, results reveal for the first time the vulnerability of adults specimens of *D. radicum* to *M. anisopliae* isolate INRS 709 (F52). Globally, this study deepened the knowledge about cabbage maggot susceptibility toward hypocralean entomopathogenic fungi, chiefly *T. cylindrosporum*. The implications of this study regarding the development of a biological control agent are discussed.

Key words : cabbage maggot, *Delia radicum*, *Tolypocladium cylindrosporum*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Hypocreales, microbial control, biological control.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Claude Guertin, pour son soutien moral et financier tout au long de mon parcours à la maîtrise. Sa grande disponibilité, sa compréhension et ses conseils m'ont permis de garder confiance dans les moments plus difficiles. Je conserverai un excellent souvenir de nos discussions sur la science et la vie de parents. Au plaisir de collaborer à nouveau ensemble!

Des remerciements spéciaux s'adressent aux étudiants et stagiaires qui m'ont donné un précieux coup de main lors des manipulations de laboratoire et qui ont agrémenté mon retour aux études. Merci donc à Narin Srei, Valentin Popa, Galen Guo, François Giroux-Quesnel, Étienne Rouleaux-Mailloux et Mariane Séguin.

Je tiens aussi à remercier M. Guy Boivin et Mme Danielle Thibodeau, pour les conseils apportés lors de l'établissement de la colonie de la mouche du chou. Merci également à M. Bruno Fréchette, pour le soutien qu'il m'a donné au début de mon projet, et à M. Jacques Brodeur, pour les enseignements reçus dans le cadre de son cours «Principes de lutte biologique».

Je remercie également Mme Sophie Rodrigue de la compagnie Plant-Prod Québec pour m'avoir gracieusement fourni le bio-insecticide granulaire Met-52™. Également, je ne peux passer sous silence la généreuse contribution de mon fournisseur officiel de rutabagas, M. Michel Pichette de la ferme Milisun enr. En le remerciant, j'espère que ce projet pourra un jour engendrer des applications concrètes sur sa ferme.

Finalement, je remercie du fond du cœur ma chère conjointe Mélissa. Son support et sa compréhension ont été indispensables à la réussite de ce projet. En espérant être un bon modèle à suivre, je remercie également mes enfants, Édouard, Laurence et Victor, pour toutes les joies procurées durant ce parcours. Je remercie chaleureusement Marie-Josée et ma mère pour les encouragements et les commentaires. Merci enfin à Tony, parce que je sais que tu aurais été fier de moi...

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	iv
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	v
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	vii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	viii
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE 2 : CULTURES DE CRUCIFÈRES</b> .....	2
<b>CHAPITRE 3 : MOUCHE DU CHOU</b> .....	4
Taxonomie et distribution .....	4
Biologie .....	6
Adultes .....	6
Œufs .....	7
Larves .....	9
Pupes .....	10
Voltinisme .....	13
Méthodes d'élevage .....	13
Méthodes de dépistage .....	14
Méthodes de lutte .....	15
Lutte chimique .....	15
Lutte physique et culturale .....	16
Lutte biologique .....	17
Lutte microbienne .....	19
<b>CHAPITRE 4 : MYCÈTES HYPOCRÉALES</b> .....	21
Utilisation en lutte biologique .....	21
Biologie et taxonomie .....	21
Spectre d'hôtes et virulence .....	22
Pathogénèse .....	23
La cuticule .....	23
L'adhésion .....	24
La germination .....	24
La pénétration .....	25
La prolifération .....	26
Facteurs influençant la susceptibilité des insectes .....	26

Mycètes d'intérêts .....	28
<i>Tolyposcladium cylindrosporium</i> Gams .....	28
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin .....	30
<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin .....	34
<b>CHAPITRE 5 : PROBLÉMATIQUE .....</b>	<b>37</b>
<b>CHAPITRE 6 : BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE 7 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>40</b>
Élevage de la mouche du chou .....	40
Régie d'élevage .....	40
Production des cohortes de larves .....	43
Production des cohortes de mouches .....	44
Production des isolats de champignons entomopathogènes .....	44
Sélection des isolats .....	44
Production des suspensions mères .....	46
Caractérisation des suspensions mères .....	49
Épreuves biologiques .....	52
Criblage des isolats chez les larves .....	52
Criblage des isolats chez les adultes .....	56
<b>CHAPITRE 8 : RÉSULTATS .....</b>	<b>60</b>
Régie d'élevage .....	60
Production des isolats de champignons entomopathogènes .....	60
Criblage des isolats chez les larves .....	61
Criblage des isolats chez les adultes .....	72
<b>CHAPITRE 9 : DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
Élevage de la mouche du chou .....	73
Production et caractérisation des isolats .....	74
Développement du protocole de criblage .....	77
Criblage des isolats chez les larves .....	78
Criblage des isolats chez les adultes .....	83
Perspective de lutte biologique .....	85
<b>CHAPITRE 10 : CONCLUSION .....</b>	<b>90</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>91</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 3.1</b> : Exemples de dégâts sévères causés par les larves de la mouche du chou .....	5
<b>Figure 3.2</b> : Stade adulte de <i>D. radicum</i> .....	8
<b>Figure 3.3</b> : Œufs de <i>D. radicum</i> . .....	9
<b>Figure 3.4</b> : Larves de troisième stade de <i>D. radicum</i> . .....	11
<b>Figure 3.5</b> : Aspect général d'une pupa de <i>D. radicum</i> . .....	12
<b>Figure 7.1</b> : Vue de l'intérieur d'une cage servant à l'élevage de <i>D. radicum</i> . .....	41
<b>Figure 7.2</b> : Différentes étapes liées à la production des champignons entomopathogènes .....	47
<b>Figure 7.3</b> : Dénombrement des conidies avec un hémacymètre et identification des cellules de type A et C. ....	50
<b>Figure 7.4</b> : Aperçu d'un test de germination sur gélose de Sabouraud au dextrose (grossissement 250x). ....	51
<b>Figure 7.5</b> : Différentes étapes liées au criblage des isolats chez les larves de <i>D. radicum</i> .....	54
<b>Figure 7.6</b> : Différentes étapes liées au criblage des isolats chez les adultes de <i>D. radicum</i> .....	58
<b>Figure 8.1</b> : Mortalité au stade larvaire observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. ....	63
<b>Figure 8.2</b> : Réduction de l'émergence des imagos observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. ....	64
<b>Figure 8.3</b> : Ratio moyen de réduction d'émergence ( <i>Ratio<sub>RE</sub></i> ), relativement à l'isolat référence INRS 709, pour les isolats regroupés selon leur espèce d'appartenance.....	65
<b>Figure 8.4</b> : Ratio moyen de réduction d'émergence ( <i>Ratio<sub>RE</sub></i> ) pour les isolats testés relativement à l'isolat référence INRS 709. ....	66
<b>Figure 8.5</b> : Mortalité totale (larves et pupes) observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. ....	68
<b>Figure 8.6</b> : Ratio moyen de mortalité totale ( <i>Ratio<sub>MT</sub></i> ) relativement à l'isolat référence INRS 709, pour les isolats regroupés selon leur espèce d'appartenance. ....	69
<b>Figure 8.7</b> : Ratio moyen de mortalité totale ( <i>Ratio<sub>MT</sub></i> ) pour les isolats testés relativement à l'isolat référence INRS 709. ....	70
<b>Figure 8.8</b> : Développement de muscardine observé pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. ....	71

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 7.1</b> : Hôte et origine géographique des isolats de champignons entomopathogènes sélectionnés. ....	45
<b>Tableau 8.1</b> : Concentration moyenne des suspensions de conidies obtenues et viabilité des conidies pour les isolats de champignons mis en production. ....	61

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

La révolution verte de la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle a permis l'essor de la production agricole mondiale grâce à l'utilisation des engrais chimiques, des techniques d'irrigation, des cultivars à haut rendement et des pesticides de synthèse (Matson *et al.*, 1997). Cependant, l'utilisation de ces pesticides comporte un risque élevé pour l'environnement et la santé humaine (Culliney *et al.*, 1993, Edwards, 1993). En particulier, l'emploi d'insecticides pour lutter contre les insectes génère des problèmes additionnels comme le développement de résistance et la résurgence de ravageurs autrefois considérés comme étant d'importance secondaire (Lacey *et al.*, 2001). De plus, la demande de denrées agricoles produites dans le respect de l'environnement et exemptes de résidus de pesticides est de plus en plus importante (Bailey *et al.*, 2010). Il est ainsi impératif de développer de nouvelles méthodes de lutte face aux insectes ravageurs des cultures.

Une avenue séduisante consiste en l'exploitation de la pathogénicité de certains agents microbiens comme les virus, les bactéries, les protozoaires, les nématodes et les mycètes envers les insectes. Pour plusieurs de ces agents, leur utilisation comporte de nombreux avantages, notamment la compatibilité avec les équipements de pulvérisations conventionnels et l'innocuité envers l'humain et la faune non ciblée. Cependant, ils présentent des inconvénients comme une faible persistance, une rapidité d'action moindre et des coûts de production élevés. Des recherches doivent donc être poursuivies afin, entre autres, de trouver des agents exprimant une grande virulence, d'améliorer leur intégration dans des programmes de lutte intégrée, d'accroître leur compétence environnementale et leurs modes de production, de même que leur acceptation par le public et les producteurs utilisateurs (Lacey *et al.*, 2001).

Les mycètes sont d'importants agents de régulation des populations d'insectes (Goettel *et al.*, 2010) et ont généré le développement de plusieurs bioinsecticides permettant de contrôler des insectes ravageurs dans les milieux agricoles, forestiers et urbains (Faria *et al.*, 2007). Les champignons entomopathogènes possèdent d'ailleurs un potentiel intéressant pour lutter contre la mouche du chou, *Delia radicum* L., un insecte ravageur important des cultures de la famille des Brassicaceae (Eilenberg *et al.*, 2003). La présente étude vise donc à enrichir les connaissances en regard de la pathogénicité de ces mycètes envers la mouche du chou, avec l'objectif d'établir les prémices menant au développement d'un nouvel outil de lutte biologique.

## CHAPITRE 2 : CULTURES DE CRUCIFÈRES

Les Brassicaceae, aussi appelés crucifères, sont les représentants d'une grande famille de plantes qui regroupe environ 3 700 espèces différentes réparties dans 338 genres taxonomiques. Leur distribution géographique est mondiale, hormis en Antarctique, mais une proportion importante se retrouve principalement dans la zone tempérée de la région holarctique (35-60° N) (Lysak *et al.*, 2010). Un nombre impressionnant de ces crucifères, appartenant essentiellement au genre *Brassica*, sont des légumes cultivés pour la consommation humaine. Pour ne citer que quelques exemples, mentionnons le rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica* L.), le brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck.), le chou-fleur (*Brassica oleracea* var. *botryllis* L.) et le chou (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Le secteur des productions oléagineuses comprend également quelques représentants de cette famille de plantes, notamment le canola (*Brassica napus* L.) et la moutarde (*Brassica juncea* L.) (Rakow, 2004). Qui plus est, certaines espèces des genres *Aubrieta*, *Iberis*, *Lunaria* et *Arabis* sont cultivées pour des fins ornementales tandis qu'*Arabidopsis thaliana* est utilisée à titre d'organisme modèle en sciences des plantes (Lysak *et al.*, 2010). Finalement, des plantes telles que la bourse-à-pasteur (*Capsella bursa-pastoris* L.), la barbarée vulgaire (*Barbarea vulgaris* R. Br.), le tabouret des champs (*Thlaspi arvense* L.) et la moutarde des champs (*Sinapis arvensis* L.) sont considérés comme plantes adventices (Bouchard *et al.*, 1998).

Au Canada, selon les données fournies par Statistiques Canada pour l'année 2010, la superficie cultivée en légumes de la famille des crucifères correspond à tout près de 15 000 ha, soit un peu plus de 15 % de la toute la surface exploitée en production maraîchère. Ce sont les choux qui occupent la plus grande superficie avec 5 046 ha mis en production, ce qui se traduit par un volume récolté de 152 230 tonnes métriques et une valeur à la ferme de 47 653 000 \$. La seconde position en terme de superficie cultivée est détenue par le brocoli avec 4 556 ha, suivi du chou-fleur (1 967 ha), du rutabaga et du navet (1 836 ha), du radis (962 ha) et du chou de Bruxelles (632 ha). Au total, les récoltes de crucifères représentent 19,11 % de la valeur à la ferme des productions maraîchères produites au Canada, soit 143 163 000 \$. Les producteurs québécois jouent un rôle de premier plan en cultivant 38,65 % des superficies canadiennes en crucifères, ce qui représente une valeur à la ferme de 64 136 000 \$ (Anonyme, 2011). Toujours au Canada, 5 027 643 ha auraient été consacrés à la culture du canola en 2006, principalement dans les provinces du Manitoba, de l'Alberta et de la Saskatchewan. Ceci confère au Canada le

second rang mondial derrière la Chine pour cette production oléagineuse avec 9 millions de tonne produites (Casséus, 2009).

Les cultures légumières de la famille des Brassicaceae sont exposées à un impressionnant complexe d'insectes ravageurs. Celui-ci comprend, entre autre, les altises (*Phyllotreta spp.*), la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni* Hübner), la fausse-teigne des crucifères (*Plutella xylostella* L.), la piéride du chou (*Pieris rapae* L.) (Boivin *et al.*, 1994) et, depuis peu au Québec, la cécidomyie du chou-fleur, *Contarinia nasturtii* (Kieffer) (Corlay *et al.*, 2008). Tous ces ravageurs sont en mesure d'occasionner des pertes économiques plus ou moins importantes selon les années et les cultures mises en terre. Cependant, l'insecte d'intérêt pour les fins de présente étude est la mouche du chou.

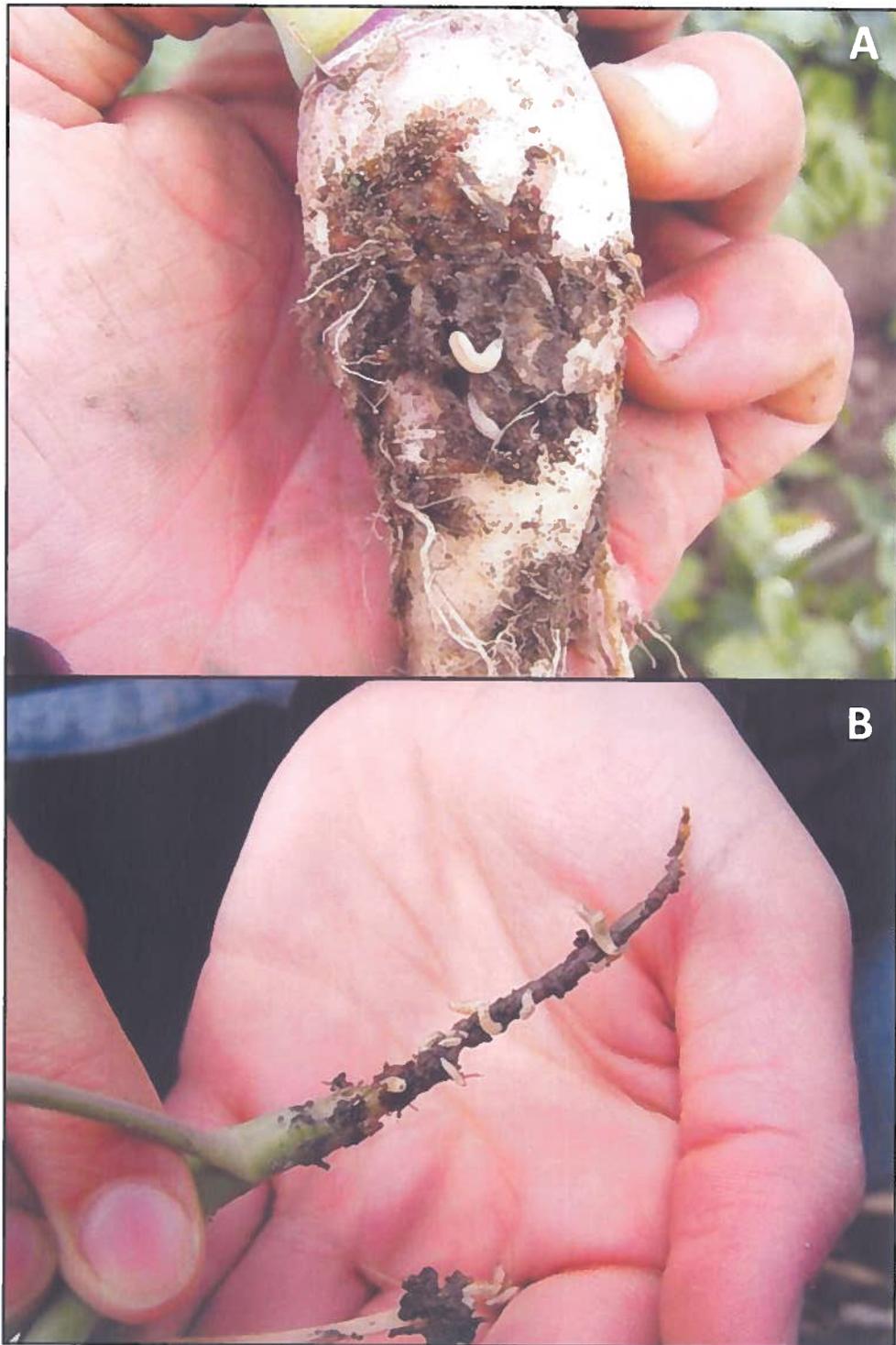
## CHAPITRE 3 : MOUCHE DU CHOU

### Taxonomie et distribution

La mouche du chou, *Delia radicum* L., est un diptère phytophage appartenant à la super famille des Muscoidea et la famille des Anthomyiidae. Le genre *Delia* comprend plusieurs membres qui ont une incidence en agriculture, dont la mouche de l'oignon (*Delia antiqua* Meigen), la mouche des semis (*Delia platura* Meigen), la mouche du navet (*Delia floralis* Fallén), la mouche des légumineuses (*Delia florilega* Zetterstedt) (Finch, 1989) et la mouche grise des céréales (*Delia coarctata* Fallén) (McAlpine *et al.*, 1981). Plusieurs changements d'appellation ont affecté le genre *Delia* au fil du temps, ce qui peut porter à confusion. Il fut jadis désigné comme *Hylemya* aux États-Unis et au Canada, *Phorbia* en France, en Allemagne et en Russie et *Eriosphia* ou *Delia* en Belgique et en Angleterre (Coaker *et al.*, 1971). C'est seulement en 1981 que l'appellation *Delia radicum* fut adoptée universellement pour désigner la mouche du chou suite à la découverte d'un spécimen de *Musca radicum* dans la collection personnelle de Linné (Pont, 1981).

On peut actuellement retrouver *D. radicum* dans toute la région tempérée holarctique (35-60° N) (Finch, 1989), soit en Amérique du Nord, en Asie, en Europe et dans le nord de l'Afrique. C'est dans la région de New-York que l'espèce aurait probablement été introduite en Amérique du Nord en 1835 à partir de populations européennes (Biron *et al.*, 2000). L'espèce *D. radicum* est maintenant reconnue pour affecter une panoplie de plantes, tant sauvages que cultivées, appartenant à la famille des crucifères, comme le rutabaga, le radis, le chou, le chou-fleur, le brocoli, le canola, la moutarde et le radis sauvage (*Raphanus raphanistrum* L.) (Brooks, 1951, Coaker *et al.*, 1971, Dosedall *et al.*, 1994, Finch *et al.*, 1977, Smith, 1927).

Ce sont les larves qui causent les dommages en s'alimentant sur les racines et, parfois, sur les parties aériennes des plantes hôtes comme le chou-fleur et le chou de Bruxelles (Coaker *et al.*, 1971). Les dommages causés sur les racines entravent la circulation de la sève dans les tissus, ce qui entraîne des flétrissements importants et des retards de croissance. Ces dommages favorisent par ailleurs l'infection par des agents phytopathogènes et provoquent parfois la mort des jeunes plants. Quoique les plants vigoureux sont en mesure de tolérer plusieurs larves sans démontrer de symptômes apparents, les dégâts d'alimentation sévères peuvent avoir une grande incidence sur la qualité des récoltes et les rendements (Figure 3.1).



**Figure 3.1 : Exemples de dégâts sévères causés par les larves de la mouche du chou. A : Dégâts d'alimentation sur une racine de rutabaga, B : Système racinaire d'un jeune plant de brocoli complètement détruit par l'alimentation des larves.**

C'est particulièrement le cas du rutabaga puisque c'est la partie comestible qui est directement consommée par les larves. En fait, la mouche du chou est l'insecte ravageur le plus problématique pour les cultures de rutabagas dans la plupart des régions du Canada (Anonyme, 2005b). Les dommages, même faibles, déprécient grandement la qualité des récoltes et leur commercialisation. Selon l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA, 2011), seules les blessures superficielles bien cicatrisées et altérant moins de 25 % de la partie inférieure blanche des rutabagas sont tolérées pour la catégorie Canada No. 1. Si les dégâts ne sont pas entièrement cicatrisés et/ou ne peuvent pas être enlevés par parage lors de l'emballage, ils occasionnent des pertes directes pour les producteurs. La présence de larves dans les racines récoltées peut également entraîner d'importants problèmes lors de l'entreposage (Boivin *et al.*, 1994, Brooks, 1951, Coaker *et al.*, 1971, McDonald *et al.*, 1992).

Finalement, une enquête récente réalisée dans les prairies canadiennes indique que la très grande majorité des champs de canola présentent des signes de dommages causés par les stades larvaires de *Delia spp.* Ces dommages peuvent se traduire par des pertes de rendement annuelles évaluées à cent millions de dollars canadiens (Soroka *et al.*, 2004).

## **Biologie**

### **Adultes**

Les adultes de la mouche du chou sont de couleur brun-grisâtre, mesurant en moyenne 6 mm de longueur (Smith, 1927). La distinction de l'espèce se fait en examinant les caractéristiques des nervures sur les ailes et des regroupements de soies présents sur le thorax et les fémurs. Les mâles possèdent des yeux contigus (holoptiques) tandis que les yeux des femelles sont dits dichoptiques de par le fait qu'ils sont nettement séparés l'un de l'autre (figure 3.2) (Brooks, 1951).

Les mouches hivernent généralement sous forme de pupes confinées dans le sol (Smith, 1927). Au printemps, dès leur émergence, les imagos s'activent dans les bordures non-cultivées des champs de crucifères, en quête de nectar et d'exsudats (Coaker *et al.*, 1971). Selon Hawkes (1972), les adultes s'alimentent principalement la matin et la ponte s'effectue dans l'après-midi. L'activité des mouches est cependant tributaire de la température, celles-ci préférant se cacher dans les crevasses du sol et sous des débris organiques lorsque la température est inférieure à 15,5 °C (Miles, 1951). Les femelles ont besoin d'une période de trois jours suivant l'émergence

afin d'atteindre la maturité sexuelle. Elles sont généralement monogames tandis que les mâles sont en mesure de se reproduire avec quatre partenaires différents. Les premiers œufs peuvent être pondus dès le lendemain de l'accouplement (Swales, 1961). Une alimentation composée essentiellement d'hydrates de carbone suffit aux femelles pour pondre une première série d'œufs (Finch *et al.*, 1969a). Quoique la fécondité des femelles peut être très élevée en conditions de laboratoire, atteignant des valeurs moyennes de 220 à plus de 370 œufs pondus par individu (Finch *et al.*, 1969b, Harris *et al.*, 1966), il a été démontré qu'elle peut être réduite de l'ordre de 70 à 80 % en conditions réelles. Ceci s'explique par la difficulté qu'ont les femelles à obtenir dans leur alimentation certains acides aminés essentiels à la production et la maturation des œufs (Finch, 1971a, Finch, 1971b).

Le mécanisme de sélection des plantes hôtes employé par *D. radicum* pour la ponte peut être décortiqué en trois étapes distinctes intimement liées entre elles (Finch *et al.*, 2000). Tout d'abord, c'est en suivant un gradient d'odeurs volatiles émises par les plantes de la famille des crucifères, les isothiocyanates, que les mouches femelles gravides localisent les plantes d'intérêts (Finch *et al.*, 1982, Hawkes *et al.*, 1979, Hawkes *et al.*, 1978). À proximité de celles-ci, des signaux visuels tels que la forme des feuilles et leur couleur permet ensuite aux mouches de s'orienter (Kostal *et al.*, 1994, Kostal, 1991, Prokopy *et al.*, 1983, Roessingh *et al.*, 1990). L'établissement d'un contact entre les chémorécepteurs situés sur les tarsi des femelles et des glucosinates non volatils présents dans les tissus des plantes hôtes déclenche ensuite la ponte lors de la troisième et dernière étape (Roessingh *et al.*, 1992). Des phytoalexines et un composé nommé Cabbage Identification Factor (CIF) sont des molécules également en mesure de déclencher la ponte (Baur *et al.*, 1998, Roessingh *et al.*, 1997). Le CIF serait aussi présent dans les œufs de *D. radicum*, ce qui pourrait encourager la ponte chez les congénères (Gouinguéné *et al.*, 2006). Une fois stimulées, les femelles déposent alors leurs œufs à proximité des collets des plantes hôtes à une distance d'environ 5 cm autour de la base des plants, préférablement dans les crevasses et sous les agrégats de sols (Hughes *et al.*, 1959). Il a été observé que les femelles pondent leurs œufs en paquet de deux ou trois mais ce nombre peut parfois dépasser la douzaine (figure 3.3) (Smith, 1927).

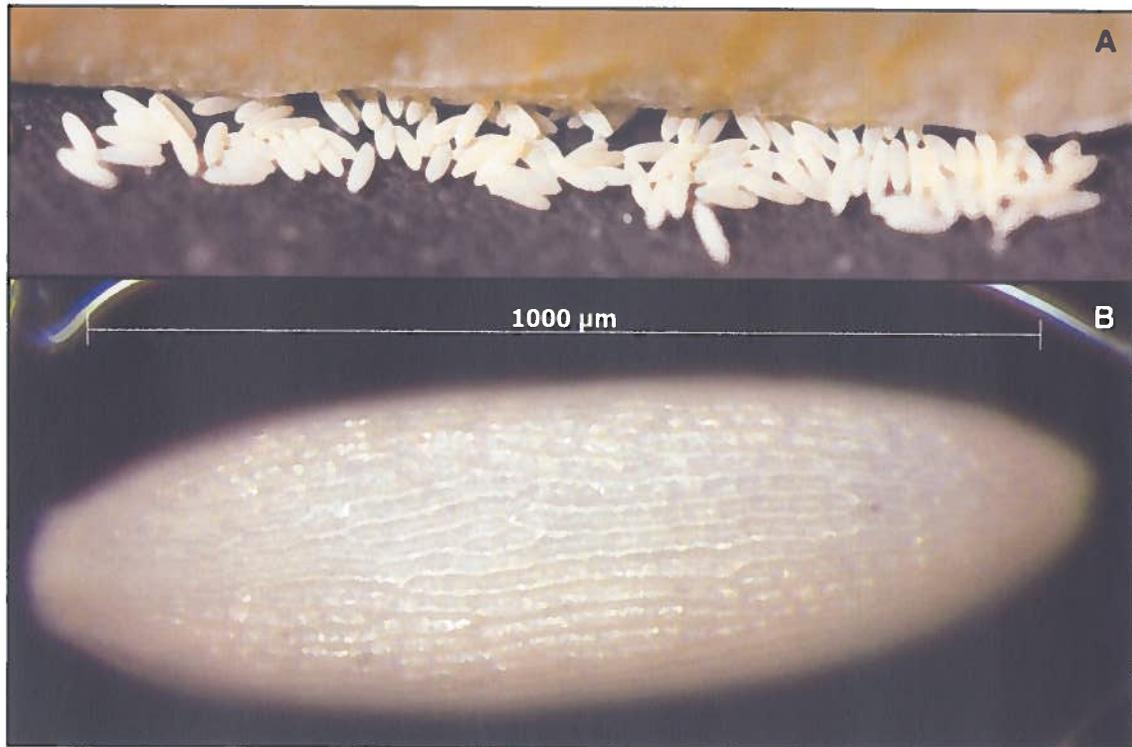
## Oeufs

Les œufs de *D. radicum* sont de couleur blanche, de forme allongée et mesurent environ 1 mm de longueur et 0,3 mm de largeur (figure 3.3) (Hughes *et al.*, 1959, Miles, 1952, Smith, 1927). Leur section postérieure est tronquée et ils présentent des stries longitudinales sur la surface



Figure 3.2 : Stade adulte de *D. radicum*. A : Aspect général; B : Détail des yeux dichoptiques d'une mouche femelle.

ainsi qu'un sillon sur la face ventrale (Brooks, 1951). En conditions de laboratoire, la viabilité des œufs varie entre 60 et 100 %, avec une moyenne située à 86 % (Finch *et al.*, 1969b). Selon Hughes et Salter (1959), l'éclosion des œufs est tributaire de la température et varie de deux à 14 jours en milieu naturel. Finch et Coaker (1969b) ont démontré que lorsque les œufs sont incubés à 20 °C, une accumulation de 51 degrés-jours (base 7,2 °C) est nécessaire pour permettre l'éclosion. Cette éclosion est maximale si les œufs sont assujettis à une humidité relative de plus de 90 %. Par ailleurs, la susceptibilité des œufs à la dessiccation augmente au fil du développement de l'embryon (Finch *et al.*, 1969b). Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % est mortelle et diminue grandement le taux d'éclosion (Neveu *et al.*, 1997), de même qu'une humidité du sol inférieure à 25 % (Lepage *et al.*, 2012).



**Figure 3.3 : Œufs de *D. radicum*. A : Œufs pondus en paquet à la base d'un morceau de rutabaga; B : Détail de la structure externe d'un œuf.**

## Larves

Les larves de *D. radicum* sont des asticots apodes blancs que l'on peut distinguer des autres espèces de diptère par le biais de la structure des pièces buccales ainsi que les caractéristiques des nombreux tubercules présents à l'extrémité caudale (Brooks, 1951, Miles, 1952). Trois

stades larvaires sont présents chez l'espèce. Ils peuvent être différenciés par l'observation des caractéristiques des pièces buccales ainsi que la présence ou l'absence de spiracles antérieurs et le nombre de fentes présentes sur les spiracles postérieurs (Biron *et al.*, 2005, Brooks, 1951). Les larves de premier stade mesurent environ 1 mm et elles peuvent atteindre 8 mm de longueur lorsqu'elles ont complété le troisième et dernier stade (figure 3.4) (Smith, 1927).

C'est en réponse aux isothiocyanates émis par les racines des plantes hôtes que les larves de premier stade s'orientent en direction de leur source d'alimentation (Kostal, 1992). Il a également été démontré que plusieurs bactéries phytopathogènes appartenant aux genres *Erwinia spp.* et *Pseudomonas spp.* sont associées aux larves de *D. radicum* (Doane *et al.*, 1964a). Quoique cette association peut accélérer le développement de pourriture dans les tissus racinaires dont les larves se sustennent, elle semble cependant fortuite et non obligatoire (Doane *et al.*, 1964b). Il est cependant vraisemblable que la flore microbienne entérique des asticots soit en mesure de jouer un rôle important dans leur nutrition en tant que source alimentaire et en augmentant leur capacité digestive (Lukwinski *et al.*, 2006).

Les individus du premier stade immature de *D. radicum* se nourrissent sur les tissus racinaires en creusant des galeries pendant une période d'environ quatre jours en conditions naturelles. Suite à la mue, les larves de second stade font de même pendant six jours et les asticots du troisième stade s'alimentent pendant dix à vingt jours. Suite à cette période, les larves quittent alors les racines pour s'enfoncer dans le sol et amorcer le processus de nymphose (Hughes *et al.*, 1959). La distance parcourue par les larves est fonction de l'étendue du système racinaire et du niveau d'humidité du sol. La majorité des asticots amorcent par contre leur métamorphose dans un rayon de 5 cm autour de la racine principale des plants selon Hughes et Salter (1959) et à une profondeur de 8 à 12 cm d'après Smith (1927).

## **Pupes**

Les pupes sont de couleur brun-orangé foncé et mesurent de 6 à 8 mm de longueur (figure 3.5) (Hughes *et al.*, 1959, Miles, 1952, Smith, 1927). Le puparium est formé de l'exuvie du dernier stade larvaire (Smith, 1927). L'identification des pupes est donc possible par l'observation des protubérances qui constituent les vestiges des tubercules présents à l'extrémité caudale des larves (Miles, 1952).

Le temps de développement des pupes est tributaire de la température auxquelles elles sont soumises. Des températures se situant entre 16,1 °C et 21,7 °C permettent un développement

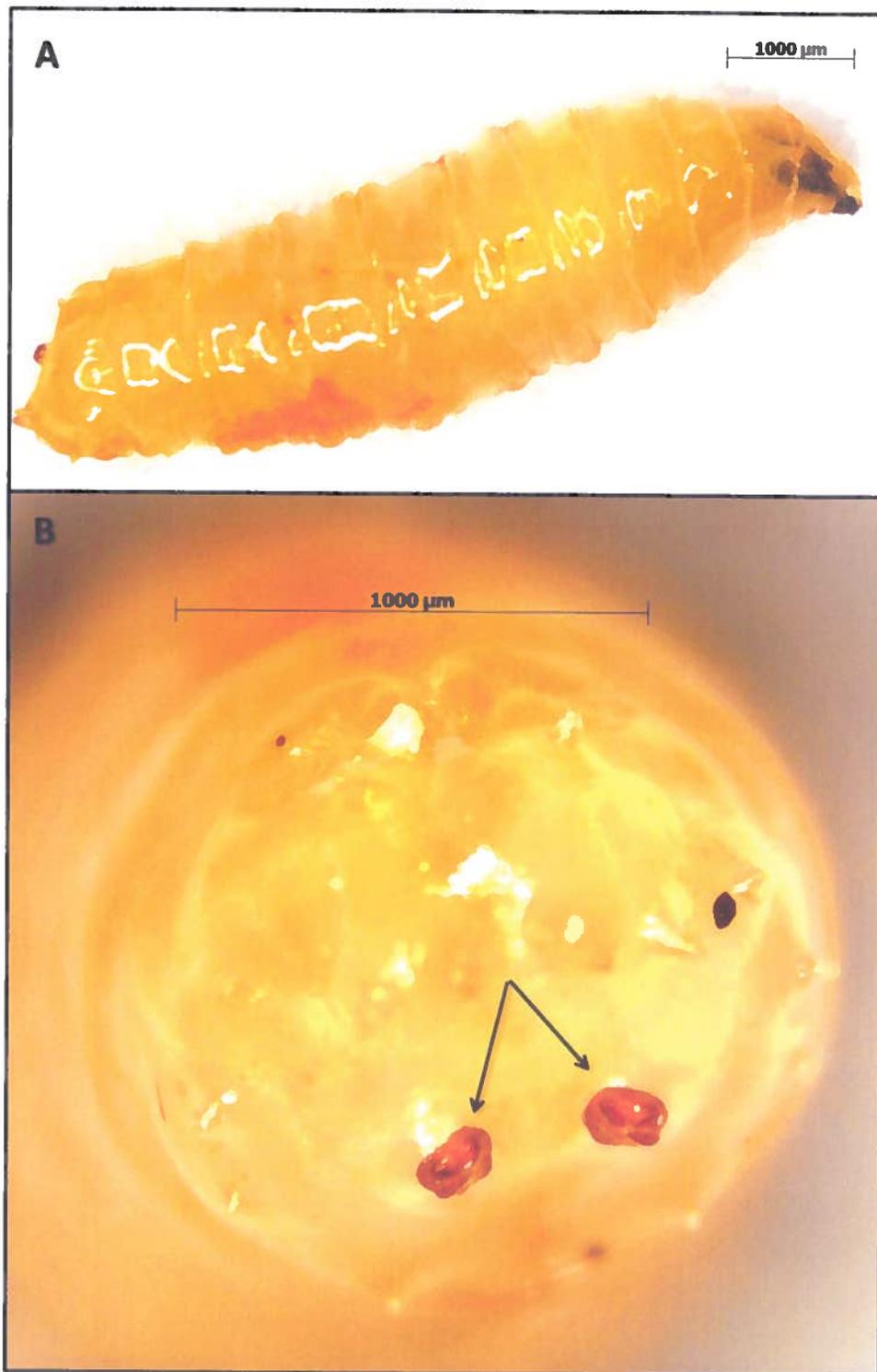


Figure 3.4 : Larves de troisième stade de *D. radicum*. A : Aspect général; B : Détail de la partie postérieure. Les flèches indiquent les deux spiracles munis de trois fentes chacun.

adéquat des imagos présents dans les puparium selon Harris et Svec (1966). L'optimum se situerait à 20 °C car assujettis à cette température, le taux d'émergence des imagos atteint 80 % ((Kozhanchikov, 1939) cité dans (Coaker *et al.*, 1971). En conditions naturelles, le temps de développement des pupes serait de l'ordre de 12 à 18 jours (Coaker *et al.*, 1971). Des températures situées au-delà de 33,5 °C leur sont mortelles (Harris *et al.*, 1966). La résistance au froid varie selon les populations étudiées, la température moyenne de cristallisation oscillant entre -22,8 °C et -25,2 °C (Turnock *et al.*, 1998).

Deux mécanismes physiologiques peuvent agir sur le temps de développement des imagos. Tout d'abord, les larves de troisième stade soumises à des températures inférieures à 15 °C et/ou une photopériode inférieure à 12 heures amorcent la diapause (Collier *et al.*, 1983). Le temps de développement des imagos est également influencé par des températures élevées. En effet, l'exposition des pupes nouvellement formées à des températures supérieures à 20 °C met en veilleuse le développement des imagos par le biais de l'estivation. La proportion des pupes amorçant l'estivation est proportionnelle à l'augmentation de la température, l'optimal étant de 27 °C (Finch *et al.*, 1985).



Figure 3.5 : Aspect général d'une pupa de *D. radicum*.

Une fois l'imago bien développé, l'émergence se fait de façon bimodale (Finch *et al.*, 1983). On distingue deux biotypes distincts contrôlés génétiquement: un dit hâtif qui émerge au plus avant 20 jours à 20 °C (320 degrés-jours au dessus de 4 °C) et un biotype tardif qui émerge au moins

après 30 jours à 20 °C (320 degrés-jours au dessus de 4 °C suivi de 280 degrés-jours au-dessus de 7 °C) (Biron *et al.*, 2002, Biron *et al.*, 1998, Collier *et al.*, 1989). Des différences inter et intra-populations relativement à la proportion des biotypes hâtifs et tardifs ont été rapportées (Finch *et al.*, 1983, Finch *et al.*, 1986, Turnock *et al.*, 1997). Biron et ses collaborateurs (1998) ont également démontré que la diapause n'est pas une condition essentielle pour l'expression de ces biotypes.

## **Voltinisme**

Le nombre de générations complétées annuellement par *D. radicum* varie selon les conditions climatiques auxquelles sont assujetties les populations. En effet, alors que la mouche du chou est univoltine en Russie ((Danilevsky, 1961) cité dans (Coaker *et al.*, 1971)), l'espèce peut compléter deux et trois générations respectivement dans le nord et le sud de l'Angleterre (Coaker *et al.*, 1971). De une à deux générations sont présentes en Norvège (Johansen *et al.*, 2006) alors qu'aux États-Unis on peut observer jusqu'à quatre générations dans l'état de New-York (Jyoti *et al.*, 2003).

Au Canada, trois générations sont présentes dans le sud-ouest de l'Ontario, mais l'espèce est bivoltine dans la région d'Ottawa (Mukerji *et al.*, 1970). Une quatrième génération partielle a été observée dans la région de Guelph (Nair *et al.*, 1975). *D. radicum* est cependant univoltine dans la région du centre de l'Alberta (Broatch *et al.*, 2006) et bivoltine au Manitoba, dans les régions de Portage la Prairie et Winnipeg (Bracken, 1988). Finalement, dans la région de Montréal, trois générations par année ont été observées, ainsi qu'une quatrième génération incomplète (Ritchot, 1968).

## **Méthodes d'élevage**

Afin d'étudier *D. radicum*, plusieurs techniques d'élevage ont été développées et raffinées au fil du temps (Finch *et al.*, 1969b, Harris *et al.*, 1966, Read, 1965, Vereecke *et al.*, 1971, Whistlecraft *et al.*, 1985). Une méthode d'élevage de masse a également été élaborée afin de répondre aux besoins d'un programme de contrôle des populations à l'aide de relâcher de mâles stériles dans l'environnement (Van Keymeulen *et al.*, 1981). La plus grande difficulté reliée au maintien d'un élevage de *D. radicum* est de fournir une source d'alimentation adéquate pour les stades immatures. De par sa grande disponibilité et sa longue capacité de conservation, les méthodes d'élevage citées emploient généralement du rutabaga comme source de nourriture.

Une diète artificielle a été élaborée pour l'alimentation des larves (Dambre-Raes *et al.*, 1976) mais elle ne semble pas avoir été utilisée par la communauté scientifique. Des gains considérables de rendement ont été réalisés par l'ajout d'une source de protéines, généralement de la levure, dans la diète servant à l'alimentation des imagos, ceci ayant un impact positif sur la fécondité des femelles (Finch *et al.*, 1969b, Harris *et al.*, 1966).

## Méthodes de dépistage

Différents modèles mathématiques basés sur l'accumulation de degrés-jours ont été élaborés dans certaines régions afin de prévoir les périodes d'activité de *D. radicum* (Broatch *et al.*, 2006, Collier *et al.*, 1985, Eckenrode *et al.*, 1972, Jyoti *et al.*, 2003, Nair *et al.*, 1975). Afin de mieux tenir compte de la survie des œufs et des jeunes larves, certains auteurs suggèrent par ailleurs d'intégrer dans ces modèles la température du sol, au lieu de la température de l'air, afin d'améliorer leur efficacité (Lepage *et al.*, 2012). Ces modèles peuvent être complétés par différentes méthodes de dépistage des populations. Cependant, seules des techniques simples sont compatibles avec les impératifs de la production car les producteurs agricoles et leurs conseillers ont relativement peu de temps et de ressources à consacrer au dépistage des populations de la mouche du chou (Finch, 1989). Plusieurs types de pièges différents ont été testés afin d'évaluer les niveaux de populations de *D. radicum* et ainsi aider à la prise de décision lorsque vient le temps de traiter contre ce ravageur (Finch, 1990). Entre autre, des pièges jaunes à cuvette d'eau appâtés avec de l'allyle d'isothiocyanate s'avèrent efficaces pour surveiller l'activité saisonnière des mouches adultes (Bracken, 1988). Des plaquettes collantes ont également été testées (Dapsis *et al.*, 1983, Vernon *et al.*, 1996) mais ils entraînent plus de dommages aux spécimens capturés selon Broatch et Vernon (1997). De façon générale, le principal inconvénient des pièges capturant les mouches adultes est qu'ils ne renseignent pas de façon adéquate sur la ponte et le potentiel de dommages sur les cultures (Bracken, 1988).

Le décompte des œufs présents à la base des plants est donc une alternative utilisée dans maintes régions (Meadow, 2003). Au Québec, le Réseau d'Avertissements Phytosanitaire recommande de dépister la présence d'œufs de *D. radicum* en fouillant délicatement le sol autour des plants de façon bihebdomadaire dès l'implantation des cultures. Il sera alors possible de déterminer le meilleur moment d'intervention et de coordonner les pulvérisations insecticides avec l'éclosion des œufs, ce qui permettra de réprimer les jeunes larves. Par contre, la province ne possède pas de seuil d'intervention officiel. Les producteurs doivent donc se rapporter à l'expertise de leurs conseillers horticoles afin de les guider dans l'établissement de leur stratégie

(Roy, 2010). Au Danemark, des pièges de feutrine enroulés au collet des plants sont utilisés pour dépister la présence des œufs et ils ont été à l'origine de l'établissement de seuils d'intervention (Bligaard *et al.*, 1999, Meadow, 2003), la relation entre le nombre d'œufs retrouvés et les dommages observés étant significative (Sears *et al.*, 1986). Une étude canadienne indique par contre que ces pièges manquent de précision en début de saison et sont peu efficaces pour détecter l'initiation de la ponte (Dixon *et al.*, 2002). Enfin, puisque le décompte méthodique de tous les œufs présents aux collets des plants requiert énormément de temps, certains auteurs suggèrent plutôt d'utiliser une technique d'échantillonnage séquentiel binomial basée sur la présence ou l'absence d'œufs (Bligaard, 2001, Mailloux, 2001).

## Méthodes de lutte

### Lutte chimique

La répression des larves de la mouche du chou s'appuie essentiellement sur l'emploi de pesticides de synthèse. En effet, une multitude de composés appartenant à la famille des cyclodiènes (Judge *et al.*, 1968, King *et al.*, 1954), des carbamates et des organophosphorés (Goble *et al.*, 1972, Read, 1970, Straub, 1988) ont été utilisés dans la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle afin de limiter les dégâts d'alimentation causés par les larves et les pertes de rendement subséquentes. Or, dû à l'intense pression de sélection occasionnée, des populations de *D. radicum* résistantes à certaines de ces molécules de synthèse ont rapidement été détectées (McDonald *et al.*, 1975, McEwen *et al.*, 1967, Morris, 1963). De nos jours, les applications d'insecticides appartenant aux familles des carbamates et des organophosphorés jouent encore un rôle prépondérant dans la protection des cultures de crucifères contre *D. radicum* (Chandler *et al.*, 2005). Au Canada, ainsi que dans certaines régions des États-Unis, le chlorpyrifos demeure l'insecticide le plus largement utilisé pour contrôler les larves de la mouche du chou dans les cultures légumières (Anonyme, 2005b, Bruck *et al.*, 2005, Malchev *et al.*, 2010). Aucun insecticide d'origine chimique n'est cependant homologué pour le contrôle des larves de la mouche du chou dans les cultures de canola (Anonyme, 2005a).

Le chlorpyrifos est un insecticide appartenant à la famille des organophosphorés qui agit en inhibant l'action de l'enzyme acétylcholinestérase, une protéine essentielle au fonctionnement adéquat du système nerveux. Il possède un très large spectre d'hôtes, agit par contact, ingestion et inhalation et est utilisé dans une foule de cultures légumières et céréalières. Cette

matière active présente des risques élevés pour la majorité des organismes non-ciblés, tels que les poissons, les oiseaux et les abeilles. Qui plus est, le chlorpyrifos est potentiellement dommageable pour la santé humaine (Anonyme, 2003). Par surcroît, une étude québécoise réalisée dans une zone de production maraîchère intensive révèle que le chlorpyrifos fait partie des insecticides les plus fréquemment détectés dans l'eau de surface. Selon les auteurs, la concentration mesurée dans les échantillons prélevés dépasse les critères de vie aquatique aigu et chronique, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur les espèces animales présentes dans le cours d'eau étudié, ainsi qu'à son aval (Giroux *et al.*, 2010).

À défaut de pouvoir compter sur un réseau de dépistage économiquement rentable, certains producteurs de crucifères préfèrent lutter contre la mouche de chou à l'aide de traitements préventifs à base de chlorpyrifos (Dreves *et al.*, 2006). Par contre, selon Dreves et ses collaborateurs (2006), des producteurs de crucifères de l'ouest de l'Oregon rapportent subir des pertes de rendement reliées à la mouche du chou allant jusqu'à 90 %, et ce même dans les champs ayant reçu des pulvérisations de chlorpyrifos. Or, selon Zimmerman (2003, données non publiées) des populations de *D. radicum* provenant du sud-ouest de la Colombie-Britannique auraient développé une résistance au chlorpyrifos dix fois plus élevée que celle observée chez une population maintenue en laboratoire et ne possédant aucun historique de contact avec cet insecticide (Bruck *et al.*, 2005). La résistance au chlorpyrifos a également été documentée chez des populations de *D. antiqua* dans l'état de New York (Nault *et al.*, 2006). Il y a donc un besoin pour la recherche et le développement d'approches alternatives de lutte pour remplacer la stratégie actuellement basée sur l'emploi d'insecticides chimiques (Jyoti *et al.*, 2001a).

### **Lutte physique et culturale**

Les limites de la lutte chimique et les contraintes imposées par les méthodes de dépistage font en sorte que les producteurs doivent se rabattre sur des méthodes de lutte physique et culturale préventives afin de limiter les dommages causés par *D. radicum*. Une technique simple permettant de limiter les dégâts est tout simplement d'ajuster le calendrier de plantations ou de semis afin d'éviter d'établir des cultures de crucifères en pleine période de ponte (Finch, 1989). Au Canada, les semis ou les plantations effectuées après la mi-juin sont soumis à un risque de dommages beaucoup moins élevé. En effet, lorsque les générations d'été de la mouche du chou se manifestent, les plants sont mieux développés et donc plus en mesure de supporter des dégâts. Les conditions chaudes et sèches qui surviennent en période estivale sont également

un facteur de mortalité chez les œufs (Boivin *et al.*, 1994).

Les producteurs peuvent également avoir recours à des bâches flottantes composées de matériaux divers et disposées sur les plants afin d'empêcher les imagos de pondre leurs œufs (Hoffmann *et al.*, 2001). L'utilisation de barrières d'exclusion bloquant partiellement l'accès au champ de crucifères par les mouches pourrait également être un moyen de contrôle intéressant pour les cultures de choux, de brocolis, de choux-fleurs et de choux de Bruxelles. Le niveau de protection conféré est cependant insuffisant pour permettre la production de rutabagas (Vernon *et al.*, 1998) mais d'autres travaux ont permis d'améliorer davantage ce type de protection et l'exclusion de 80 % des mouches femelles est envisageable (Bomford *et al.*, 2000) tout en étant économiquement rentable comparativement à la lutte chimique (Meadow *et al.*, 2005).

Augmenter la diversité végétale dans les champs cultivés est une autre façon de réduire la pression exercée par la mouche du chou. Ceci peut être effectué par l'utilisation de cultures intercalaires, soit le fait de cultiver deux cultures ou plus en rangs distincts en même temps et dans le même champ (Vandermeer, 1992). Il a été démontré que l'utilisation de cultures intercalaires de pois (Kostal *et al.*, 1994), de trèfle blanc (Dixon *et al.*, 2004) et de laitue (Parsons *et al.*, 2007) dans les champs de crucifères peut perturber le comportement de ponte de *D. radicum* et diminuer considérablement le nombre d'œufs pondus. Cet effet a également été documenté dans l'ouest canadien dans des systèmes de culture intercalaire blé/canola (Hummel *et al.*, 2009)

Finalement, des études ont également été réalisées afin d'identifier les sources et les mécanismes de résistance d'origine végétale. Certaines variétés de moutarde blanche pourraient être une source intéressante de gènes de résistance à incorporer dans un programme d'amélioration génétique des crucifères cultivées (Jyoti *et al.*, 2001b). Des travaux portant sur l'amélioration génétique des variétés de canola (Dosedall *et al.*, 2000) et de rutabaga (Malchev *et al.*, 2010) ont également été réalisés et les résultats semblent prometteurs.

### **Lutte biologique**

Eilenberg et ses collaborateurs (2001) ont proposé une définition de la lutte biologique qui se veut rassembleuse pour les intervenants des différentes disciplines de recherche en lien avec la lutte aux organismes ravageurs des plantes. Selon ce groupe d'auteurs, la lutte biologique se décrit comme étant «*l'utilisation d'organismes vivants dans le but de réprimer la densité de population ou l'impact d'un organisme ravageur spécifique, ce qui a pour effet de rendre ce*

*ravageur moins abondant ou moins dommageable qu'il ne le serait normalement sans intervention*». Toujours selon les mêmes auteurs, la lutte biologique s'articule autour de quatre stratégies différentes, soit la lutte biologique classique, la lutte biologique par inoculation, par inondation et par conservation.

Il est maintenant bien connu que des insectes parasitoïdes et prédateurs sont en mesure de jouer un certain rôle dans la régulation des populations de *D. radicum*. Entre autre, la guêpe *Trybliographa rapae* Westwood (Hymenoptera: Figitidae) est en mesure de parasiter tous les stades larvaires de la mouche du chou, avec cependant une préférence pour les individus du troisième stade (Neveu *et al.*, 2000). Les larves d'*Aleochara bilineata* Gyllenhal et d'*A. bipustulata* L. (Coleoptera: Staphylinidae) sont par ailleurs parasitoïdes des pupes de *D. radicum*. Les imagos de ces deux espèces de staphylins sont également prédateurs des œufs et des larves (Finch, 1989, Fournet *et al.*, 2000). Cependant, des travaux rapportent que l'activité prédatrice de *A. bilineata* envers les œufs de *D. radicum* serait généralement surestimée de par le fait que l'insecte se nourrit seulement des œufs exposés à la surface du sol et non ceux qui sont enfouis dans les crevasses ((Finch *et al.*, 1999) cité dans (Hartfield *et al.*, 2003)).

En Amérique du nord, *A. bilineata* et, dans une moindre mesure *T. rape*, seraient les deux principaux ennemis naturels de *D. radicum*. Cependant, le niveau pression exercé par ces prédateurs n'est pas suffisant pour prévenir entièrement les dommages aux cultures (Turnock *et al.*, 1995). Du côté du continent européen, *A. bipustulata* est également considéré comme un parasitoïde d'importance. Le fait que cette dernière espèce soit absente de l'Amérique du Nord la désigne comme un candidat potentiel pour une introduction au Canada dans le cadre d'un programme de lutte biologique classique (Hemachandra *et al.*, 2007). Des recherches portant sur la spécificité d'*A. bipustulata* attestent du peu de risques que son introduction poserait pour des espèces bénéfiques non-ciblées (Andreassen *et al.*, 2009).

Des chercheurs ontariens ont déjà procédé à des lâchers massifs d'*A. bilineata* dans des jardins potagers, mais les staphylins, préférant quitter les parcelles expérimentales, ont eu peu d'impact sur les populations de *D. radicum* (Tomlin *et al.*, 1992). Des lâchers d'*A. bilineata* ont également été effectués au Royaume-Uni avec un certain succès. Cependant, ces parcelles étaient entourées d'une cage de moustiquaire, ce qui prévenait la dispersion des individus d'*A. bilineata* (Hartfield *et al.*, 2003). Par ailleurs, Ferry et ses collaborateurs (2007) ont récemment identifié une molécule volatile émise par des racines de crucifères infestées par la mouche du chou, le diméthyle bisulfide. Leurs travaux ont démontré que cette molécule s'avère attractive envers *A.*

*bilineata* et *A. bipustulata*. Des tests en parcelles expérimentales ont confirmé le potentiel attractif du diméthyle bisulfide mais les résultats obtenus ne démontrent pas d'effet au niveau de l'incidence des dommages et du nombre de larves et de pupes de *D. radicum* retrouvées dans la rhizosphère des plants (Ferry *et al.*, 2009).

### Lutte microbienne

Suivant Eilenberg et ses collaborateurs (2001), la lutte microbienne est une forme de lutte biologique dans laquelle des microorganismes sont les agents de lutte utilisés. L'utilisation de nématodes entomopathogènes appartenant aux genres *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) et *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) est une approche de lutte microbienne fréquemment expérimentée pour contrôler de nombreux insectes ravageurs. Parmi les insectes ciblés, la mouche du chou est un de ceux ayant reçu le plus d'attention de la part de la communauté scientifique (Georgis *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sont toutefois variables d'une étude à l'autre, voir même décevants (Vänninen *et al.*, 1999a). Le niveau de contrôle observé, tant au laboratoire qu'au champ, varie selon les espèces et les isolats de nématodes, de même que par la méthodologie utilisée (Bracken, 1990, Chen *et al.*, 2003a, Schroder *et al.*, 1996) la température (Chen *et al.*, 2003b) et le stade de développement des larves (Nielsen, 2003). Les conditions environnementales et le moment d'application semblent être les facteurs déterminants dans le succès de cette approche (Georgis *et al.*, 2006).

La bactérie *Bacillus thuringiensis* Berliner est l'agent de lutte microbienne le plus largement utilisé contre les insectes (Lacey *et al.*, 2001). Les différentes variétés de cette bactérie produisent une diversité impressionnante de protéines toxiques envers une panoplie d'insectes de l'ordre des lépidoptères, des coléoptères et des diptères (Schnepf *et al.*, 1998). Par contre, la mouche du chou ne serait pas susceptible au *B. thuringiensis* variété *israelensis* (Krieg *et al.*, 1981), variété pourtant reconnue comme étant hautement efficace envers certains diptères, tels que les moustiques et les mouches noires (Margalith *et al.*, 2000). Des essais en laboratoire ont d'ailleurs confirmé l'inefficacité de deux formulations commerciales de *B. thuringiensis* variété *israelensis* contre les larves de *D. radicum* (données non présentées). D'autres essais ont été effectués en parcelles expérimentales afin de contrôler les stades larvaires de *D. radicum* à l'aide de *B. thuringiensis* variété *thuringiensis* mais les résultats sont peu probants (Havukkala, 1988, Vänninen *et al.*, 1999a). Cette variété est de plus réputée pour produire de la  $\beta$ -exotoxine, ce qui rend pratiquement impossible son utilisation en lutte biologique (Glare *et al.*, 2000).

Les mycètes sont un autre groupe d'agents microbiens ayant un fort potentiel comme agent de

lutte biologique. En effet, plus de 700 espèces différentes de champignons sont reconnues comme étant entomopathogènes (Lacey *et al.*, 2001). Entre autre, plusieurs espèces de champignons appartenant à l'ordre des Entomophthorales (Zygomycetes: Entomophthorales) sont en mesure de causer des épizooties spectaculaires dans les populations d'une grande variété d'insectes différents (Pell *et al.*, 2001). Cependant, des contraintes reliées à la production à grande échelle des Entomophthorales, ainsi qu'à la viabilité de leurs particules infectieuses, limitent leur développement sous forme de bioinsecticide et leur utilisation en lutte biologique par inondation (Goettel *et al.*, 2010, Lacey *et al.*, 2001, Pell *et al.*, 2001). Par contre, certains chercheurs ont expérimenté d'autres approches pour exploiter leur potentiel entomopathogène contre les populations d'insectes ravageurs. Par exemple, une approche de lutte biologique par inoculation à l'aide du champignon *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & Soper permet d'obtenir un certain contrôle sur les populations de la spongieuse *Lymantria dispar* L. (Lacey *et al.*, 2001). De même, à l'aide d'une stratégie dite de conservation, il est possible de lutter contre le puceron du coton, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) à l'aide du champignon *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko (Steinkraus, 2007).

Concernant la mouche du chou, la susceptibilité des imagos aux champignons Entomophthorales *Strongwellsea castrans* Batko & Weiser et *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius est bien documentée (Eilenberg *et al.*, 1999, Eilenberg *et al.*, 1992, Klingen *et al.*, 2000, Thomsen *et al.*, 2000). Ces deux mycètes sont un facteur important de mortalité naturelle au sein des populations de *D. radicum*. Par contre, aucune production *in vitro* des conidies de *S. castrans* ou de *E. muscae* n'a été rapportée dans la littérature scientifique, ce qui limite grandement le potentiel d'utilisation de ces deux mycètes contre la mouche du chou. Des approches de lutte biologique par conservation favorisant l'initiation des épizooties dans les populations pourraient par contre être envisagées (Eilenberg *et al.*, 2003).

À l'opposé, les champignons appartenant à l'ordre des Hypocréales (Ascomycètes: Hypocréales) sont de bons candidats pour une utilisation en lutte biologique par inondation (Goettel *et al.*, 2010, Lacey *et al.*, 2001). Des études témoignent d'ailleurs de la susceptibilité de la mouche du chou à certains de ces champignons entomopathogènes et de leur potentiel comme agent de lutte biologique contre cet insecte (Bruck *et al.*, 2005, Meadow *et al.*, 2000, Vänninen *et al.*, 1999a, Vänninen *et al.*, 1999b). Des efforts doivent cependant être consacrés à la recherche d'isolats possédant une grande virulence (Chandler *et al.*, 2005).

## CHAPITRE 4 : MYCÈTES HYPOCRÉALES

### Utilisation en lutte biologique

Plus de 150 bioinsecticides différents ont été développés avec les champignons entomopathogènes, principalement à l'aide des spores asexuées des mycètes Hypocréales, les conidies (Faria *et al.*, 2007, Jackson *et al.*, 2010). En fait, l'utilisation de ces mycètes en lutte biologique s'exécute principalement selon une approche dite d'inondation (Jaronski, 2010). Cette tactique consiste à appliquer une quantité importante de propagules infectieuses dans l'environnement où se situent les insectes ciblés (Eilenberg *et al.*, 2001). Les champignons Hypocréales possèdent certains attributs qui les rendent intéressants pour ce type de stratégie de lutte, tels que leur spectre d'hôtes étendu, leur facilité de production en milieu artificiel, leur compatibilité avec les équipements de pulvérisations conventionnels et la viabilité de leurs particules infectieuses (Jaronski, 2010). Ils ont donc été utilisés contre une foule d'insectes différents dans plusieurs types d'écosystèmes agricoles et forestiers, avec des résultats cependant variables (Goettel *et al.*, 2010, Inglis *et al.*, 2001). Certains de ces mycètes ont également fait l'objet d'introduction dans le cadre de programme de lutte biologique classique (Hajek *et al.*, 2010). Des approches de lutte biologique par conservation recourant aux mycètes Hypocréales ont également reçu plus d'attention depuis quelques années. Cependant, certaines lacunes quant aux connaissances relatives à leur écologie limitent l'utilisation optimale de cette stratégie (Pell *et al.*, 2010).

### Biologie et taxonomie

Les mycètes de l'ordre des Hypocréales sont généralement reconnus comme étant des organismes hétérotrophes opportunistes. Ils obtiennent leurs nutriments par parasitisme au sein des insectes vivants et par une croissance saprophytique lors de la colonisation post-mortem (Charnley *et al.*, 2007, Hesketh *et al.*, 2010). Leur cycle vital comprend à la fois un stade sexué dit télémorphe et une phase asexuée (anamorphe). Cependant, la plupart de ces champignons produisent principalement des conidies asexuées et peu ou pas de spores sexuées. Ainsi, ils étaient auparavant rangés dans la classe artificielle des Hyphomycètes, au sein de la division des Deutéromycètes (ou Fungi Imperfecti) (Inglis *et al.*, 2001, Tanada *et al.*, 1993). Chez les

Hypocréales, plus de 40 genres différents sont reconnus comme étant entomopathogènes. Les espèces les plus importantes se retrouvent, entre autres, chez les genres *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Isaria* et *Tolypocladium* (Goettel *et al.*, 2010). Toutefois, des techniques de biologie moléculaire ont récemment permis d'effectuer une révision complète de la nomenclature des mycètes, si bien que plusieurs champignons asexués sont maintenant associés à leur stade télémorphes (Blackwell, 2010, Hibbett *et al.*, 2007, Sung *et al.*, 2007). Par exemple, le genre *Cordyceps* (Hypocréales: Clavicipitaceae) serait en fait un regroupement de plus de 25 genres différents de mycètes anamorphes (Sung *et al.*, 2007).

## Spectre d'hôtes et virulence

La pathogénicité est un terme qualitatif se définissant comme étant la capacité ou l'habileté à causer de la maladie alors que la virulence est un terme servant à quantifier le degré de pathogénicité (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). La pathogénicité et le spectre d'hôtes varient selon les espèces de champignons. En effet, alors que certaines espèces s'attaquent seulement à un groupe d'insectes en particulier (par exemple, *Nomuraea rileyi* (F) Samson infecte principalement les lépidoptères (Vimala Devi *et al.*, 2003)), d'autres mycètes tels que *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin et *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin sont en mesure d'infecter une vaste gamme d'hôtes appartenant à plusieurs ordres différents (Zimmermann, 2007a, Zimmermann, 2007b). Par contre, la diversité génétique présente au sein d'une espèce fait en sorte que la virulence varient selon les isolats, comme en témoigne plusieurs études (Butt *et al.*, 1994, Leland *et al.*, 2005, Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000, Quesada-Moraga *et al.*, 2006b, Sabbahi *et al.*, 2008b, Shan *et al.*, 2010, Wraight *et al.*, 2010). Ceci fait donc en sorte que la sélection de l'isolat est plus importante que le choix de l'espèce aux fins du développement d'un outil de lutte biologique (Goettel *et al.*, 2010).

Certaines études ont par ailleurs permis de corréler la virulence des isolats à des attributs tels que la grosseur des conidies, la rapidité de germination, la capacité d'adhérer à la cuticule et la production de toxines et d'enzymes (Altre *et al.*, 1999, Fang *et al.*, 2005, Gupta *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2003, Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010, Quesada-Moraga *et al.*, 2006b, Wang *et al.*, 2007). Par contre, la croissance répétée sur des milieux de culture artificiels peut conduire à une perte de virulence chez certains isolats (Butt *et al.*, 2006, Loesch *et al.*, 2010, Morrow *et al.*, 1989, Safavi, 2011, Shah *et al.*, 2007) alors que d'autres demeurent stables (Ansari *et al.*, 2011, Brownbridge *et al.*, 2001). Enfin, le passage *in vivo* au sein d'un hôte peut parfois permettre aux isolats de

retrouver leur virulence (Fargues *et al.*, 1983, Prenerová, 1994, Shah *et al.*, 2005).

## **Pathogenèse**

Contrairement aux agents entomopathogènes d'origine virale et bactérienne, les champignons Hypocréales infectent principalement les insectes suite au contact direct de la cuticule (Clarkson *et al.*, 1996, Gillespie *et al.*, 2000, St Leger, 1993). Toutefois, l'invasion par le système digestif est possible mais le pH de l'estomac, sa microflore et la faible disponibilité de l'oxygène entravent les infections par cette voie (Boucias *et al.*, 1998).

### **La cuticule**

Chez les insectes, la cuticule est la première barrière limitant l'invasion par les champignons entomopathogènes (Gillespie *et al.*, 2000, Hajek *et al.*, 1994). Elle est composée de deux couches, soit la procuticule et l'épicuticule. Cette dernière est plutôt mince mais complexe, renfermant plusieurs types de protéines et une couche cireuse composée d'acides gras, de lipides et de stérols. Elle ne contient cependant pas de chitine. La procuticule est la partie prépondérante de la cuticule et est située sous l'épicuticule. Elle est composée d'une matrice de protéines, de lipides et de quinones traversée par des fibres de chitine, un polysaccharide similaire à la cellulose (Clarkson *et al.*, 1996, Gillespie *et al.*, 2000, Vincent *et al.*, 2004). La cuticule est sécrétée par une couche de cellules épidermiques qui recouvrent le corps de l'insecte en entier, de même que le système respiratoire et digestif et une partie du système reproducteur (Vincent *et al.*, 2004). Les endroits de prédilection pour une infection optimale par les conidies seraient les pièces buccales, les spiracles et les sections inter segmentaires. En effet, ces endroits facilitent la germination des conidies de par l'humidité relative élevée retrouvée dans leur microenvironnement. De plus, l'épaisseur de la cuticule à ces endroits est généralement plus mince, ce qui facilite la pénétration par les mycètes (Charnley *et al.*, 2007, Tanada *et al.*, 1993, Zimmermann, 2007a). L'infection de la cuticule des insectes par les champignons Hypocréales s'exécute généralement selon les mêmes processus et ce peu importe l'espèce. Les événements menant au développement de la mycose se regroupent en quatre étapes, soit l'adhésion des conidies à la cuticule et la germination de celles-ci, suivi de la pénétration de la cuticule et la prolifération dans les tissus des insectes (Inglis *et al.*, 2001).

## L'adhésion

L'adhésion des conidies sur la cuticule est l'étape initiale conduisant à l'expression de la pathogénicité. Cette phase est généralement passive et non-spécifique, mais peut parfois être assistée par certains facteurs abiotiques tels que les mouvements d'air et d'eau. Ce sont principalement les propriétés hydrophobes des conidies qui gouvernent leur adhésion. Cependant, elle peut aussi être influencée par la topographie et la composition chimique de la cuticule (Boucias *et al.*, 1988, Boucias *et al.*, 1991, Sosa-Gomez *et al.*, 1997). L'hydrophobicité des conidies leur confère également une protection contre la dessiccation (Boucias *et al.*, 1988). Ce sont des protéines riches en cystéines nommées hydrophobines présentes à leur surface qui seraient responsables de l'hydrophobicité des conidies (Bidochka *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2011). Une corrélation a également été établie entre l'hydrophobicité des conidies et la teneur en hydrates de carbones présents à leur surface (Jeffs *et al.*, 1999). Les conidies de certaines espèces sont cependant hydrophiles et leur attachement sur la cuticule s'effectue plutôt au moyen d'une couche mucilagineuse adhésive produite lors de la maturation des conidies (Boucias *et al.*, 1991).

Dans une moindre mesure, des mécanismes de reconnaissance plus spécifiques impliquant des lectines, des polysaccharides, des glycoprotéines et des enzymes extracellulaires sont également mis en œuvre afin de consolider l'adhésion des conidies à la cuticule (Boucias *et al.*, 1991, Tanada *et al.*, 1993). Par exemple, chez *M. anisopliae*, la protéine MAD1 procure une interaction étroite et spécifique venant probablement remplacer l'action des hydrophobines (Wang *et al.*, 2007). Des antigènes présents sur la surface des conidies sembleraient également être impliqués dans le processus d'adhésion et de spécificité (Rath *et al.*, 1996).

## La germination

La germination des conidies est tributaire des conditions environnementales (température, humidité) et, dans une moindre mesure, des conditions de luminosité. Par exemple, une humidité relative de 90 % ou plus est essentielle dans le microenvironnement des conidies pour assurer une germination optimale (Tanada *et al.*, 1993). Si ces conditions sont favorables, les conidies vont donc germer et produire un tube germinatif suivi, chez certaines espèces, d'un appressorium permettant de pénétrer la cuticule (Boucias *et al.*, 1991). La présence de certains acides gras et de lipides présents dans l'épicuticule peut par contre ralentir ou inhiber ce processus (Boucias *et al.*, 1991, Lecuona *et al.*, 1997, Ment *et al.*, 2010, Sosa-Gomez *et al.*,

1997). Chez la plupart des insectes, la cuticule contient en effet des composés fongistatiques qui entravent la germination des conidies (Gillespie *et al.*, 2000). Des phénomènes d'antibiose causés par la flore saprophyte présente sur la cuticule des insectes peuvent également entraver le processus de germination (Charnley, 1989). Au moment de la germination, il peut également y avoir production d'un mucilage hygroscopique conférant aux conidies une protection supplémentaire contre la dessiccation et consolidant leur adhésion sur la cuticule (Boucias *et al.*, 1991).

### **La pénétration**

C'est grâce à une concertation d'actions enzymatiques et de processus physiques que les champignons entomopathogènes créent des brèches dans la cuticule (St Leger, 1993, Tanada *et al.*, 1993). La pénétration de la cuticule se fait directement par le tube germinatif ou par un hyphé produit sous l'appressorium. L'appressorium serait en fait le fruit d'une adaptation évolutive de la part des mycètes servant à concentrer les énergies chimiques et mécaniques sur une superficie restreinte, rendant le processus de pénétration plus efficient. Sa paroi cellulaire poreuse facilite par ailleurs le passage des enzymes extracellulaires qui y sont produites (Hajek *et al.*, 1994, St Leger, 1993). Plusieurs études ont démontré que la formation d'appressorium est influencée par la composition et la topographie de la cuticule (Butt *et al.*, 1995, St Leger, 1993, St Leger *et al.*, 1989, St Leger *et al.*, 1991, Vestergaard *et al.*, 1999).

Une panoplie de protéases, de chitinases et de lipases s'attaquant aux constituants de la cuticule sont produites par les mycètes entomopathogènes pour faciliter la pénétration (Khachatourians *et al.*, 2008). Plusieurs de ces enzymes ont d'ailleurs été étudiées chez *M. anisopliae*, telles que les protéines PR1 et PR2 (Clarkson *et al.*, 1996, St Leger *et al.*, 1987). Le mucilage produit lors de la germination des conidies génère également un microenvironnement favorable pour les enzymes extracellulaires d'origine fongique (Boucias *et al.*, 1991). Par exemple, une production d'ammoniaque a été observée chez *M. anisopliae*, permettant ainsi une élévation du pH local et favorisant une action optimale des enzymes produites (St Leger *et al.*, 1999). Finalement, au niveau des sites de pénétration, de sombres lésions mélanisées peuvent être observées et témoignent de la dégradation de la cuticule (Vestergaard *et al.*, 1999).

## La prolifération

Une fois pénétrés à l'intérieur de l'insecte, les mycètes entomopathogènes vont croître sous forme d'hyphes ou de blastospores, des hyphes unicellulaires de type levure, et se disséminer au sein de l'hémolymphe par bourgeonnement (Tanada *et al.*, 1993). Ils doivent préalablement contrer les mécanismes de défense de l'hôte déployés par l'immunité humorale (production de phénoloxidasés, de lectines, et d'inhibiteurs de protéases) et l'immunité cellulaire (phagocytose et encapsulation) (Gillespie *et al.*, 2000). La mort de l'insecte survient habituellement de trois à sept jours plus tard et est attribuable à une combinaison d'évènements comme la production et la sécrétion de toxines insecticides par le mycète, la compétition pour les ressources nutritives et l'invasion des organes menant à l'obstruction des fonctions vitales (Inglis *et al.*, 2001). Une fois l'insecte décédé, les mycètes entomopathogènes vont continuer de croître de façon saprophytique à l'intérieur du cadavre. À ce moment, ils peuvent rencontrer une opposition de la part de la flore microbienne de l'insecte (Boucias *et al.*, 1998). Diverses toxines antibactériennes et antifongiques sont donc produites par les mycètes afin de faciliter la colonisation post-mortem (Hajek *et al.*, 1994, Vey *et al.*, 2001). Par contre, la mort de l'insecte et la manifestation de la muscardine ne sont pas une finalité en soi. En effet, des études témoignent des séquelles engendrées par des infections sous-létales telles que des malformations, une réduction de la longévité et des effets préjudiciables sur la fertilité (Castillo *et al.*, 2000, Daniel *et al.*, 2009, Fargues *et al.*, 1991, Mulock *et al.*, 2001, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a, Quesada-Moraga *et al.*, 2004, Torrado-León *et al.*, 2006).

Si l'insecte succombe et si les conditions telles que l'humidité et la température sont favorables, les hyphes vont émerger principalement aux jonctions inter segmentaires de la cuticule, recouvrir la surface du cadavre et produire de nouvelles conidies. Cet enrobage est couramment dénommé muscardine et prend différentes couleurs selon le microorganisme en cause (Tanada *et al.*, 1993). À maturité, ces conidies seront éjectées dans l'environnement et disséminées de façon passive par le vent et la pluie, entre autre, pour éventuellement infecter d'autres insectes (Inglis *et al.*, 2001). La production de conidies est cependant soumise à des variations intra et inter spécifiques et demeure tributaire de la disponibilité de certains nutriments et de la grosseur de l'insecte infecté (Goettel *et al.*, 2010).

## Facteurs influençant la susceptibilité des insectes

Plusieurs facteurs physiologiques et morphologiques peuvent influencer la susceptibilité des

insectes envers les mycètes entomopathogènes. Pour n'en citer que quelques uns, mentionnons la densité de population, l'âge, le statut nutritionnel, la génétique, les comportements et la présence de blessures d'origine chimique, mécanique ou biotique (Inglis *et al.*, 2001).

Le statut nutritionnel de l'insecte est un facteur prépondérant dans la prédisposition aux agents pathogènes, une nutrition inadéquate pouvant augmenter la susceptibilité des individus. En effet, il a été démontré que la vulnérabilité aux infections d'origine fongique peut être accrue lorsque les insectes s'alimentent sur des diètes artificielles ou inadéquates (Goettel *et al.*, 1993, Lord, 2010). Également, il a été observé qu'un état de jeûne peut augmenter la susceptibilité de certains insectes aux mycètes entomopathogènes (Altre *et al.*, 2001, Furlong *et al.*, 2003, Lord, 2010).

Le stade physiologique de l'insecte peut également influencer sa susceptibilité aux infections par les mycètes. Par exemple, les jeunes mouches de *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) sont moins disposées à succomber aux mycètes entomopathogènes que leurs comparses plus âgées (Daniel *et al.*, 2009). À l'inverse, chez les imagos de *Ceratitis capitata* Wiedemann, *C. cosyra* Walker et *C. fasciventris* Bezzi (Diptera: Tephritidae), ce sont les spécimens les plus âgés qui s'avèrent les plus résistants aux infections causées par *M. anisopliae* (Dimbi *et al.*, 2003b). L'âge des imagos ne semblent cependant pas être un facteur influençant la virulence des mycètes *B. bassiana* et *M. anisopliae* chez *D. antiqua* et *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (Kaufman *et al.*, 2008, Rizzo, 1977). Également, selon Boucias et Pendland (1998), le mycète *N. rileyi* infecte les jeunes chenilles de lépidoptères mais les individus des derniers stades larvaires, de même que les œufs, les pupes et les adultes, s'avèrent habituellement moins vulnérables. D'autres champignons tels que *B. bassiana* et *M. anisopliae* infectent généralement les stades larvaires et les imagos des insectes susceptibles. Cependant, les différents isolats de ces mycètes démontrent généralement une variabilité de leur virulence en fonction des stades attaqués. Par exemple, le stade larvaire de la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) s'avère généralement plus résistant aux mycètes entomopathogènes comparativement aux adultes (Pilz *et al.*, 2007). Ceci est également le cas pour *D. antiqua* (Davidson *et al.*, 2005). Par contre, il n'apparaît pas y avoir de règle générale permettant de déterminer les stades les plus susceptibles chez les insectes (Goettel *et al.*, 2010). Enfin, selon Tanada et Kaya (1993), les larves ayant récemment muées et les pupes nouvellement formées seraient plus vulnérables de par le fait que leur cuticule est plus mince. Par contre, la mue et la perte de l'exuvie peut également permettre à

l'insecte de se débarrasser des agents entomopathogènes présents à la surface de la cuticule (Boucias *et al.*, 1998, Vandenberg *et al.*, 1998)

## Mycètes d'intérêts

### *Tolypocladium cylindrosporum* Gams

Le genre *Tolypocladium* est notoire pour sa capacité à produire de la cyclosporine A, un peptide jouant un rôle immunosuppresseur important lors des transplantations d'organes (Aarnio *et al.*, 1989). Il fut autrefois confondu avec le genre *Beauveria* sur la base de certains critères morphologiques (von Arx, 1986) mais il est maintenant reconnu comme étant distinct de par les résultats de tests biochimiques (API 50CH) montrant différents profils d'utilisation d'hydrates de carbone (Todorova *et al.*, 1998). Le champignon *Tolypocladium cylindrosporum*, isolé par Gams en 1971, est un mycète saprophyte, terricole et/ou aquatique (Weiser *et al.*, 1981). Il est reconnu comme étant pathogène envers les stades larvaires de quelques espèces de diptères du sous-ordre des nématocères, principalement les moustiques (*Aedes spp.* et *Culex spp.*) (Samson *et al.*, 1984, Soares Jr., 1982, Soares Jr. *et al.*, 1985). Toutefois, ce champignon est également en mesure d'infecter *Sylvicola cinctus* (Diptera: Anisopodidae) (Ekbom, 1993), *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) (Nadeau *et al.*, 1994) ainsi que certains lépidoptères (Lam *et al.*, 1988, Steenberg *et al.*, 2000) et des acariens (Herrero *et al.*, 2011, Zabalgogezcoa *et al.*, 2008). Plus près phylogénétiquement des espèces appartenant au genre *Delia*, il a été démontré que les asticots et les imagos de *M. domestica* étaient également susceptibles à *T. cylindrosporum* (Barson *et al.*, 1994, Lam *et al.*, 1988). De plus, des chercheurs ont récemment découvert que ce champignon était hautement pathogène envers les larves de certains membres de la famille des Calliphoridae, tels que *Lucillia sericata* Meigen et *L. cuprina* Wiedemann (Wright *et al.*, 2009).

Des travaux ont établi que *T. cylindrosporum* infectent ses hôtes par la cuticule externe, mais également par voie orale lors de prise alimentaire (Goettel, 1988, Soares Jr., 1982, Weiser *et al.*, 1981). Par ailleurs, les blastospores seraient plus virulentes que les conidies chez *Aedes sierrensis*, *A. triseriatus* et *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) (Nadeau *et al.*, 1994, Soares Jr., 1982). Des études ont de plus illustré que certains isolats de *T. cylindrosporum* produisent des molécules possédant des propriétés insecticides nommées efrapeptines (Vey *et al.*, 2001). Enfin, selon Scholte et ses collaborateurs (2004), les essais sur le terrain destinés à lutter contre les larves de moustiques en milieu aquatique avec ce mycète n'ont pas été très convaincants.

Sur la base de ce constat, l'intérêt que portait la communauté scientifique envers ce mycète comme agent de lutte biologique s'est estompé. D'ailleurs, aucun bioinsecticide élaboré avec *T. cylindrosporium* n'a été commercialisé en date de 2007 (Faria *et al.*, 2007).

Des études ont confirmé que les pupes de *D. antiqua* n'étaient pas affectées par *T. cylindrosporium*. Toutefois, l'isolat testé était en mesure d'occasionner une très légère mortalité chez les mouches adultes émergées des pupes ayant été mises en contact avec les particules infectieuses (Poprawski *et al.*, 1985). Lam et ses collaborateurs (1988) ont par la suite été les premiers à documenter la susceptibilité des larves de la mouche du chou à *T. cylindrosporium* en réussissant à infecter 30 % des individus traités avec des blastospores. Ultérieurement, lors d'essais au champ, des chercheurs ont observé une réduction significative du nombre de pupes de *D. radicum* retrouvées dans la rhizosphère de plants de choux suite à une application au sol d'un isolat de ce champignon. Par contre, aucune incidence sur le calibre des choux à maturité n'a été observée. Malgré ces résultats intéressants, les auteurs n'ont pas répété l'expérience (Vänninen *et al.*, 1999a). En Norvège, d'autres chercheurs ont réalisé des activités de dépistage à la recherche de champignons entomopathogènes en appâtant des échantillons de sols avec des larves de *D. floralis* et de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Il s'est avéré que *T. cylindrosporium* a été plus fréquemment isolé sur *D. floralis* que sur *G. mellonella*. (Klingen *et al.*, 2002a). Les auteurs concluent donc, entre autres, que les larves de *D. floralis*, un diptère apparenté à *D. radicum*, sont probablement plus vulnérables aux infections causées par *T. cylindrosporium* que celles de *G. mellonella*.

À la lumière de ces résultats, des épreuves biologiques ont été réalisées afin de déterminer la susceptibilité des œufs et des larves de *D. floralis* à trois isolats de *T. cylindrosporium* d'origine norvégienne (Klingen *et al.*, 2002c). Un des isolat testé (ARSEF 5525) s'est avéré en mesure de réduire de façon significative la longévité des jeunes larves suivant l'éclosion lorsque les œufs étaient préalablement immergés dans une suspension de  $1 \times 10^7$  conidies/ml. De plus, ce même isolat a occasionné jusqu'à 26 % de mortalité chez les larves âgées de une à deux semaines. Par contre, du rutabaga râpé était offert aux larves comme source de nourriture, ce qui, selon les auteurs, aurait pu diminuer la virulence des isolats testés. En effet, des études ont démontré que le 2-phenylethyl isothiocyanate, un produit de l'hydrolyse du 2-phenylethyl glucosinolate, pouvait inhiber ou ralentir la croissance de *M. anisopliae* et de *T. cylindrosporium* (Inyang *et al.*, 1999, Klingen *et al.*, 2002b). Or, le rutabaga contient beaucoup de 2-phenylethyl glucosinolate (Birch *et al.*, 1992). Les auteurs ont donc suggéré de développer un protocole n'utilisant pas de rutabaga râpé comme source de nourriture afin de poursuivre l'évaluation du potentiel

entomopathogène de *T. cylindrosporum* sur les larves de *D. floralis*. Finalement, des données non publiées, citées par Klingen et ses collaborateurs (2002c) signalent qu'une réduction de l'émergence des adultes de l'ordre de 36 % a été observée suite à l'exposition de larves de troisième stade de *D. radicum* à *T. cylindrosporum* quelque temps avant la métamorphose en pupes.

### ***Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin**

Le champignon *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin a été décrit pour la première fois en 1879 par Metchnikoff suite à la découverte de la maladie de la muscardine verte sur des larves d'*Anisoplia austriaca* Hrbst. (Coleoptera: Scarabaeidae) Les travaux de Sorokin en 1883 ont ensuite permis de classer le mycète dans le genre *Metarhizium* (Zimmermann, 2007b). Ce genre possède une distribution mondiale et il est composé de plusieurs groupes génétiques distincts ayant probablement un ancêtre commun d'origine sud-asiatique (Bidochka *et al.*, 2005). Suite à une révision de la nomenclature des organismes fongiques, *M. anisopliae* est maintenant classé dans le groupe monophylétique A de la famille des Clavicipitaceae (Sung *et al.*, 2007). C'est un mycète qui est fréquemment détecté dans les sols de divers écosystèmes agricoles et forestiers (Bidochka *et al.*, 2001, Keller *et al.*, 2003, Klingen *et al.*, 2002a, Medo *et al.*, 2011, Meyling *et al.*, 2011, Vänninen, 1996). Des travaux attestent également de la capacité de certains isolats à coloniser la rhizosphère dans les sols (Hu *et al.*, 2002) et dans les milieux de croissance artificiels à base de mousse de sphaigne (Bruck, 2005). L'espèce produit par ailleurs plusieurs types de toxines, notamment plus de 27 destruxines différentes qui s'avèrent toxiques chez certaines espèces d'insectes (Vey *et al.*, 2001). Enfin, une étude réalisée en 2007 indique que 61 bioinsecticides différents ont été élaborés à l'aide de *M. anisopliae* (incluant la variété *acridium*), soit 35,7 % de tous les bioinsecticides d'origine fongique produits (Faria *et al.*, 2007). L'isolat F52, fréquemment mentionné dans la littérature scientifique, est d'ailleurs disponible commercialement sous la forme du bio-insecticide granulaire Met52™ (Novozymes Bioag Limited, Saskatoon, SK, Canada). Ce bioinsecticide est homologué au Canada depuis 2009 pour lutter contre le charançon noir de la vigne, *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius, et contre le charançon de la racine du fraisier, *Otiorhynchus ovatus* L., (Coleoptera: Curculionidae) dans les cultures de plantes ornementales cultivées en contenant. Cette formulation est constituée de conidies de l'isolat F52 déposées sur des grains de riz agissant à titre de support. Le produit possède une concentration de  $9 \times 10^8$  UFC par gramme (Anonyme, 2009).

Quoique son spectre d'hôtes est considéré comme étant plus étroit que celui de *B. bassiana*, le

mycète *M. anisopliae* infecte tout de même des insectes appartenant à plusieurs ordres différents avec toutefois une spécificité au niveau de l'isolat et des génotypes (Bidochka *et al.*, 2005, Zimmermann, 2007b). En effet, ce champignon est en mesure d'infecter plusieurs insectes de l'ordre des coléoptères comme les imagos du scarabée japonais *Popillia japonica* Newman (Scarabaeidae) (Lacey *et al.*, 1994) et de l'agrile du frêne, *Agilus planipennis* Fairmaire (Buprestidae) (Liu *et al.*, 2006) ainsi que le stade larvaire et adulte de la chrysomèle des racines du maïs (Chrysomelidae) (Pilz *et al.*, 2007). Le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* Forskal, un orthoptère, lui est également susceptible (Blanford *et al.*, 2001) et a été la cible d'un imposant programme de lutte biologique élaboré à l'aide de *M. anisopliae* var. *acridium* (Langewald *et al.*, 2007). Ce mycète est aussi pathogène envers la blatte germanique, *Blattella germanica* L. (Blattodea: Blattellidae) (Quesada-Moraga *et al.*, 2004) et *G. mellonella* (Klingen *et al.*, 2002c).

Comme en témoigne une étude danoise portant sur les mouches associées aux élevages bovins, *M. anisopliae* ne semble pas être un pathogène affectant fréquemment les diptères adultes. En effet, aucune infection naturelle n'a été détectée parmi plus de 4 000 échantillons analysés lors de cette recherche (Steenberg *et al.*, 2001). En conditions de laboratoire, la susceptibilité des imagos est cependant bien documentée chez certains membres de la famille des Tephritidae (Castillo *et al.*, 2000, Daniel *et al.*, 2009, Dimbi *et al.*, 2003a, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a), des Muscidae et des Calliphoridae (Angel-Sahagún *et al.*, 2005, Barson *et al.*, 1994, Lohmeyer *et al.*, 2006, Wright *et al.*, 2004). Des travaux témoignent également de la pathogénicité de certains isolats de *M. anisopliae* chez les stades larvaires de *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) (Alves *et al.*, 2002), de la mouche domestique, *Musca domestica* (Muscidae) (Barson *et al.*, 1994, Mishra *et al.*, 2011), de certaines mouches à fruits de la famille des Tephritidae (Cossentine *et al.*, 2011, Ekesi *et al.*, 2002, Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000), de la mouche de la betterave à sucre, *Tetanops myopaeformis* Röder (Ulidiidae) (Jonason *et al.*, 2005) et de la mouche des cornes, *Haematobia irritans* L. (Muscidae) (Mochi *et al.*, 2010a).

Concernant les diptères appartenant au genre *Delia*, aucune infection d'origine naturelle ne semble avoir été documentée chez les larves et ce malgré le fait que leur comportement alimentaire les expose probablement au champignon (Eilenberg *et al.*, 2003). Quelques études de laboratoire permettent cependant d'apprécier la pathogénicité de *M. anisopliae* envers ces asticots. Tout d'abord, dans une recherche publiée en 2002, des chercheurs ont observé que les larves de *D. floralis* n'étaient pas susceptibles à l'isolat ARSEF 5520 de *M. anisopliae* (Klingen *et al.*, 2002c) malgré le fait que cet isolat fut détecté dans un échantillon de sol en

utilisant ce même insecte comme appât (Klingen *et al.*, 2002a). Par contre, comme il a été décrit précédemment, il est probable que l'isolat étudié ait été affecté par l'utilisation de rutabaga râpé comme source de nourriture pour l'alimentation des larves (Klingen *et al.*, 2002c). Des expériences de criblage ont par ailleurs démontré que seuls les isolats de *M. anisopliae* étaient en mesure d'occasionner plus de 30 % de mortalité chez les larves de troisième stade de *D. antiqua* s'alimentant sur une diète artificielle. Un isolat provoquant la mort de 92,5 % des asticots soumis aux conidies s'est d'ailleurs distingué (Davidson *et al.*, 2005).

Des essais ont également été réalisés en laboratoire afin d'attester de la pathogénicité de quatre isolats d'origine finlandaise de *M. anisopliae* chez les larves de second et troisième stade de *D. radicum*. Malheureusement, les résultats obtenus par ces expériences laissent perplexes puisque le taux de mortalité dans les traitements témoins était de 40 %. Par contre, deux isolats testés ont procuré une mortalité additionnelle de l'ordre de 40 à 50 % en tenant compte de la mortalité dans les groupements témoins (Vänninen *et al.*, 1999b). Lorsque la mortalité dans les groupements témoins est supérieure à 15-20 % dans les épreuves biologiques, les résultats obtenus doivent cependant être interprétés avec précautions (Butt *et al.*, 2000). Plus récemment, trois isolats de *M. anisopliae* se sont clairement avérés pathogènes pour les larves de second stade de *D. radicum* en conditions de laboratoire. Dans cette dernière étude, l'isolat F52 est celui ayant offert le meilleur contrôle sur les larves avec une mortalité observée de l'ordre de 72 % et 85 % selon la concentration utilisée. En guise de conclusion de leur article, les auteurs ont donc recommandé de réaliser des essais au champ pour valider l'efficacité de cet isolat en conditions réelles (Bruck *et al.*, 2005). À ce sujet, d'autres chercheurs sont d'avis que des lâchers massifs d'un isolat de *M. anisopliae* hautement virulent envers *D. radicum* auraient un bon potentiel comme outil de lutte biologique (Eilenberg *et al.*, 2003).

Cependant, les expériences antérieures menées en serres et en champs pour vérifier le potentiel de *M. anisopliae* comme agent de lutte microbienne chez les larves de *D. radicum* se sont avérées peu probantes en général. Dans des essais réalisés en serres, Vänninen et ses collaborateurs (1999b) ont observé de légères diminutions des dommages observés aux racines chez des plants de chou et de rutabaga traités avec certains isolats de *M. anisopliae*. Par contre, aucune différence significative ne se manifeste au niveau du nombre de pupes retrouvées dans la rhizosphère des plants soumis aux traitements. Dans une série d'expériences réalisées en parcelles expérimentales au champ, le seul résultat significatif obtenu consiste en une légère augmentation de rendement dans les parcelles de choux-fleurs traitées de façon prophylactique à l'aide de suspensions de conidies de *M. anisopliae*

comparativement aux parcelles témoins non traitées. Le rendement des parcelles traitées était cependant inférieur de 81 à 85 % des rendements obtenus dans les parcelles témoins traitées avec l'insecticide Diazinon (Vänninen *et al.*, 1999a).

Malgré ce constat, des chercheurs anglais ont entrepris à leur tour des essais de ce type à l'aide d'isolats de *M. anisopliae* qui s'étaient auparavant avérés pathogènes chez *D. antiqua* (Davidson *et al.*, 2005). En serres, quatre applications d'une suspension de conidies ( $1 \times 10^8$  conidies/ml) sur le substrat de culture à la base de plants de chou ont permis une réduction significative de l'ordre de 90 % du nombre de larves et de pupes de *D. radicum* retrouvées dans la rhizosphère. Des essais en champs sur des cultures de chou-fleur ont toutefois été peu concluants car aucune réduction sur le nombre de larves et de pupes n'a été observée comparativement aux parcelles témoins. Malgré tout, près de 30 % des cadavres de larves retrouvés dans les parcelles traitées avec *M. anisopliae* ont exhibé la muscardine verte suite à une période d'incubation. Puisqu'ils ont observé beaucoup de mouvement latéral suite à l'application des suspensions, les chercheurs ont conclu que les conidies n'étaient pas pleinement en mesure d'atteindre les larves dans le sol. Plusieurs facteurs auraient été en mesure de limiter l'expression de la pathogénicité de l'isolat testé dont le type de sol, son niveau d'humidité et sa température ainsi que différents facteurs biotiques. À la lumière de ces résultats, Chandler et Davidson (2005) ont donc suggéré de concentrer les efforts de recherche sur la découverte d'isolats plus virulents, sur le développement d'une méthode d'application plus efficace et de réaliser des études plus approfondies sur la distribution, la persistance et le potentiel infectieux de l'inoculum appliqué au sol.

Enfin, malgré que les travaux de Rizzo (1977) aient permis d'établir la pathogénicité de *M. anisopliae* envers les imagos de *D. antiqua*, il semblerait que les infections d'origine naturelle causées par ce mycète chez les mouches du genre *Delia* soient plutôt rares (Eilenberg *et al.*, 2003). Une récente étude de laboratoire a toutefois permis de documenter de façon plus approfondie la vulnérabilité des adultes de *D. antiqua* à *M. anisopliae*. En effet, une mortalité oscillant entre 12,7 et 86,2 % selon les isolats testés a été observée cinq jours suivant l'exposition aux particules infectieuses (Davidson *et al.*, 2005). La pathogénicité de *M. anisopliae* chez les imagos de *D. radicum* a également été déterminée. Un seul des quatre isolats testés a cependant été en mesure d'occasionner plus de 50 % de mortalité 160 heures après le contact initial avec les conidies (Meadow *et al.*, 2000).

## ***Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin**

C'est en 1835, sur des larves de vers à soie, *Bombyx mori*, que la maladie de la muscardine blanche fut documentée pour la première fois par un italien nommé Agostino Bassi di Lodi. Les travaux de Balsamo-Crivelli et de Vuillemin ont ensuite permis de caractériser l'espèce en cause, *Beauveria bassiana* (Zimmermann, 2007a). Selon la dernière révision de la nomenclature, ce champignon appartient maintenant à l'embranchement monophylétique C de la famille des Clavicipitaceae (Sung *et al.*, 2007). Il possède une distribution cosmopolite (Rehner, 2005) et on le retrouve fréquemment dans les sols de divers écosystèmes agricoles et forestiers (Chandler *et al.*, 1997, Fisher *et al.*, 2011, Klingen *et al.*, 2002a, Ormond *et al.*, 2010, Vänninen, 1996), de même que sur la surface foliaire de divers végétaux (Meyling *et al.*, 2006a, Ormond *et al.*, 2010). Des études ont également démontré que certains isolats de ce champignon sont endophytes chez plusieurs plantes (Vega *et al.*, 2008) et cette colonisation asymptomatique des tissus végétaux peut parfois conférer une protection contre certains agents phytopathogènes (Ownley *et al.*, 2008). L'espèce est également réputée pour sa capacité à produire une grande variété de molécules ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides, telles que la bassianine, la beauvericine, la bassianolide et la beauverolide (Vey *et al.*, 2001, Zimmermann, 2007a). Finalement, selon une compilation produite en 2007, *B. bassiana* serait à l'origine du développement de 58 bioinsecticides disponibles commercialement à travers le monde, soit 33,9 % de tous les bioinsecticides élaborés à l'aide de mycètes (Faria *et al.*, 2007).

Le champignon *B. bassiana* est notoire pour sa capacité à infecter une vaste gamme d'insectes, notamment des membres de l'ordre des lépidoptères, des coléoptères, des homoptères, des hémiptères et, dans une moindre mesure, des hyménoptères et des diptères (Tanada *et al.*, 1993, Zimmermann, 2007a). Des insectes ravageurs possédant une grande incidence économique comme le scarabée japonais (Lacey *et al.*, 1994), le charançon du pin blanc, *Pissodes strobi* Peck (Coleoptera: Curculionidae) (Trudel *et al.*, 2007), les aleurodes, *Bemisia spp.* (Homoptera: Aleyrodidae) (Quesada-Moraga *et al.*, 2006b, Wraight *et al.*, 2000) et le stade larvaire de plusieurs lépidoptères problématiques en production de cultures légumières (Wraight *et al.*, 2010) lui sont susceptibles. Son utilisation en lutte biologique permet de contrôler, entre autre, le doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) (Inglis *et al.*, 2001), certains lépidoptères du genre *Dendrolimus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) (Li, 2007) de même que la punaise terne, *Lygus lineolaris* Palistot de Beauvois (Hemiptera: Miridae) et

l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* Say (Coleoptera: Curculionidae), dans les cultures de fraises (Sabbahi *et al.*, 2008a, Sabbahi *et al.*, 2009).

Le mycète *B. bassiana* est également en mesure d'infecter plusieurs espèces différentes de diptères. En effet, le champignon s'avère pathogène chez les larves et les imagos de certains diptères piqueurs tels que *Culex pipens*, *C. tarsalis* et *Anopheles albimanus* (Clark *et al.*, 1968). Des infections d'origine naturelle ont aussi été rapportées chez des mouches associées au bétail, telles que *Musca autumnalis* et *Haematobia irritans* (Steenberg *et al.*, 2001). Des travaux de laboratoire attestent également de la grande susceptibilité des stades adultes de diptères de la famille des Tephritidae (Daniel *et al.*, 2009, De La Rosa *et al.*, 2002, Dimbi *et al.*, 2003a, Konstantopoulou *et al.*, 2005, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a) et des Muscidae (Angel-Sahagún *et al.*, 2005, Barson *et al.*, 1994, Lecuona *et al.*, 2005, Lohmeyer *et al.*, 2006, Mochi *et al.*, 2010b, Watson *et al.*, 1995). Cependant, la mortalité occasionnée par *B. bassiana* chez les stades immatures (larves et pupes) est généralement faible et inférieure à celle observée chez les spécimens adultes (Barson *et al.*, 1994, Daniel *et al.*, 2009, De La Rosa *et al.*, 2002, Lecuona *et al.*, 2005, Mochi *et al.*, 2010a, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a). Par contre, un niveau de mortalité acceptable (48 à 56 %) a été observé chez les larves de *Musca domestica* soumises à deux isolats de *B. bassiana* (Watson *et al.*, 1995). Ekesi et ses collaborateurs (2002) rapportent également une réduction significative de l'émergence des adultes lorsque des larves de troisième stade de *Ceratitis capitata* et de *C. var. rosa fasciventris* sont exposées à des isolats de *B. bassiana*. Par ailleurs, des travaux attestent de la vulnérabilité des larves de troisième stade de *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) à deux isolats de *B. bassiana* (Cossentine *et al.*, 2010). Également, une étude a démontré que des isolats de *B. bassiana* sont en mesure d'occasionner plus de 50 % de mortalité chez les pupes de *C. capitata* (Quesada-Moraga *et al.*, 2006a).

La susceptibilité des espèces du genre *Delia* à *B. bassiana* est moins bien documentée. Une étude portant sur *D. antiqua* a démontré que les pupes de l'espèce étaient peu affectées par *B. bassiana*. Les chercheurs ont toutefois observé une mortalité à retardement suite à l'émergence chez 32,8 à 53,1 % des individus adultes, selon les doses et les isolats testés (Poprawski *et al.*, 1985). Une étude subséquente démontra clairement que la vulnérabilité du stade larvaire de *D. antiqua* est faible, l'isolat le plus performant causant seulement 22,8 % de mortalité chez les larves de troisième stade (Davidson *et al.*, 2005).

La faible pathogénicité de deux isolats *B. bassiana* a également été documentée en conditions de laboratoire chez les larves de *D. radicum*. Cependant, les résultats de l'étude en question

sont mitigés de par le fait que la mortalité dans les traitements témoins était de l'ordre de 40 % (Vänninen *et al.*, 1999b). Quelques essais en parcelles expérimentales au champ ont aussi été effectués vers la fin des années 1990 afin de contrôler les populations de *D. radicum* avec des isolats de *B. bassiana* d'origine finlandaise. Lors d'une de ces expériences, les chercheurs ont observé une diminution significative du nombre de pupes retrouvées dans la rhizosphère de plants de choux suite à une application au niveau du sol de l'isolat SF85-2 (Vänninen *et al.*, 1999a). Cependant, les auteurs n'ont pas été en mesure d'obtenir à nouveau ces résultats avec l'isolat en question, que ce soit lors d'expériences au champ (Vänninen *et al.*, 1999a) ou en serre (Vänninen *et al.*, 1999b). Par contre, il a été démontré ultérieurement que l'isolat GHA de *B. bassiana* est en mesure d'occasionner jusqu'à 46 % de mortalité chez des individus du second stade larvaire exposés aux conidies incorporées dans des échantillons de sol stérile (Bruck *et al.*, 2005).

Enfin, les travaux de Rizzo (1977) ont permis de déterminer la pathogénicité de *B. bassiana* chez les imagos de *D. antiqua*. Une étude anglaise plus exhaustive a ensuite permis d'approfondir ces connaissances avec l'observation d'une mortalité oscillant entre 22,3 et 100 % selon les isolats testés (Davidson *et al.*, 2005). Concernant les adultes de *D. radicum*, des infections d'origine naturelle ont été documentées chez quelques spécimens (Steenberg *et al.*, 2001) mais *B. bassiana* ne semblerait pas être en mesure de causer des épizooties au sein des populations (Eilenberg *et al.*, 2003). D'autres chercheurs ont observé en laboratoire une mortalité variant entre 34 et 100% chez des adultes de *D. radicum* cinq jours suivant le contact avec des conidies. Il a également été remarqué que les adultes exposés aux conidies de *B. bassiana* étaient en mesure de transmettre l'inoculum dans une chaîne d'infection impliquant six individus, démontrant ainsi la capacité du champignon à se disséminer au sein des populations. Qui plus est, une inhibition de la ponte a été observée chez les mouches femelles infectées. Sur la base de ces résultats, des travaux sont en cours afin de développer un piège attractif permettant de contaminer les mouches du chou et de disperser des conidies de *B. bassiana* au sein des populations naturelles (Meadow *et al.*, 2000).

## CHAPITRE 5 : PROBLÉMATIQUE

La mouche du chou est un insecte ravageur en mesure d'occasionner d'importants dommages de façon récurrente dans les cultures horticoles et oléagineuses appartenant à la famille des crucifères (Coaker *et al.*, 1971, Dosdall *et al.*, 1994). Comme une grande majorité d'insectes d'importance en agriculture, le contrôle des larves de *Delia radicum* s'effectue principalement à l'aide d'insecticides de synthèse. Or, les populations de cet insecte sont devenues résistantes envers plusieurs matières actives au fil du temps (Jyoti *et al.*, 2001a). Actuellement, la répression des asticots de la mouche du chou se fait essentiellement par des applications terrestres de chlorpyrifos, un insecticide organophosphoré possédant un très large spectre d'hôtes. Il a cependant été démontré que le chlorpyrifos peut se retrouver à des niveaux inquiétants dans les cours d'eau parcourant les terres agricoles (Giroux *et al.*, 2010). Par surcroît, des populations de *Delia spp.* résistantes au chlorpyrifos ont été observées dans la dernière décennie (Bruck *et al.*, 2005, Nault *et al.*, 2006). Puisqu'il y a toujours un risque de développement de résistance chez les insectes avec l'utilisation des pesticides de synthèse, le milieu agricole a présentement besoin de méthodes de contrôle alternatives pour lutter contre la mouche du chou (Jyoti *et al.*, 2001a). Certaines méthodes de lutte (physique, culturale ou biologique) actuellement en développement pourraient permettre aux producteurs d'obtenir un certain contrôle sur les populations de la mouche du chou et de réduire les dommages aux récoltes (Hemachandra *et al.*, 2007, Malchev *et al.*, 2010, Meadow *et al.*, 2005, Parsons *et al.*, 2007).

Une alternative intéressante aux insecticides chimiques consiste à exploiter les propriétés entomopathogènes de certains agents microbiens comme les virus, les bactéries et les champignons. Leur utilisation en lutte biologique comporte plusieurs avantages, dont la sécurité pour l'humain et la faune non ciblée, la réduction des résidus de pesticides présents dans les aliments et la préservation des ennemis naturels dans les agro écosystèmes (Lacey *et al.*, 2001). Cependant, relativement peu d'agents microbiens ont permis le développement de méthodes de lutte biologique envers les insectes terricoles comme les larves de *D. radicum*. Le sol étant un environnement complexe avec une forte diversité biologique, la survie des agents microbiens qui y sont appliqués est parfois limitée. De plus, de puissants processus de coévolution font en sorte que les insectes terricoles ont développé un niveau de résistance avancé envers les agents microbiens et les toxines qu'ils produisent. Un haut degré de

pathogénicité et la capacité de survivre dans l'environnement du sol sont donc des qualités jugées essentielles pour les agents microbiens servant au contrôle d'insectes terricoles (Jackson, 1999).

Les mycètes entomopathogènes sont d'importants agents de régulation des populations d'insectes (Goettel *et al.*, 2010), notamment chez les diptères ravageurs des crucifères (Eilenberg *et al.*, 2003). Quelques essais ont d'ailleurs été réalisés en laboratoire afin d'établir la pathogénicité de certains champignons de l'ordre des Hypocréales chez les larves du genre *Delia*. Malgré que des difficultés ont été rencontrées dans ces études, elles tendent à démontrer que la susceptibilité des stades larvaires est généralement faible (Davidson *et al.*, 2005, Klingen *et al.*, 2002c, Poprawski *et al.*, 1985, Vänninen *et al.*, 1999b). Quoique réalisée avec un nombre d'isolats restreint, une recherche récente a permis d'établir de façon plus convaincante la susceptibilité des asticots de *D. radicum* au mycète *Metarhizium anisopliae*, notamment l'isolat F52 (Bruck *et al.*, 2005). Également, sur la base de quelques études, le mycète *Tolypocladium cylindrosporum* semble être un agent de lutte biologique potentiel envers les larves de *D. radicum* mais aucun criblage d'envergure n'a été réalisé à ce jour avec ce mycète (Klingen *et al.*, 2002a, Klingen *et al.*, 2002c, Lam *et al.*, 1988). Également, des essais ont permis de confirmer la vulnérabilité des imagos de la mouche du chou aux champignons *Beauveria bassiana* et *M. anisopliae* (Meadow *et al.*, 2000). Cependant, la pathogénicité de *T. cylindrosporum* envers les mouches adultes reste à démontrer. De plus, les essais réalisés en champs ou en serres afin de contrôler les larves de *D. radicum* avec des mycètes Hypocréales ont généralement été peu probants. Des efforts de recherche supplémentaires doivent donc être déployés afin de dénicher, entre autres, des isolats possédant une plus grande virulence (Chandler *et al.*, 2005, Vänninen *et al.*, 1999a, Vänninen *et al.*, 1999b). D'ailleurs, la sélection de tels isolats est habituellement la première étape à effectuer lors de la recherche d'agents de lutte biologique d'origine fongique visant un insecte (Goettel *et al.*, 2010). Finalement, une étude permettant de comparer la susceptibilité des stades larvaires et adultes de *D. antiqua* aux mycètes entomopathogènes a été réalisée (Davidson *et al.*, 2005) mais aucune recherche de ce type n'a été effectuée chez *D. radicum*. Des travaux supplémentaires doivent donc être effectués afin de compléter les informations présentes dans la littérature scientifique en regard de la vulnérabilité de la mouche du chou aux mycètes entomopathogènes.

## CHAPITRE 6 : BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Le but du projet de recherche était d'approfondir les connaissances relatives à la susceptibilité des larves et des adultes de la mouche du chou aux champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocréales. Plus précisément, le projet visait à identifier des isolats possédant des attributs intéressants, permettant ainsi d'établir les prémices pour le développement d'un nouvel outil de lutte biologique visant la mouche du chou dans les cultures de crucifères.

Sur la base des informations recueillies dans la littérature scientifique, l'hypothèse de travail peut être formulée ainsi :

La pathogénicité des champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocréales chez les larves et les adultes de *D. radicum* est assujettie à des variations inter et intra-spécifiques.

Afin de valider cette hypothèse, quatre objectifs ont été poursuivis :

1. Planter et maintenir un élevage de la mouche du chou en conditions de laboratoire.
2. Effectuer la production de divers isolats de champignons entomopathogènes appartenant aux espèces *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* et *Tolypocladium cylindrosporum*.
3. Réaliser le criblage des isolats de champignons entomopathogènes chez les larves de la mouche du chou.
4. Réaliser le criblage des isolats de champignons entomopathogènes chez les adultes de la mouche du chou.

## CHAPITRE 7 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

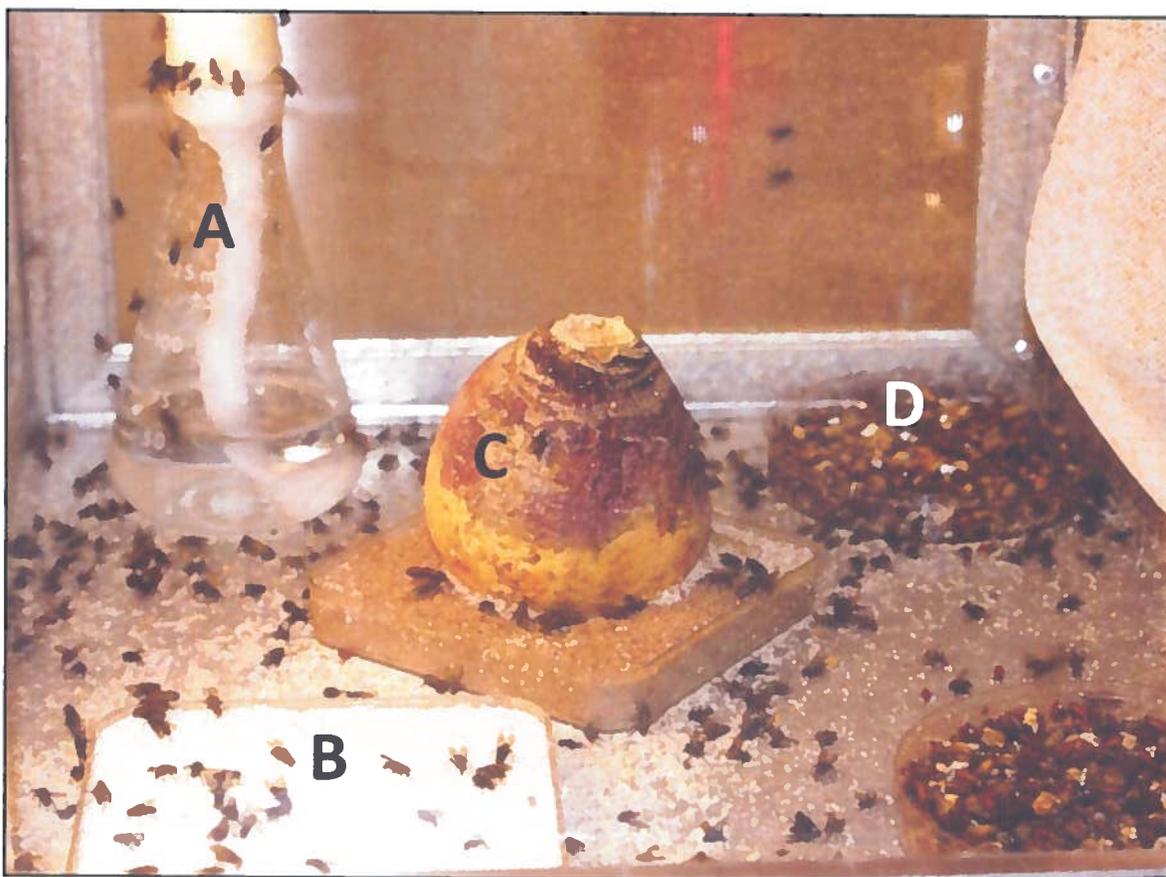
### Élevage de la mouche du chou

#### Régie d'élevage

L'accès à un approvisionnement régulier en larves et en adultes de la mouche du chou pour la réalisation des expériences était une condition *sine qua non* à la réussite du projet. C'est pourquoi un élevage de la mouche du chou fut démarré à l'INRS-Institut Armand-Frappier. La population mère à l'origine de cet élevage provenait de pupes prélevées sur la Ferme Expérimentale d'Agriculture et Agroalimentaire Canada située à Sainte-Clotilde (45° 20' N, 73° 50' W). Ces pupes ont permis la mise en place d'une colonie stable hébergée depuis plus de dix ans dans les laboratoires du Centre de Recherche et de Développement en Horticulture (CRDH) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, situé à Saint-Jean-sur-Richelieu (Québec, Canada). Des pupes non-diapausantes et appartenant au biotype hâtif ont été prélevées de cette colonie et fournies par M. Guy Boivin, chercheur scientifique en entomologie au CRDH. Ses conseils, ainsi que ceux de Mme Danielle Thibodeau, ont été grandement utiles lors de l'établissement de l'élevage au sein de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Cependant, d'autres sources d'informations ont été pertinentes pour les fins du projet, notamment celles fournies par Harris et ses collaborateurs (1966) et par Whistlecraft et ses collaborateurs (1985). Afin de s'assurer de débiter la colonie avec du matériel adéquat, les pupes, les mouches et les larves ont été examinées sous un binoculaire en se référant à la clé d'identification de Brooks (1951).

Les mouches adultes ont été élevées dans deux cages cubiques, dont les côtés mesuraient 30 cm, équipées de grillage moustiquaire et d'une paroi constituée de plastique transparent facilitant l'observation (modèle #1450 BSV, BioQuip Products, Rancho Dominguez, CA, USA). Un des côtés des cages était muni d'un long manchon de coton, ce qui permettait l'accès à l'intérieur des cages tout en diminuant les risques de fuites des mouches à l'extérieur. Ces cages étaient placées dans une chambre environnementale maintenue à une température de  $20 \pm 1$  °C et une humidité relative de  $55 \pm 10$  %. La photopériode était de 18 heures par jour. La lumière était diffusée par quatre tubes fluorescents de type blanc froid dotés d'une puissance de 15 W et disposés à 20 cm au-dessus des cages. Les mouches s'abreuyaient d'eau distillée stérile contenue dans une fiole Erlenmeyer de 125 ml et migrant par remontée capillaire dans un

morceau de coton (figure 7.1A). Elles se nourrissaient *ad libitum* d'une nourriture solide constituée de sucre et de lait en poudre, de farine de soya et de levure nutritionnelle de type Angevita (Levure Red Star, L'Arc en Vrac, Joliette, Québec, Canada) dans un ratio de 5:5:1:1 (Boivin, 2010, communication personnelle). Les ingrédients de la diète étaient préalablement pulvérisés en une fine poudre à l'aide d'un robot culinaire. Une portion d'environ 10 g de cette nourriture était étalée dans une base de boîte de Petri et disposée dans chacune des cages (figure 7.1B). L'eau et la nourriture étaient renouvelées de façon hebdomadaire.



**Figure 7.1 :** Vue de l'intérieur d'une cage servant à l'élevage de *D. radicum*. A : Fiole Erlenmeyer remplie d'eau et mouches s'abreuvent sur le morceau de coton imbibé; B : Boîte de Petri contenant la diète servant à l'alimentation des mouches; C : Substrat de ponte servant à la cueillette des œufs; D : Boîte de Petri contenant les pupes permettant de renouveler la population de la cage.

Un substrat de ponte permettant de recueillir les œufs était mis à la disposition des mouches dans chacune des cages. Ce dispositif était constitué de la base d'une boîte de Petri contenant 150 g de sable séché tout usage (Bomix®, Saint-Léonard, Québec, Canada), préalablement stérilisé à l'autoclave (134 °C, 20 minutes) et saturé d'eau distillée stérile, sur lequel était déposé un morceau de rutabaga d'environ 125 cm<sup>3</sup> (figure 7.1C). Les mouches femelles

pondaient alors leurs œufs autour du morceau de rutabaga, directement sur le sable ou quelques millimètres sous la surface. Pour les besoins de maintien de l'élevage, les œufs étaient récoltés selon une fréquence bihebdomadaire. Le substrat de ponte, y compris les œufs, était alors transféré dans un contenant de plastique (11 cm x 18 cm x 31 cm) contenant environ un kilogramme de sable préalablement stérilisé tel que décrit. Le sable était ensuite humecté avec de l'eau distillée stérile jusqu'à saturation. Deux ou trois rutabagas entiers (variété Laurentian Thompson) auxquels on avait préalablement coupé la base étaient ensuite déposés sur les œufs. Une large surface de tissu succulent était ainsi exposée, ce qui facilitait la pénétration des jeunes larves dans les rutabagas. La boîte était finalement recouverte d'une pellicule plastique pendant la première semaine d'incubation afin de maintenir une forte humidité relative (Whistlecraft *et al.*, 1985). Cette dernière étape favorisait ainsi un taux d'éclosion des œufs élevé et une survie optimale des jeunes larves.

Les rutabagas utilisés pour toute la durée du projet provenaient principalement de la Ferme Milisun enr., propriété de monsieur Michel Pichette et située à Saint-Roch-de-l'Achigan. Ils étaient entreposés à 4 °C avant d'être utilisés pour l'alimentation des larves. À ce moment, les rutabagas étaient lavés de façon vigoureuse avec une eau savonneuse et rincés abondamment. Pour ne pas contaminer l'élevage avec des individus étrangers, une attention particulière était portée afin de détecter l'éventuelle présence de larves de *D. radicum* dans les racines.

Après une incubation aux conditions décrites précédemment pour le maintien de l'élevage, les larves complétaient leur développement à l'intérieur des rutabagas en trois semaines, avant de migrer dans le sable pour entreprendre leur métamorphose. Le recueil des pupes se faisait 28 jours après l'introduction du substrat de ponte dans les cages. Les pupes enfouies dans le sable étaient alors récupérées par flottaison suivi d'une filtration sur tamis. Elles étaient ensuite transférées dans des boîtes de Petri contenant de la vermiculite humide (figure 7.1D). Des cohortes de 300 à 350 pupes étaient généralement préparées pour chacune des cages à chaque semaine afin de renouveler les populations. Les pupes excédentaires étaient conservées dans de la vermiculite humide à 4 °C afin de regarnir l'élevage en cas de chute des populations. L'émergence des mouches débutait habituellement entre cinq et sept jours après leur recueil. À ce moment, les boîtes de Petri étaient placées dans les cages, sans leur couvercle, pour une période de 14 jours. Finalement, les mouches mortes étaient retirées des cages sur une base hebdomadaire de façon à réduire les risques de développement d'épizootie au sein de l'élevage.

Dans le but de s'assurer de la vigueur de la colonie, quelques données relativement à la régie

d'élevage ont été recueillies de façon régulière tout au long du projet. Entre autre, le taux d'éclosion des œufs a été noté à plusieurs reprises. Ceci se faisait en prélevant des œufs présents sur le substrat de ponte et en les déposant sur un papier filtre de couleur noir (Grade 551, Whatman GmbH, Dassel, Allemagne) contenu dans une boîte de Petri de 90mm de diamètre et saturé d'eau distillée. La boîte de Petri était ensuite scellée avec une pellicule de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) et incubée pendant 7 jours à une température de  $20 \pm 1$  °C et une humidité relative de  $55 \pm 10$  %. Au bout de cette période, 200 œufs étaient observés sous une loupe binoculaire pour vérifier la présence d'une brèche dans le chorion, le papier filtre noir facilitant grandement les observations. Le poids moyen des cohortes de pupes au moment de leur récupération a également fait l'objet d'un suivi régulier. Le taux d'émergence des adultes a aussi été documenté en observant l'état de 150 à 200 pupes par cohorte après une période de 14 jours d'incubation. Finalement, le temps de développement moyen a été évalué en mesurant le nombre de jours écoulés entre la ponte du premier œuf et l'émergence de la première mouche appartenant à la même cohorte.

### **Production des cohortes de larves**

Afin de réaliser les épreuves biologiques, des cohortes de larves possédant sensiblement le même âge étaient requises. Pour obtenir ces cohortes, des œufs recueillis sur une période de trois ou quatre jours étaient mis en contact avec des rutabagas de la même façon que pour le maintien de l'élevage. Par contre, trois semaines après la récolte des œufs, les larves, alors au troisième stade et disposées à migrer dans le sable, étaient retirées de leur source de nourriture à l'aide d'une pince entomologique. Lorsque les rutabagas étaient dans un état de décomposition relativement avancé, plusieurs larves pouvaient être aisément récupérées entre la pelure et la chair des rutabagas, diminuant ainsi le risque de leur occasionner des blessures mortelles. Des larves enfouies peu profondément dans le sable sur le point d'amorcer le processus de métamorphose mais toujours actives étaient également prélevées pour les fins des expériences. Les larves matures recueillies étaient temporairement déposées dans une boîte de Petri en verre contenant un papier filtre de 15 cm humecté avec de l'eau distillée stérile. Elles étaient ensuite entreposées à 4 °C pour une période maximale de trois heures en attendant de réaliser les épreuves biologiques.

## **Production des cohortes de mouches**

Un grand nombre de mouches fraîchement émergées de leurs pupes et possédant sensiblement le même âge étaient nécessaires pour la réalisation des expériences. Des cohortes de mouches adultes étaient donc obtenues en recueillant tout d'abord des œufs sur une période de trois ou quatre jours. Les larves étaient incubées de la façon décrite précédemment pour le maintien de l'élevage et les pupes étaient récupérées quatre semaines après le recueil des œufs par flottaison et filtration sur tamis. Elles étaient subséquemment transférées dans des godets de plastique de 29,6 ml (modèle P100, Solo-Cup Company, Highland Park, IL, USA) au nombre de 50 pupes par godet. Les pupes étaient ensuite recouvertes de vermiculite humide. Les couvercles des godets étaient perforés de cinq trous à l'aide d'une aiguille stérile de type 22<sub>G</sub>1½ (PrecisionGlide® Needle, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Les pupes étaient alors incubées à une température de 20 ± 1 °C et une humidité relative de 55 ± 10 % jusqu'au moment de l'émergence des mouches et de leur utilisation pour les expériences.

## **Production des isolats de champignons entomopathogènes**

### **Sélection des isolats**

Au total, quatre isolats de *Beauveria bassiana*, six isolats de *Metarhizium anisopliae* et quatre isolats de *Tolypodadium cylindrosporum* ont été choisis pour la réalisation des expériences (Tableau 6.1). Les principaux critères de sélection des isolats étaient la provenance géographique ainsi que l'insecte hôte ou le substrat sur lequel l'isolat a été détecté. Les isolats utilisés lors cette étude provenaient de la banque de champignons entomopathogènes du Laboratoire d'entomologie expérimentale situé à l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Québec, Canada). L'isolat F52 (catalogué comme l'isolat INRS 709 dans la banque) a été obtenu à partir du bioinsecticide granulaire Met-52™ (Novozymes Biologicals Inc., Salem, VA, USA). Cette banque contient des échantillons de plus de 400 isolats de mycètes entomopathogènes conservés à -80 °C dans des cryotubes contenant une solution de glycérol concentrée à 70 %.

Tableau 7.1 : Hôte et origine géographique des isolats de champignons entomopathogènes sélectionnés.

Espèce	Isolat	Hôte ou substrat	Origine géographique	Autre référence
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS 208	<i>Delta antiqua</i> (Diptera: Anthomyiidae)	France, La Minière	ARSEF 1865
	INRS 238	Mouche sciaride morte	Canada, Alberta	DAOM 216600
	INRS 242	<i>Tomiscus piniperda</i> (Coleoptera: Scolytidae)	Canada, Québec	INRS-CFL
	INRS 243	<i>Lepinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Canada, Québec, Ile Perrot	INRS-IP
<i>Metarhizium anisopliae</i>	INRS 700	Larve d'insecte non-identifiée	États-Unis	UAMH 421
	INRS 701	Sol	Canada, Alberta	UAMH 4450
	INRS 704	Sol, en utilisant <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera : Pyralidae) comme appât	Canada, Ontario	UAMH 9197
	INRS 705	Sol, en utilisant <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera : Pyralidae) comme appât	Canada, Ontario	UAMH 9198
	INRS 707	E. Simmons QM 191	Inconnue	UAMH 2801
INRS 709	<i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Autriche	F52	
<i>Tolypocladium cylindrosporium</i>	INRS 1000	Coccinellidae	États-Unis, Floride	DAOM 183950
	INRS 1003	Sol	Canada, Alberta	DAOM 167325
	INRS 1008	Eaux usées	République tchèque	DAOM 183952
	INRS 1009	<i>Aedes australis</i> (Diptera: Culicidae)	Nouvelle-Zélande	DAOM 183953

INRS : Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada.

ARSEF : Agriculture Research Service of Entomopathogenic Fungi, USDA, Ithaca, New-York, USA.

DAOM : Canadian Collection of Fungal Culture, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

UAMH : University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Alberta, Canada.

F52 : obtenu à partir du bio-insecticide granulaire Met-52™ (Novozymes Biologicals Inc., Salem, VA, USA)

## **Production des suspensions mères**

En se basant sur les travaux de Srei (2011), la production des suspensions de conidies s'est déroulée en deux étapes; une première croissance sur gélose nutritive suivie par une production de masse par fermentation sur un substrat solide à base de céréales. Pour tous les isolats sélectionnés, hormis la souche INRS 709, les cryotubes correspondants ont tout d'abord été retirés de la banque de champignons entomopathogènes de l'INRS-Institut Armand-Frappier et déposés sur de la glace concassée pendant une période d'environ 15 minutes, ceci afin d'éviter une décongélation trop brusque du matériel biologique. Les champignons ont ensuite été cultivés sur une gélose de Sabouraud au dextrose, communément appelée gélose SDA (Difco Laboratories, Mannheim, Allemagne), contenant 10 g de peptone, 40 g de dextrose et 15 g d'agar-agar par litre de produit final. Pour se faire, un échantillon du contenu des tubes a été prélevé avec un cure-dent stérile et mis en suspension dans 300 µl d'eau distillée stérile suivi d'un puissant brassage à l'aide d'un agitateur-vibreux. Un volume de 50 µl de cette suspension a ensuite été dispersé sur une gélose de Sabouraud au dextrose à l'aide d'un étaleur en plastique de type râteau et d'un plateau rotatif d'inoculation. Pour tous les isolats, trois boîtes de Petri étaient préparées de cette façon. Celles-ci ont ensuite été cachetées avec un film de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) et incubées à 25 °C à la noirceur pendant 7 à 10 jours. Cette période d'incubation a généralement permis d'obtenir une croissance des champignons suivi de la formation de conidies (figure 7.2).

Les conidies des trois boîtes de Petri ont ensuite été récupérées en grattant minutieusement la gélose nutritive avec une lame de scalpel stérile. Les conidies ont par la suite été mises suspension dans des tubes de 50 ml contenant 25 ml d'eau distillée stérile. Afin d'obtenir des suspensions homogènes, les tubes ont été remués vigoureusement à l'aide d'un agitateur-vibreux. En attendant leur utilisation pour entamer la production de masse par fermentation sur milieu céréalier, ces suspensions ont été conservées à 4 °C. Trois productions différentes ont été réalisées avec cette méthodologie pour tous les isolats sélectionnés.



**Figure 7.2 : Différentes étapes liées à la production des champignons entomopathogènes. A,B,C: Production sur gélose de Sabouraud au dextrose des isolats INRS 709, INRS 1008 et INRS 705; D: Sacs servant à la production sur substrat d'orge perlé dans la chambre de croissance; E: Sac de production rempli d'eau lors de la récolte des conidies; F: Récolte des conidies par filtration; G: Suspensions de conidies entreposées dans des bouteilles de 100 ml.**

Pour ce qui est de l'isolat INRS 709, un grain de riz provenant du bio-insecticide granulaire Met-52™ a tout d'abord été inséré dans un tube de 2 ml contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Un brassage vigoureux à l'aide d'un agitateur-vibreux a permis de séparer les conidies de la surface du grain de riz et de les mettre en suspension dans l'eau. Un étalement de cette suspension par la méthode d'épuisement a ensuite été réalisé sur une gélose de Sabouraud au dextrose avec une boucle d'inoculation stérile. Les géloses ont ensuite été scellées avec une pellicule de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) et incubées à 25 °C à la noirceur, et ce jusqu'au moment de l'obtention de colonies présentant une sporulation verte caractéristique de *M. anisopliae*. Les conidies ont ensuite été prélevées avec une boucle d'inoculation stérile et mises en suspension dans 300 µl d'eau distillée stérile. L'ensemencement de trois nouvelles géloses de Sabouraud au dextrose s'est effectué en étendant 50 µl de cette suspension avec un étaleur en plastique de type râteau et d'un plateau rotatif d'inoculation. Ces géloses ont été scellées tel que décrit précédemment et incubées à 25 °C à la noirceur pendant 7 à 10 jours (figure 7.2).

Après cette période d'incubation, les trois boîtes de Petri ont été utilisées pour la récolte des conidies. Les géloses nutritives ont été grattées délicatement avec une lame de scalpel stérile et les conidies récupérées ont été mises en suspension dans des tubes de 50 ml contenant 25 ml d'eau distillée stérile. Trois productions différentes ont été réalisées avec cette méthode. Des échantillons de gélose sporulée ont également été transférés dans des cryotubes contenant une solution de glycérol concentrée à 70 %. Ces échantillons sont conservés dans la banque de champignons entomopathogènes de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour utilisation ultérieure.

Afin d'obtenir des volumes adéquats de suspensions de conidies permettant la réalisation de toutes les expériences sur la mouche du chou, la production des isolats sélectionnés s'est ensuite poursuivie en milieu solide sur un substrat d'orge perlé. Cette production de masse a été réalisée dans des sacs résistants à l'autoclave (Fungi Perfecti, Olympia, WA, USA) et dotés d'un filtre de 0,22 µm qui permet les échanges gazeux lorsque la croissance en milieu stérile est requise. Ces sacs ont été remplis avec 100 g d'orge perlé (Nith River Milling inc., Linwood, Ontario, Canada) et 90 ml d'eau distillée. Ils ont ensuite été soumis à une stérilisation (121 °C, 20 minutes) suivi d'une période de repos à la température de la pièce s'échelonnant sur une nuit complète. Le substrat céréalier a ensuite été inoculé avec 10 ml des suspensions de conidies préparées précédemment sur gélose nutritive. Pour assurer une répartition homogène des conidies dans le substrat de fermentation, un brassage manuel des sacs a été réalisé. Les sacs de production ont ensuite été transférés dans une chambre environnementale et incubés à la

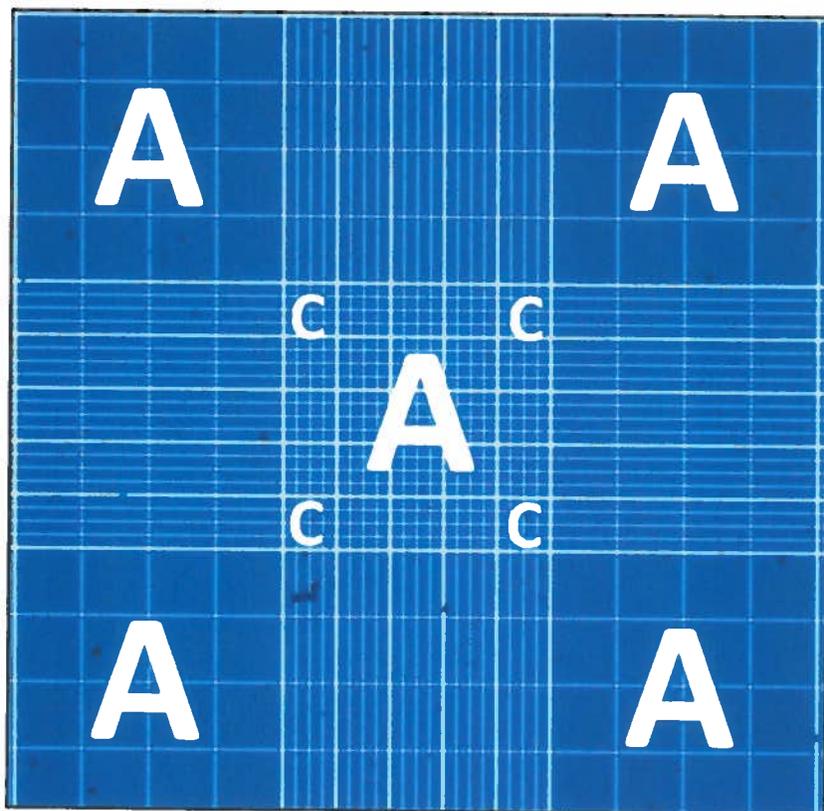
noirceur pendant 14 jours à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et  $55 \pm 5\%$  d'humidité relative (figure 7.2). Afin d'encourager la formation des hyphes et des conidies, un brassage du substrat de fermentation a été réalisé manuellement après sept jours, soit au milieu de la période d'incubation.

Après cette période d'incubation, les sacs ont été coupés à mi-hauteur pour faciliter les opérations de récolte et 200 ml d'eau distillée stérile ont été versés à l'intérieur. Un brassage vigoureux de substrat céréalier supportant la croissance des champignons a ensuite été réalisé afin de permettre de dissocier les conidies des hyphes pour les mettre en suspension. La récolte des conidies s'est par la suite effectuée par filtration du liquide sur trois épaisseurs de coton à fromage stérile, permettant ainsi de retenir les débris d'orge perlé et les hyphes. Les filtrats contenant les particules infectieuses ont ensuite été entreposés dans des bouteilles de 100 ml stériles (figure 7.2). Les suspensions ont été conservées à  $4^\circ\text{C}$  en attendant leur caractérisation et leur utilisation lors des expériences de criblage sur les larves et les adultes de la mouche du chou. Pour tous les isolats de champignons entomopathogènes sélectionnés, trois productions indépendantes sur substrat d'orge perlé ont été réalisées à l'aide des suspensions de conidies préparées précédemment sur les géloses de Sabouraud au dextrose. Ainsi, chaque répétition des expériences avec les larves et les adultes de la mouche du chou ont été réalisées avec une suspension mère distincte. Ceci permettait de détecter les contaminations et les erreurs pouvant survenir lors des étapes de production et de caractérisation des suspensions de conidies et d'éviter les erreurs d'une pseudo-réplication. Concernant l'isolat INRS 709, trois productions distinctes ont également été produites tel que décrit précédemment. Cependant, après leur caractérisation, les productions obtenues ont été combinées ensemble afin d'obtenir une seule suspension mère servant de référence (témoin positif) lors des expériences de criblage sur la mouche du chou.

### **Caractérisation des suspensions mères**

La caractérisation des suspensions obtenues s'est effectuée en mesurant deux variables : la concentration en conidies et le pourcentage de germination de ces conidies. Le décompte des conidies a été effectué à l'aide d'un hémacymètre (Bright-Line Improved Neubauer; Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) sous microscopie photonique. Selon la grosseur des conidies, cinq cellules de type A ou C ont été utilisées lors des dénombrements (figure 7.3). De façon générale, il était beaucoup aisé de réaliser le décompte des conidies de *B. bassiana* et de *T. cylindrosporum* avec les cellules de type C tandis que les cellules de type A étaient plus

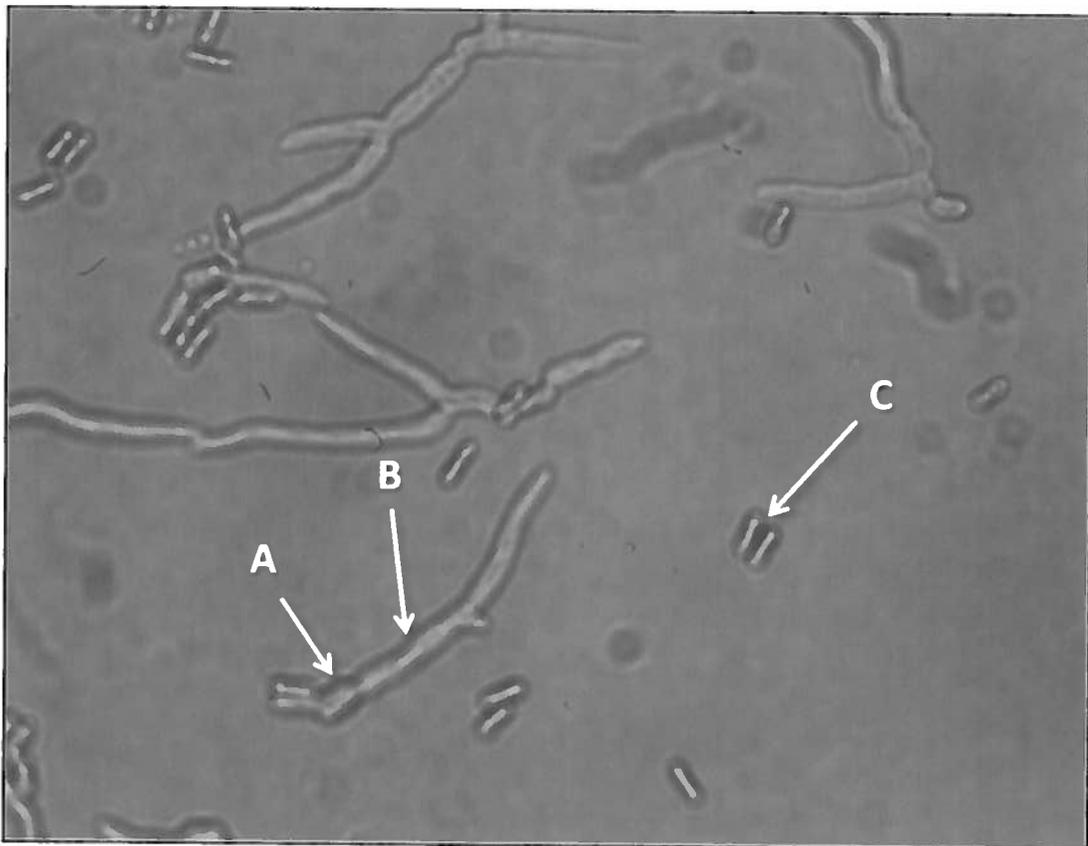
appropriées pour les conidies de *M. anisopliae*. Le dénombrement des conidies était considéré comme valide si l'écart type de la valeur moyenne obtenue pour les cinq cellules ne dépassait pas 15 % de cette dernière. Suite au décompte des conidies, la concentration des suspensions a été déterminée en utilisant la formule décrite par Goettel et Inglis (1997). Cette formule considère le nombre moyen de conidies par cellules, le type de cellule utilisée pour le décompte et le facteur de dilution ayant servi à la préparation de l'échantillon utilisé pour les fins du dénombrement. Connaissant la concentration des suspensions mères, des échantillons de 10 ml possédant une concentration de  $1 \times 10^8$  conidies/ml ont été préparés par dilution avec de l'eau distillée stérile.



**Figure 7.3 : Dénombrement des conidies avec un hémacymètre et identification des cellules de type A et C.**

Les décomptes effectués avec l'hémacymètre ne permettaient cependant pas de déterminer la viabilité des conidies. C'est pourquoi un test de germination sur gélose nutritive a été réalisé. Pour ce faire, 20  $\mu$ l d'une suspension concentrée à  $1 \times 10^8$  conidies/ml (Meyling *et al.*, 2006b) ont été étalés sur une gélose de Sabouraud au dextrose avec un étaleur en plastique de type râteau et d'un plateau rotatif d'inoculation. Ces géloses étaient ensuite cachetées avec un film de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) et incubées à 25 °C à la noirceur pendant 24 heures. Pour chacune des productions de tous les isolats, trois boîtes

de Petri ont été préparées de cette façon. Après la période d'incubation, une goutte d'eau était déposée à un endroit aléatoire sur la gélose et recouverte d'une lamelle de verre carrée de 22 mm (Wraight *et al.*, 2007). Les géloses étaient alors observées sous microscopie photonique avec un grossissement de 250X. Pour chaque boîte de Petri, trois zones distinctes contenant chacune 100 conidies ont été observées, pour un total de 300 conidies évaluées par gélose. La présence d'un tube germinatif possédant une longueur équivalente ou supérieure au diamètre de la conidie examinée permettait de distinguer les conidies germées (figure 7.4). Dans le cas des isolats du genre *Beauveria*, si un gonflement remarquable des conidies était observé, ces dernières étaient alors considérées comme étant germées (Goettel *et al.*, 1997). Le nombre de conidies germées permettait ainsi de calculer un pourcentage de germination moyen et d'apprécier la viabilité des conidies. Les tests de germination ont tous été effectués quelques jours seulement avant l'utilisation des suspensions dans les épreuves biologiques.



**Figure 7.4 : Aperçu d'un test de germination sur gélose de Sabouraud au dextrose (grossissement 250X). A : Conidie germée; B : Tube germinatif; C : Conidies non germées.**

## Épreuves biologiques

### Criblage des isolats chez les larves

La technique utilisée pour l'approvisionnement en larves servant à la réalisation des expériences ne garantissait pas un approvisionnement constant. En conséquence, il a été décidé de vérifier la pathogénicité des isolats sélectionnés un à un en incluant, pour chacune des expériences, un témoin négatif et un témoin positif. Les données obtenues pour les isolats ont donc été exprimées en relation avec les témoins. Puisque le nombre de larves disponibles pour les épreuves biologiques variait selon les cohortes, le nombre de traitements testés changeait au fil des expériences. Au total, 14 expériences ont été réalisées chez les larves de troisième stade avec de trois à huit traitements à la fois, soit les traitements témoins positifs et négatifs accompagnés de un à six isolats testés.

Le criblage s'est effectué en utilisant une variation de la technique de Bruck et ses collaborateurs (2005). Les arènes utilisées pour les expériences étaient des petits godets de plastique d'une capacité de 29,6 ml (modèle P100, Solo-Cup Company, Highland Park, IL, USA) contenant 5 g de sable séché tout usage (Bomix®, Saint-Léonard, Québec, Canada) stérilisé (134 °C, 20 minutes). Le sable était ensuite inoculé uniformément en surface avec 1 ml d'une suspension de conidies concentrée à  $1 \times 10^8$  conidies/ml, obtenue par dilution des suspensions mères à l'étude. Les arènes agissant à titre de témoin positif étaient inoculées avec une suspension de l'isolat INRS 709 de *M. anisopliae* concentrée à  $1 \times 10^8$  conidies/ml. Les arènes traitées étaient donc contaminées au taux approximatif de  $2 \times 10^7$  conidies par gramme de sable ou  $1,24 \times 10^7$  conidies/cm<sup>2</sup>. Les arènes témoins négatifs étaient inoculées seulement avec de l'eau distillée stérile. Chaque traitement comportait cinq arènes préparées selon la procédure décrite précédemment.

Par la suite, les larves de troisième stade étaient sélectionnées aléatoirement et retirées de la boîte de Petri en verre pour être déposées sur le sable contaminé. Chacune des arènes contenait dix larves. Ainsi, pour chaque traitement, il y avait 50 individus par répétition. L'expérience a été reproduite trois fois au fil du temps avec des cohortes de larves différentes. Tous les isolats ont donc été testés sur un total de 150 individus. Une fois les larves introduites dans les arènes, les couvercles des godets étaient perforés de cinq trous avec une aiguille entomologique de taille 00 (Austerlitz Insect Pins, Fine Science Tools, North Vancouver, Colombie-Britannique) afin de permettre les échanges gazeux. Les arènes appartenant au

même traitement étaient finalement placées dans une petite boîte de plastique mesurant 14 cm x 14 cm x 5 cm et contenant du papier absorbant saturé d'eau distillée permettant de maintenir élevé le taux d'humidité relative. Les boîtes d'une même expérience étaient regroupées et disposées en bloc incomplet aléatoire à l'intérieur d'une chambre environnementale maintenue obscure à une température de  $20 \pm 1$  °C (figure 7.5). Puisque les larves utilisées pour les expériences étaient sur le point de compléter leur cycle vital, elles n'ont pas été nourries pour la durée de l'expérience. Elles s'enfonçaient dans le sable habituellement en moins d'une heure suite à leur insertion dans les arènes et creusaient de nombreuses galeries, assurant ainsi un contact intime avec les conidies. La métamorphose en pupes s'effectuait généralement dans les 48 premières heures suivant le début de l'expérience.

Après 21 jours d'incubation aux conditions décrites, les godets étaient inspectés pour vérifier la présence de larves mortes, de mouches adultes émergées et de pupes non-écloses. Les pupes non-écloses n'exhibant pas de muscardine étaient observées sous une source lumineuse pour vérifier la présence d'un imago. Les pupes étaient caractérisées comme étant anormales si aucune mouche n'était détectée à l'intérieur. Toutes les pupes non-écloses étaient ensuite mises en culture dans le but de déceler la présence de champignon entomopathogène à l'intérieur du puparium. Pour se faire, elles étaient tout d'abord aseptisées pour enlever les particules infectieuses présentes en surface et ainsi éviter d'obtenir des résultats faux-positifs. Un premier rinçage avec de l'eau distillée stérile était réalisé afin de déloger les particules de sable. Les pupes étaient ensuite immergées pour deux secondes dans de l'alcool 70 % suivi d'un bref rinçage à l'eau distillée stérile. Elles étaient alors soumises à un trempage d'une minute dans une solution contenant 1 % d'hypochlorite de sodium, suivi d'un double rinçage à l'eau distillée stérile (Lacey *et al.*, 1997). Les pupes étaient par la suite transférées individuellement dans des boîtes de Petri de 35 mm contenant une gélose de Sabouraud au dextrose. Elles étaient alors écrasées sur la gélose nutritive à l'aide d'une lame de scalpel stérile, ce qui avait pour effet de libérer leur contenu. La présence d'imagos pouvait alors être confirmée ou infirmée. Les boîtes de Petri étaient finalement scellées avec une pellicule de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) et incubées à la noirceur à 25 °C pour une période maximale de 7 jours. À la fin de la période d'incubation, la présence de développement de muscardine était alors notée (figure 7.5).



Figure 7.5 : Différentes étapes liées au criblage des isolats chez les larves de *D. radicum*. A : Larves de troisième stade sur papier filtre humecté; B : Une arène contenant dix larves; C : Groupe de cinq arènes réunies dans un plat de plastique; D : Développement de muscardine sur gélose nutritive suite à l'incubation des pupes non écloses; E : Détail d'une pupa scindée en deux et recouverte de muscardine verte.

Les données qui ont été considérées lors de cette expérience sont le nombre de larves mortes, le nombre d'imagos émergés des pupes, le nombre de pupes dites anormales, la mortalité totale (correspond à la somme du nombre de larves mortes et de pupes anormales) et le nombre de pupes ayant développées la muscardine. Les données recueillies ont été exprimées en termes de pourcentage moyen avec les écarts-types correspondant. Le taux d'émergence observé pour les différents traitements a été corrigé avec la formule d'Abbott (1925) afin de tenir compte de l'émergence, et donc la survie, dans les groupes témoins négatifs. Cette opération a ainsi permis d'exprimer les données pour les isolats testés et le témoin positif sous la forme d'un pourcentage de réduction d'émergence. Les pourcentages de larves mortes, de pupes anormales et de mortalité totale ont été corrigés selon les pourcentages observés dans les groupes témoins négatifs à l'aide de la formule de Schneider-Orelli (Püntener, 1981). Les données ont ensuite subi une transformation angulaire afin de stabiliser la variance et de normaliser la distribution des résidus (Sokal *et al.*, 1981). L'hypothèse de l'homogénéité des variances a par la suite été testée par le biais d'un test *F* (PROC TTEST). Puisque le nombre d'observations dans chaque groupe était limité, la normalité des données a été vérifiée en utilisant la procédure PROC UNIVARIATE et le test de Shapiro-Wilk sur le regroupement des déviations par rapport à la moyenne des isolats testés et des groupes témoins positifs (Sokal *et al.*, 1981). Un test de Student au seuil de probabilité de 5 % a été réalisé sur toutes les variables mesurées pour chaque isolat évalué afin de déceler des différences significatives entre leurs moyennes respectives et celle de l'isolat référence INRS 709. Un test identique a également été réalisé afin de comparer les moyennes des deux groupes témoins. Les isolats ont ensuite été comparés entre eux à l'aide du ratio de réduction de l'émergence (*Ratio<sub>RE</sub>*), selon la formule suivante :

$$Ratio_{RE} = \frac{PE_i}{PE_{709}}$$

ou *PE<sub>i</sub>* correspond au pourcentage de réduction de l'émergence observé pour un isolat spécifique et *PE<sub>709</sub>* au pourcentage de réduction de l'émergence enregistré dans le témoin positif (isolat INRS 709).

Une approche similaire a été utilisée pour comparer les isolats sur la base de la mortalité totale corrigée (*Ratio<sub>MT</sub>*) à l'aide de la formule suivante :

$$Ratio_{MT} = \frac{PM_i}{PM_{709}}$$

ou  $PM_i$  correspond au pourcentage de mortalité obtenu pour un isolat spécifique et  $PM_{709}$  au pourcentage de mortalité noté dans le témoin positif (isolat INRS 709).

Pour ces deux ratios, l'hypothèse de l'homogénéité des variances a été vérifiée avec le test de Levene. Afin de vérifier la normalité des données, un test de Shapiro-Wilk a été réalisé par le biais de la procédure PROC UNIVARIATE en combinant les valeurs de la déviation par rapport à la moyenne (résidus) de chacun des groupes (Sokal *et al.*, 1981). Une analyse de variance de type hiérarchique a ensuite été réalisée sur les ratios avec les procédures PROC GLM et PROC NESTED. Des comparaisons multiples ont ensuite permis de vérifier la présence de différences significatives au seuil de probabilité de 5 %, d'une part, entre les isolats (test de Tukey-HSD), et d'autre part, entre les regroupements effectués selon les espèces de champignons étudiées (test de Tukey-Kramer). Le logiciel SAS (SAS 9.2, SAS Institute, Cary, NC) a été utilisé pour l'ensemble des analyses effectuées.

### **Criblage des isolats chez les adultes**

Les difficultés soulevées auparavant concernant l'apport en larves de *D. radicum* a également eu de sérieuses répercussions au niveau de l'approvisionnement en spécimens adultes. La situation était d'autant plus problématique que l'émergence des mouches se réalisait sur une période de plusieurs jours. Considérant les conditions relatives à la réalisation de ce projet, il était donc encore une fois jugé impossible d'effectuer le criblage des 14 isolats de champignons entomopathogènes sélectionnés chez les mouches du chou adultes lors d'une seule expérience. De ce fait, les expériences devaient se dérouler en faisant intervenir un témoin positif et un témoin négatif selon le modèle développé pour le criblage chez les larves. La comparaison des isolats entre eux se serait donc effectuée en exprimant les données obtenues en relation avec le témoin positif. Or, devant la difficulté d'obtenir un nombre satisfaisant de mouches adultes pour la réalisation de ces expériences, seule la pathogénicité de l'isolat INRS 709 a été évaluée.

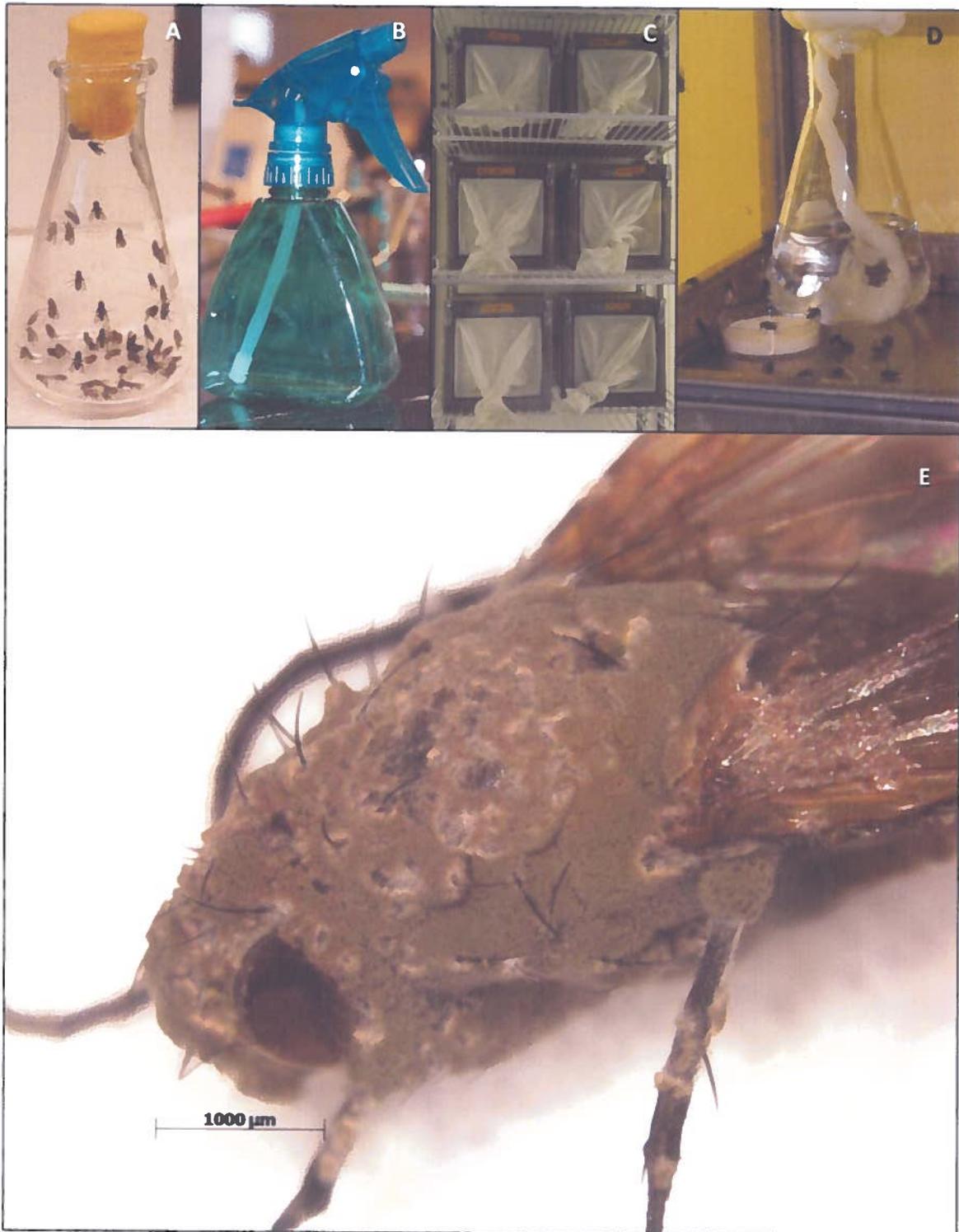
Les expériences se sont déroulées avec des imagos jeunes et relativement du même âge, émergés de leur puppe depuis un maximum de 72 heures. Ils étaient d'abord soumis à un jet de CO<sub>2</sub> pendant 30 secondes dans le but de les figer et de faciliter les manipulations. L'exposition au dioxyde de carbone est une méthode fréquemment employée en laboratoire afin d'immobiliser les insectes (Nicolas *et al.*, 1989). Les mouches étaient ensuite transférées dans des fioles Erlenmeyer stériles de 125 ml au nombre de 50 individus par fiole (figure 7.6). Aucune distinction sur la base du sexe n'a été effectuée. Un bouchon de mousse placé dans le goulot de la fiole empêchait les mouches de s'échapper. Les fioles ont été conservées à 4 °C pendant un

maximum de 60 minutes en attendant la suite de l'expérience. L'exposition au froid est une alternative couramment utilisée afin d'immobiliser les insectes (MacAlpine *et al.*, 2011). Après cette période, les mouches ont été exposées à 950 µl d'une suspension de l'isolat INRS 709 concentrée à  $1 \times 10^8$  conidies/ml et pulvérisée en fines gouttelettes à l'aide d'un petit vaporisateur manuel (figure 7.6) (Mochi *et al.*, 2010b). Le traitement témoin consistait en un effectif de 50 mouches soumises à une vaporisation de 950 µl d'eau distillée stérile. L'exposition au froid diminuait grandement le risque de voir les mouches quitter la fiole au moment de la vaporisation. L'expérience fut répétée huit fois avec des cohortes d'imagos différentes. Ainsi, la détermination de la susceptibilité de la mouche du chou à l'isolat INRS 709 de *M. anisopliae* s'est réalisée sur un total de 400 individus.

Suite à cette pulvérisation, les mouches étaient alors immédiatement retirées de la fiole Erlenmeyer et transférées sur un papier filtre sec de type qualitatif (Grade 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK) contenu dans le couvercle d'une boîte de Petri de 90 mm. Cette boîte de Petri était elle-même située à l'intérieur d'une cage cubique semblable à celles utilisées pour l'élevage de *D. radicum* et dont les côtés mesuraient 20,5 cm. Cinq minutes suivant la vaporisation, les mouches semblaient mortes et n'étant pas en mesure de se déplacer ont été retirées de l'expérience.

Les cages ont par la suite été placées en bloc complet aléatoire à l'intérieur d'une chambre environnementale (MLR-350H, Sanyo Electric Ltd., Osaka, Japon) maintenue à une température de 20 °C, une humidité relative de 50 % et une photopériode de 18 heures par jour (figure 7.6). L'incubation aux conditions décrites s'est déroulée sur une période de sept jours. Les mouches s'abreuvaient d'eau distillée stérile contenue dans un flacon de culture cellulaire de 50 ml (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) et migrant par remonté capillaire dans un morceau de coton. Une portion de 5 g de la nourriture sèche décrite auparavant et disposée dans la base d'une boîte de Petri de 35 mm de diamètre était également mise à la disposition des mouches pour toute la durée de l'incubation.

Après une semaine, le nombre d'imagos vivants et morts était pris en note. Il est généralement recommandé de confirmer la présence d'infections fongiques en incubant les insectes morts en condition d'humidité relative élevée, ceci afin de favoriser le développement de muscardine sur les cadavres. Dans le but de déterminer si des contaminations accidentelles sont survenues en cours d'essais, il est également préférable d'incuber les individus morts appartenant aux groupes témoins négatifs (Butt *et al.*, 2000). Les mouches mortes ont donc été retirées des cages et placées individuellement dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre contenant un



**Figure 7.6 : Différentes étapes liées au criblage des isolats chez les adultes de *D. radicum*. A : Cohorte de mouches dans une fiole Erlenmeyer; B : Vaporisateur manuel servant à effectuer les pulvérisations; C : Disposition des cages dans la chambre environnementale; D : Mouches mortes sur le plancher d'une cage; E : Détail d'une mouche recouverte de muscardine verte causée par l'isolat INRS 709.**

papier filtre de type qualitatif (Grade 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK) humecté avec de l'eau distillée stérile, ceci afin de favoriser la sporulation des champignons sur les cadavres (figure 7.6). Les boîtes de Petri étaient ensuite cachetées avec un film de plastique (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA). Elles étaient finalement placées à la noirceur dans un incubateur maintenu à 25 °C pour une période maximale de sept jours. Le développement de muscardine était alors noté à la fin de la période d'incubation (figure 7.6).

Les données ayant été considérées sont la mortalité des imagos et le nombre d'individus ayant développé la muscardine suite à la période d'incubation. Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage avec les écarts-types associés. Dans le but d'homogénéiser les variances et de normaliser la distribution des résidus, les données ont subi une transformation angulaire (Sokal *et al.*, 1981). Un test *F* d'égalité des variances (PROC TTEST) a ensuite permis de vérifier l'hypothèse de l'homogénéité des variances. La normalité des données a été vérifiée en utilisant la procédure PROC UNIVARIATE et le test de Shapiro-Wilk. Enfin, un test de Student au seuil de probabilité de 5 % a été réalisé afin de déceler une différence significative entre la mortalité des groupes témoins négatifs et l'isolat référence INRS 709. Pour l'ensemble des analyses effectuées, le logiciel SAS (SAS 9.2, SAS Institute, Cary, NC) a été utilisé.

## CHAPITRE 8 : RÉSULTATS

### Régie d'élevage

L'élevage fut amorcé en janvier 2010 et les opérations ont cessé après 22 mois d'activités en novembre 2011. La donnée relative à la régie d'élevage ayant fait l'objet du suivi le plus exhaustif est le poids moyen des pupes. En effet, 50 observations ont été réalisées pour cette donnée au fil du projet et une valeur moyenne ( $\pm$  écart type) de  $13,0 \pm 0,9$  mg par pupa a été obtenue. Pour ce qui est de l'émergence des adultes, 20 cohortes ont été examinées. En moyenne,  $89,1 \pm 5,1$  % des mouches avaient quitté leur puparium suite à la période d'incubation de 14 jours. Le taux d'éclosion des œufs a été documenté au moyen de 15 observations et une valeur moyenne de  $86,9 \pm 4,2$  % a été enregistrée. Finalement, 15 cohortes d'insectes ont fait l'objet d'un suivi régulier, ce qui a permis d'établir un temps moyen de développement de  $30,8 \pm 0,7$  jours entre la ponte des premiers œufs et l'émergence des premières mouches adultes.

Quoique laborieuse, la méthode choisie pour produire les larves a permis la réalisation des épreuves biologiques. Le nombre de larves de troisième stade obtenues variait cependant selon les cohortes, oscillant entre 150 et 400 individus. Concernant les mouches adultes, des contraintes d'espace, de temps et de main d'œuvre ont limité le nombre d'individus et de cohortes pouvant être produits. Des groupes de 100 mouches ont tout de même été obtenus à huit reprises, permettant ainsi la réalisation des expériences portant sur la vulnérabilité des imagos face à l'isolat INRS 709 de *M. anisopliae*.

### Production des isolats de champignons entomopathogènes

Comme on peut le constater au tableau 7.1, tous les 14 isolats sélectionnés ont bien répondu au mode de culture choisi et les suspensions obtenues ont démontré une concentration supérieure à  $1 \times 10^8$  conidies/ml. L'isolat ayant manifesté la plus faible concentration suite à la récolte est l'isolat INRS 707 avec  $2,1 \times 10^8$  conidies/ml. La production la plus concentrée a été obtenue avec l'isolat INRS 1003, avec une concentration de  $8,7 \times 10^9$  conidies/ml. Les isolats appartenant à l'espèce *M. anisopliae* ont tous produit des suspensions avec des concentrations inférieures à  $1 \times 10^9$  conidies/ml. Hormis les isolats INRS 238 et INRS 1009, la concentration des productions des isolats de *T. cylindrosporum* et *B. bassiana* a été supérieure à  $1 \times 10^9$  conidies/ml.

Pour ce qui est de la viabilité des conidies, mesurée selon le pourcentage de germination, l'isolat INRS 208 est celui ayant manifesté la viabilité la plus faible. En effet, une moyenne ( $\pm$  écart type) de seulement  $22,8 \pm 6,2$  % des conidies de cet isolat ont germé suite à la période d'incubation. L'isolat ayant démontré le meilleur taux de germination est l'isolat INRS 1008 avec une moyenne de  $97,3 \pm 1,1$  % des conidies germées. Tous les isolats de *B. bassiana* et de *T. cylindrosporum*, hormis les isolats INRS 208 et INRS 1000, ont obtenu un pourcentage de germination supérieur à 90%. Concernant les isolats de *M. anisopliae*, seul l'isolat INRS 709 a démontré une viabilité des conidies supérieure à 90 %, le pourcentage de germination des autres isolats se situant entre 55 et 75 %.

**Tableau 8.1 : Concentration moyenne des suspensions obtenues et viabilité des conidies pour les isolats de champignons mis en production.**

Espèce	Isolat	Concentration moyenne (conidies/ml)	Viabilité des conidies $\pm$ écart type (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS 238	$2,6 \times 10^8$	$95,0 \pm 2,4$
	INRS 208	$1,7 \times 10^9$	$22,8 \pm 6,2$
	INRS 243	$2,0 \times 10^9$	$94,4 \pm 1,5$
	INRS 242	$3,9 \times 10^9$	$95,7 \pm 2,9$
<i>Metarhizium anisopliae</i>	INRS 707	$2,1 \times 10^8$	$56,6 \pm 2,1$
	INRS 700	$2,3 \times 10^8$	$75,7 \pm 4,6$
	INRS 704	$2,7 \times 10^8$	$71,0 \pm 3,5$
	INRS 705	$3,1 \times 10^8$	$58,3 \pm 4,6$
	INRS 709	$4,3 \times 10^8$	$96,5 \pm 2,2$
	INRS 701	$4,9 \times 10^8$	$70,4 \pm 4,4$
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	INRS 1009	$5,3 \times 10^8$	$92,2 \pm 3,7$
	INRS 1008	$3,1 \times 10^9$	$97,3 \pm 1,1$
	INRS 1000	$3,3 \times 10^9$	$78,6 \pm 4,8$
	INRS 1003	$8,7 \times 10^9$	$91,9 \pm 6,1$

## Criblage des isolats chez les larves

Le taux de nymphose, soit le pourcentage de larves se métamorphosant en pupes, a été relativement stable au cours des expériences. En effet, dans les groupes témoins négatifs, une moyenne ( $\pm$  écart type) de  $98,7 \pm 1,5$  % des individus s'étaient convertis en pupes alors que

95,3 ± 4,2 % des larves avaient fait de même dans les groupes traités avec l'isolat INRS 709. Les analyses statistiques ont permis de déceler une différence significative entre ces deux valeurs (PROC TTEST;  $t = -2,40$ ;  $Pr > t = 0,0237$ ). Par ricochet, la mortalité au stade larvaire s'avère très faible, étant respectivement de 1,3 ± 1,5 % et de 4,7 ± 4,2 % dans les groupes témoins négatifs et positifs. Suite à l'application de la formule de Schneider-Orelli, la mortalité larvaire corrigée pour l'isolat INRS 709 s'élève à 3,9 ± 3,8 %. Parmi tous les isolats testés, seuls les isolats INRS 242 (PROC TTEST;  $t = 11,27$ ;  $Pr > t = 0,0004$ ) et INRS 1009 (PROC TTEST;  $t = 3,60$ ;  $Pr > t = 0,0228$ ) ont procuré un taux de mortalité au stade larvaire qui est significativement inférieur au taux observé dans les groupes témoins positifs (Figure 8.1).

Au fil des expériences, l'émergence moyenne des mouches adultes dans les groupes témoins négatifs a été de 86,8 ± 5,6 %. En fait, l'émergence a été inférieure à 80 % en une seule occasion. Dans les groupes témoins positifs, 38,3 ± 13,7 % des imagos ont émergés des pupes en moyenne pour les quatorze observations. Les valeurs extrêmes observées ont été de 18,0 % et de 64,0 % d'émergence. Les moyennes des groupes témoins s'avèrent différentes de façon significative (PROC TTEST;  $t = -12,22$ ;  $Pr > t = 0,0001$ ). Suite à l'application de la formule d'Abbot, la réduction d'émergence conférée par l'isolat INRS 709 au cours des expériences a oscillé entre 30,4 % et 78,6 % avec une moyenne de 55,8 ± 15,6 %. La figure 8.2 indique que tous les isolats testés hormis les isolats INRS 208 (PROC TTEST;  $t = -4,26$ ;  $Pr > t = 0,0130$ ), INRS 238 (PROC TTEST;  $t = -2,92$ ;  $Pr > t = 0,0431$ ), INRS 242 (PROC TTEST;  $t = -4,28$ ;  $Pr > t = 0,0129$ ) et INRS 243 (PROC TTEST;  $t = -4,87$ ;  $Pr > t = 0,0082$ ) ont produit une réduction d'émergence qui ne diffère pas de façon significative avec la réduction d'émergence conférée par le groupe témoin positif. Ainsi, seul des isolats de *B. bassiana* ont produit une réduction d'émergence significativement inférieure à celle engendrée par l'isolat INRS 709. Les isolats INRS 704, INRS 707, INRS 1003 et INRS 1008 ont engendré une réduction d'émergence supérieure à 50%.

Les analyses subséquentes ont été réalisées à l'aide du ratio de la réponse des isolats, en termes de réduction de l'émergence ( $Ratio_{RE}$ ), relativement au témoin positif. Une grande variabilité s'exprime dans les ratios obtenus puisqu'ils oscillent entre 0,0547 ± 0,0947 pour l'isolat INRS 243 et 1,1040 ± 0,1686 pour l'isolat INRS 704. Seul ce dernier isolat a démontré un ratio supérieur à un correspondant à une réduction de l'émergence équivalente à celle observée chez l'isolat INRS 709. Également, seuls les isolats de *B. bassiana* ont obtenu un ratio inférieur à 0,5. Le modèle d'analyse de variance de type hiérarchique s'est avéré hautement significatif (PROC GLM;  $DL=12$ ;  $F = 9,92$ ;  $Pr > F < 0,0001$ ). En amalgamant les isolats sur la base de leur

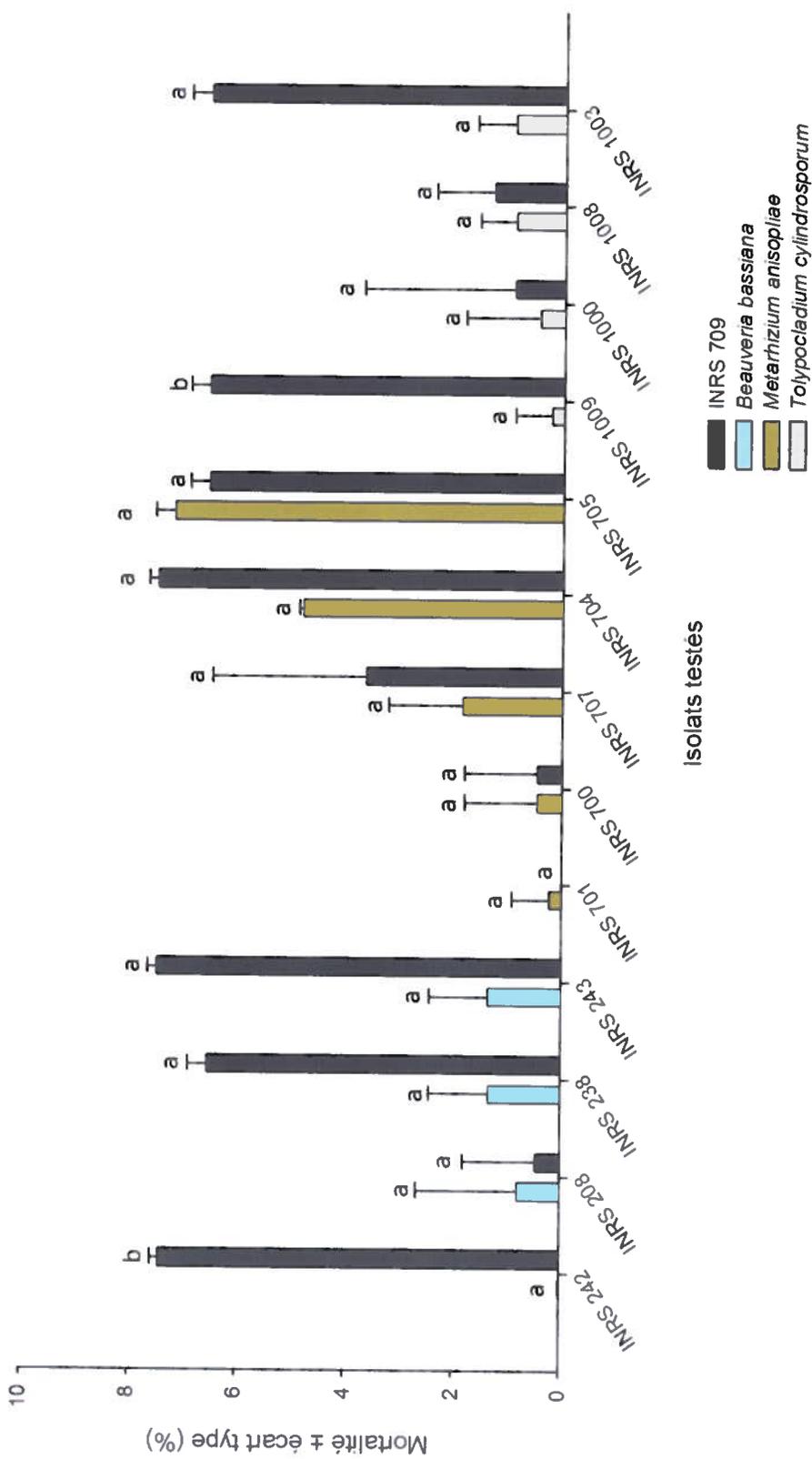


Figure 8.1 : Mortalité au stade larvaire observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. Pour chacun des isolats, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Student;  $\alpha < 0,05$ ).

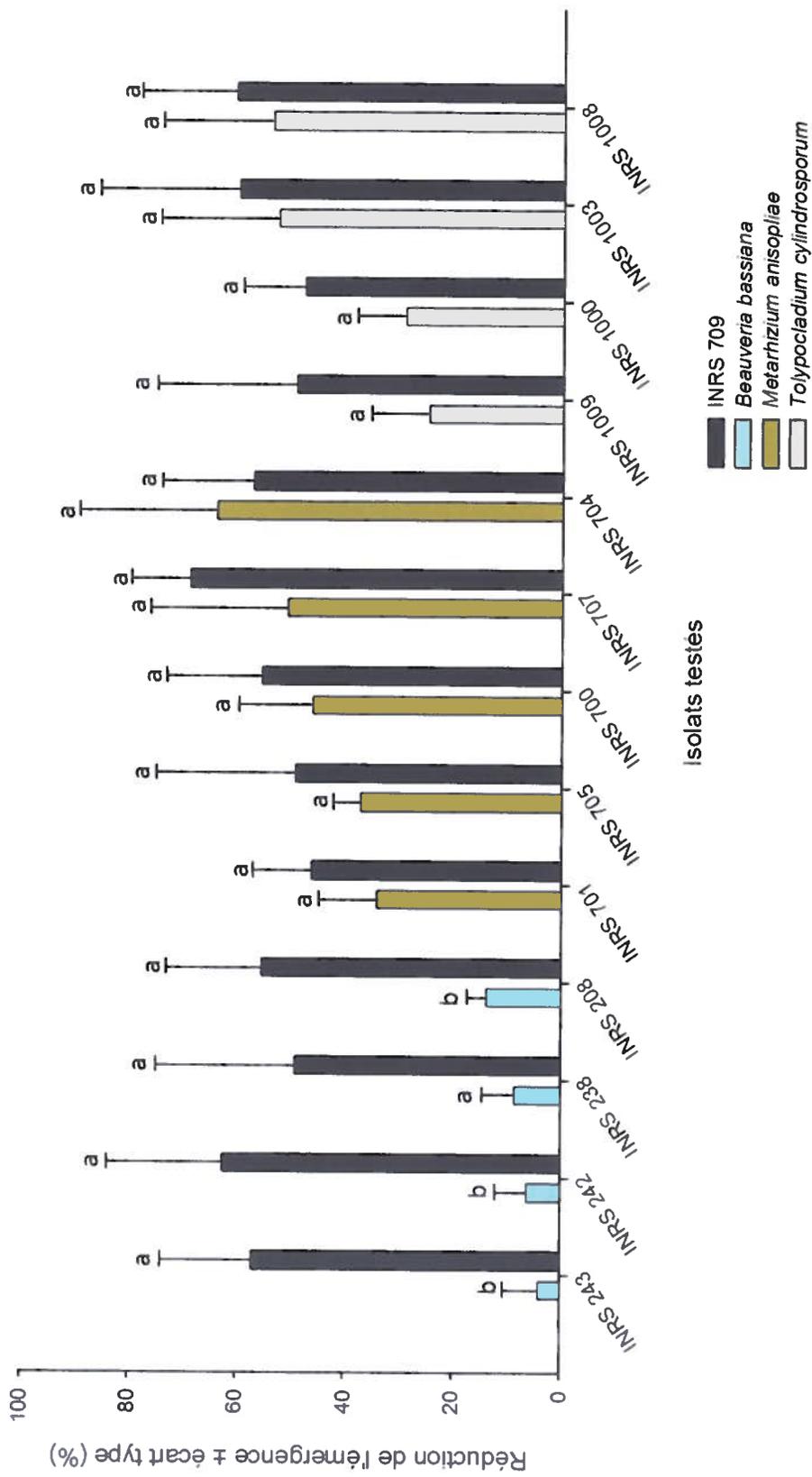


Figure 8.2 : Réduction de l'émergence des imagos observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. Pour chacun des isolats, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Student;  $\alpha < 0,05$ ).

espèce d'appartenance, des différences significatives se sont manifestées entre les regroupements (PROC GLM; DL = 2, F = 50,35; Pr > F < 0,0001). À la figure 8.3, on peut constater que les ratios moyens de réduction d'émergence des isolats de *M. anisopliae* ( $0,86 \pm 0,26$ ) et de *T. cylindrosporum* ( $0,73 \pm 0,21$ ) diffèrent statistiquement du ratio moyen des isolats de *B. bassiana* ( $0,16 \pm 0,13$ ) (Tukey-Kramer; Pr > t < 0,0001). Par contre, les ratios moyens de *M. anisopliae* et de *T. cylindrosporum* ne diffèrent pas de façon significative entre eux (Tukey-Kramer; Pr > t = 0,1935). De plus, le test de Levene indique que la variance des groupes est hétérogène (F = 3.85; Pr > F = 0.0306).

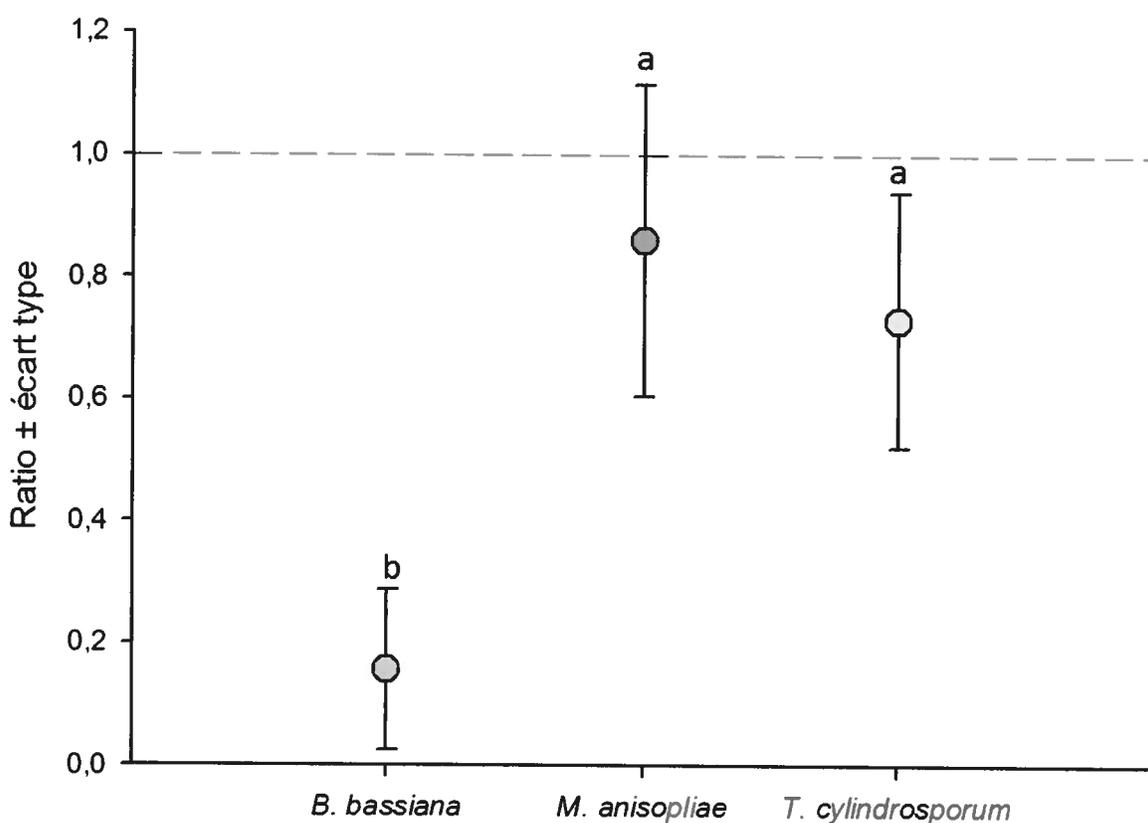
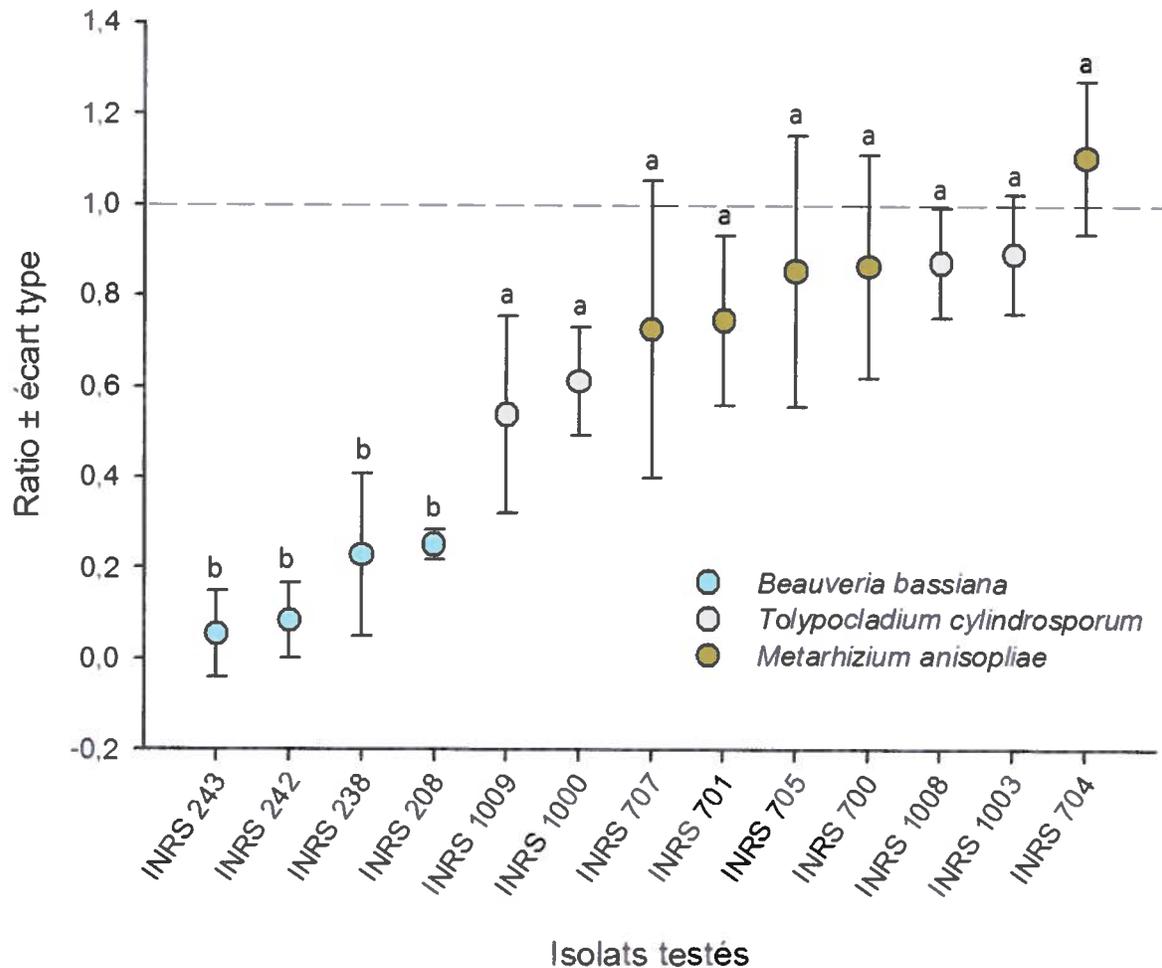


Figure 8.3 : Ratio moyen de réduction d'émergence ( $Ratio_{RE}$ ), relativement à l'isolat référence INRS 709, pour les isolats regroupés selon leur espèce d'appartenance. La ligne pointillée représente un ratio de 1, soit une réduction d'émergence identique à celle conférée par l'isolat INRS 709. Les points ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Tukey-Kramer;  $\alpha < 0,05$ ).

Lorsqu'on analyse la réponse des isolats de façon indépendante, l'analyse de la variance indique qu'aucune différence notable ne se manifeste entre les ratios au sein d'une même espèce, comme on peut l'observer en consultant la figure 8.4 (PROC GLM; DL = 10, F = 1,84;

Pr > F = 0,1031). Les variances s'avèrent homogènes selon le test de Levene (F = 1.90; Pr > F = 0.0829). Pour l'ensemble du modèle d'ANOVA, la procédure NESTED indique quant à elle que la variable espèce est responsable de 74,6 % de la variance observée, comparativement à seulement 5,6 % pour la variable isolat.



**Figure 8.4 :** Ratio moyen de réduction d'émergence (*Ratio<sub>REF</sub>*), pour les isolats testés relativement à l'isolat référence INRS 709. La ligne pointillée représente un ratio de 1, soit une réduction d'émergence identique à celle conférée par l'isolat INRS 709. Les points ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (ANOVA;  $\alpha < 0,05$ ).

La mortalité totale (larves et pupes confondues) dans les groupes témoins négatifs a été en moyenne de  $8,7 \pm 4,3$  % et supérieure à 15 % à une seule reprise. Au cours des expériences, la mortalité totale dans les groupes traités avec l'isolat INRS 709 s'est élevée en moyenne à  $60,9 \pm 15,2$  %, avec un optimum de 82,0 % et un minimum de 30 %. Les deux moyennes observées

dans les groupes témoins s'avèrent statistiquement différentes selon le test de Student utilisé avec la méthode de Cochran pour les variances hétérogènes (PROC TTEST;  $t = 12,77$ ;  $Pr > t = < 0,001$ ). Suite à l'application de la formule de Schneider-Orelli, la mortalité totale corrigée dans les groupes traitements positifs a donc oscillé entre 28,6 % et 80,9 % avec une moyenne de  $57,0 \pm 16,5$  %. La figure 8.5 démontre que seuls trois isolats ont obtenu une valeur de mortalité totale significativement inférieure aux groupes témoins positifs, soit les isolats INRS 208 (PROC TTEST;  $t = -3,32$ ;  $Pr > t = 0,0294$ ), INRS 242 (PROC TTEST;  $t = -3,70$ ;  $Pr > t = 0,0209$ ) et INRS 243 (PROC TTEST;  $t = -4,21$ ;  $Pr > t = 0,0136$ ). Tous les isolats de *M. anisopliae* et de *T. cylindrosporum* ont occasionné une mortalité chez les larves et les pupes équivalente à celle de l'isolat INRS 709. Les isolats INRS 704, INRS 707, INRS 1003 et INRS 1008 ont provoqué la mortalité chez plus de 50 % des individus.

Le ratio de la mortalité totale observée pour chacun des isolats comparativement au témoin positif a ensuite été analysé ( $Ratio_{MT}$ ). La valeur maximale est de  $1,0984 \pm 0,1578$  (INRS 704) et la valeur minimale est de  $0,1069 \pm 0,1068$  (INRS 243). Seul l'isolat INRS 704 possède un ratio supérieur à un, soit une mortalité totale équivalente à celle de l'isolat INRS 709. Également, tous les isolats de *B. bassiana* ont obtenu un ratio inférieur à 0,5. Le modèle d'analyse de variance de type hiérarchique s'est avéré hautement significatif (PROC GLM;  $DL=12$ ;  $F = 8,68$ ;  $Pr > F < 0,0001$ ). Des différences significatives se manifestent entre les groupes lorsque les isolats sont regroupés en fonction de leur espèce d'appartenance (PROC GLM;  $DL=12$ ;  $F = 42,58$ ;  $Pr > F < 0,0001$ ). La variance de ces groupes est d'ailleurs homogène selon le test de Levene ( $F = 2,80$ ;  $Pr > F = 0,0740$ ). La figure 8.6 permet d'apprécier l'absence de différences significatives entre les ratios moyens des espèces *M. anisopliae* ( $0,88 \pm 0,27$ ) et *T. cylindrosporum* ( $0,72 \pm 0,25$ ) (Tukey-Kramer;  $Pr > t = 0,1398$ ). Par contre, le ratio moyen de ces deux espèces diffère de façon significative du ratio moyen des isolats de *B. bassiana* ( $0,17 \pm 0,14$ ) (Tukey-Kramer;  $Pr > t < 0,0001$ ).

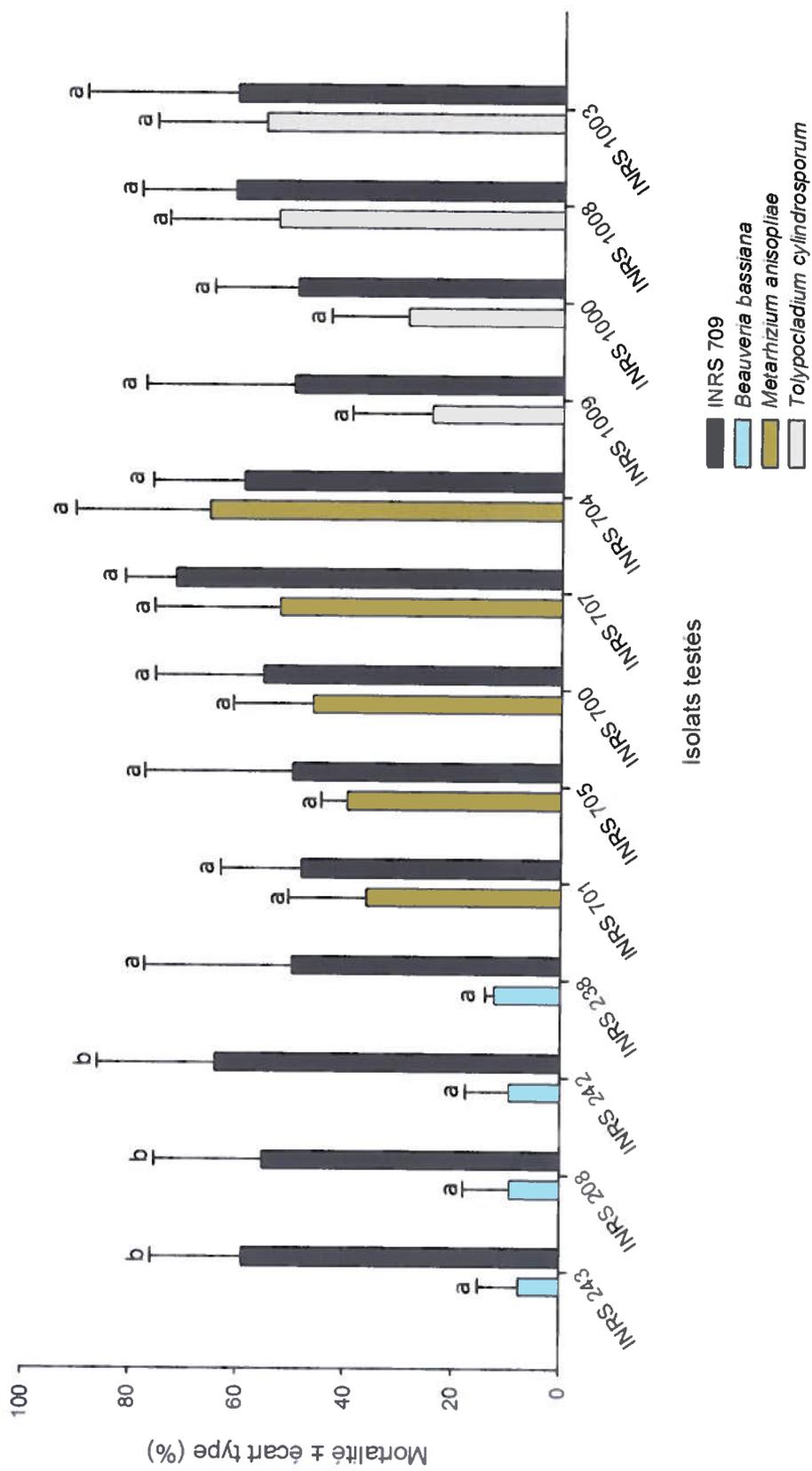
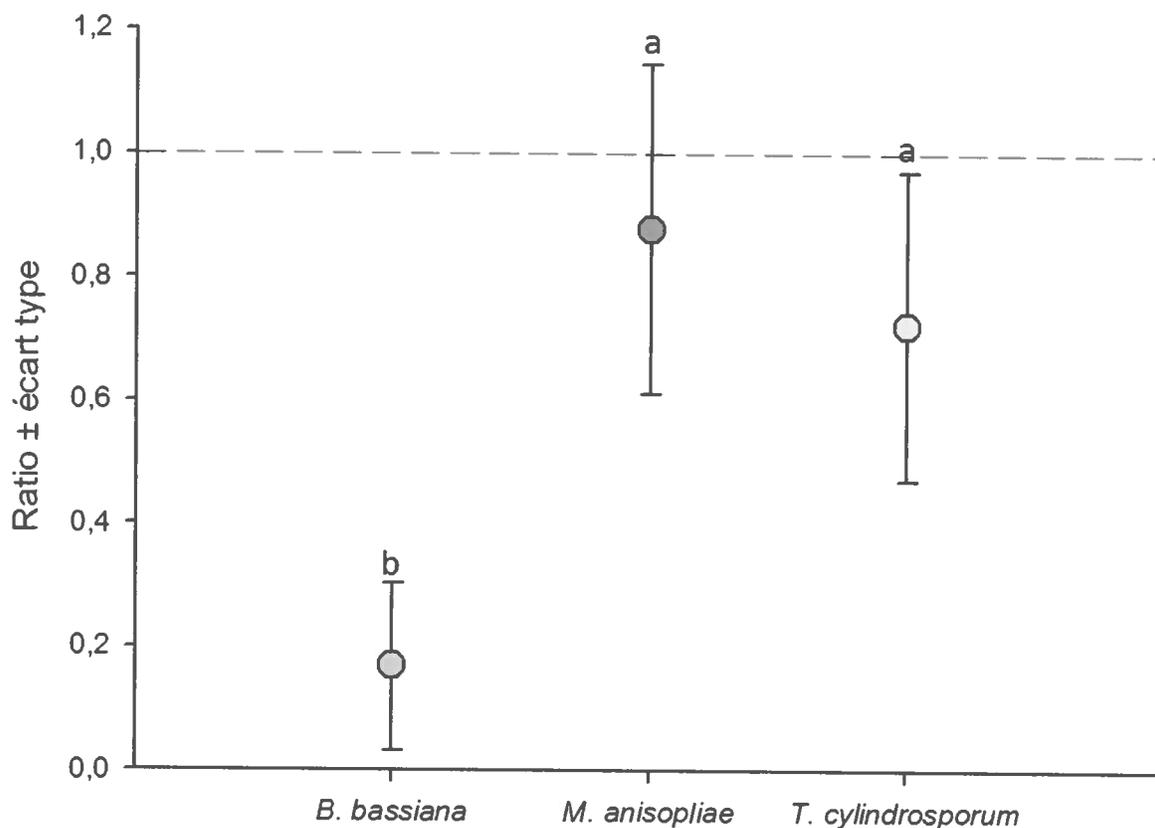


Figure 8.5 : Mortalité totale (larves et pupes) observée pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. Pour chacun des isolats, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Student;  $\alpha < 0,05$ ).



**Figure 8.6 : Ratio moyen de mortalité totale ( $Ratio_{MT}$ ), relativement à l'isolat référence INRS 709, pour les isolats regroupés selon leur espèce d'appartenance. La ligne pointillée représente un ratio de 1, soit une mortalité totale identique à celle conférée par l'isolat INRS 709. Les points ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Tukey-Kramer;  $\alpha < 0,05$ ).**

Comme on peut le constater à la figure 8.7, aucune différence significative ne se manifeste entre les ratios des isolats appartenant à une même espèce (PROC GLM; DL = 10,  $F = 1,90$ ;  $Pr > F = 0,0913$ ) mais leur variance s'avère hétérogène selon le résultat du test de Levene ( $F = 2,19$ ,  $Pr > F = 0,0461$ ). Finalement, pour l'ensemble du modèle d'ANOVA, la variable isolat est responsable de seulement 6,8 % de la variance observée alors que 70,8 % de cette variance est attribuée à la variable espèce (PROC NESTED).

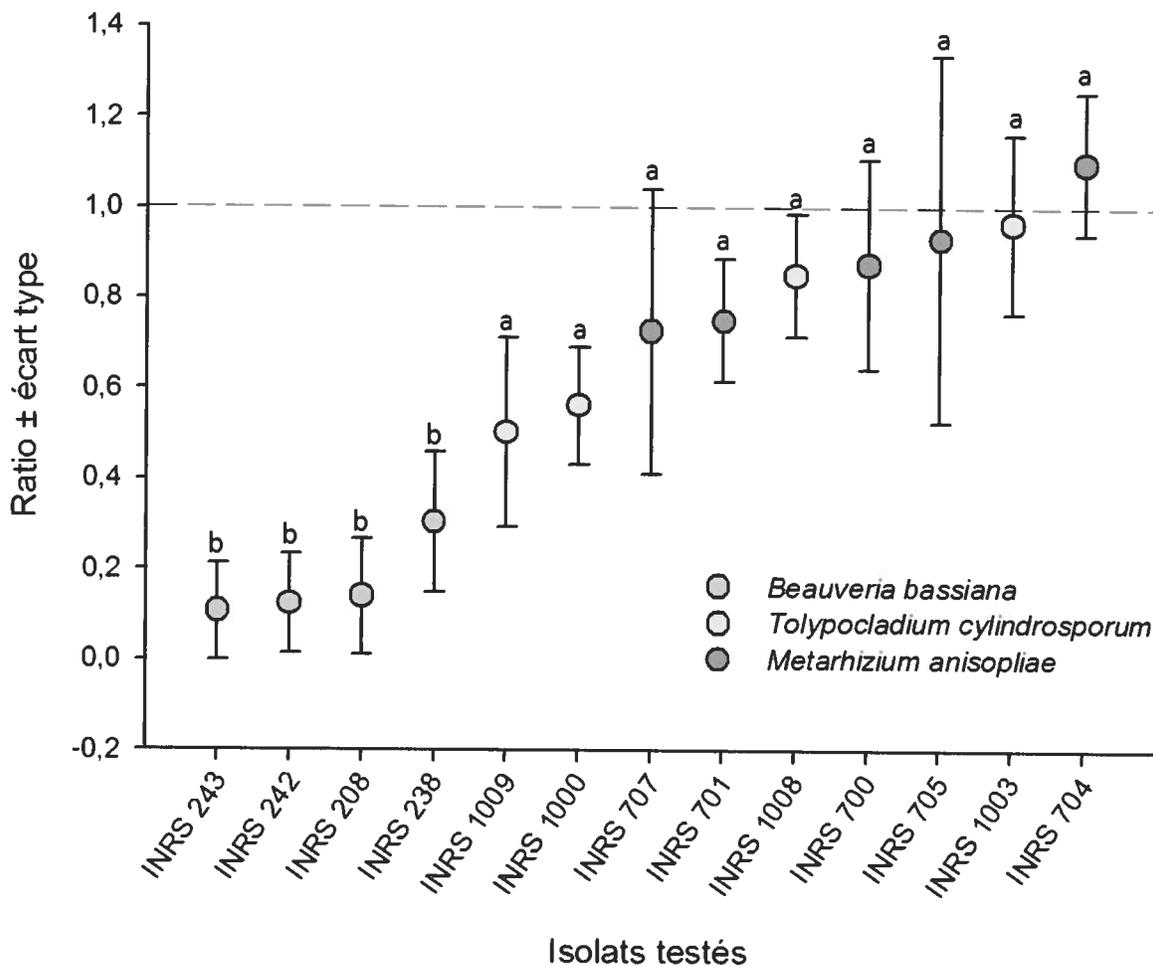


Figure 8.7 : Ratio moyen de mortalité totale ( $Rat_{mort}$ ), pour les isolats testés relativement à l'isolat référence INRS 709. La ligne pointillée représente un ratio de 1, soit une mortalité totale identique à celle conférée par l'isolat INRS 709. Les points ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (ANOVA;  $\alpha < 0,05$ ).

Aucun développement de muscardine n'a été documenté dans les groupes témoins négatifs au fil des quatorze expériences. Dans les groupes traités avec l'isolat INRS 709, une moyenne de  $40,6 \pm 14,8$  % des pupes ont développé la muscardine verte. À la figure 8.8, on peut remarquer que plusieurs isolats ont produit un nombre de pupes arborant la muscardine qui ne diffère pas de façon significative du groupe témoin positif. C'est notamment le cas pour tous les isolats de *T. cylindrosporum* et de *M. anisopliae*, à l'exception de l'isolat INRS 701.

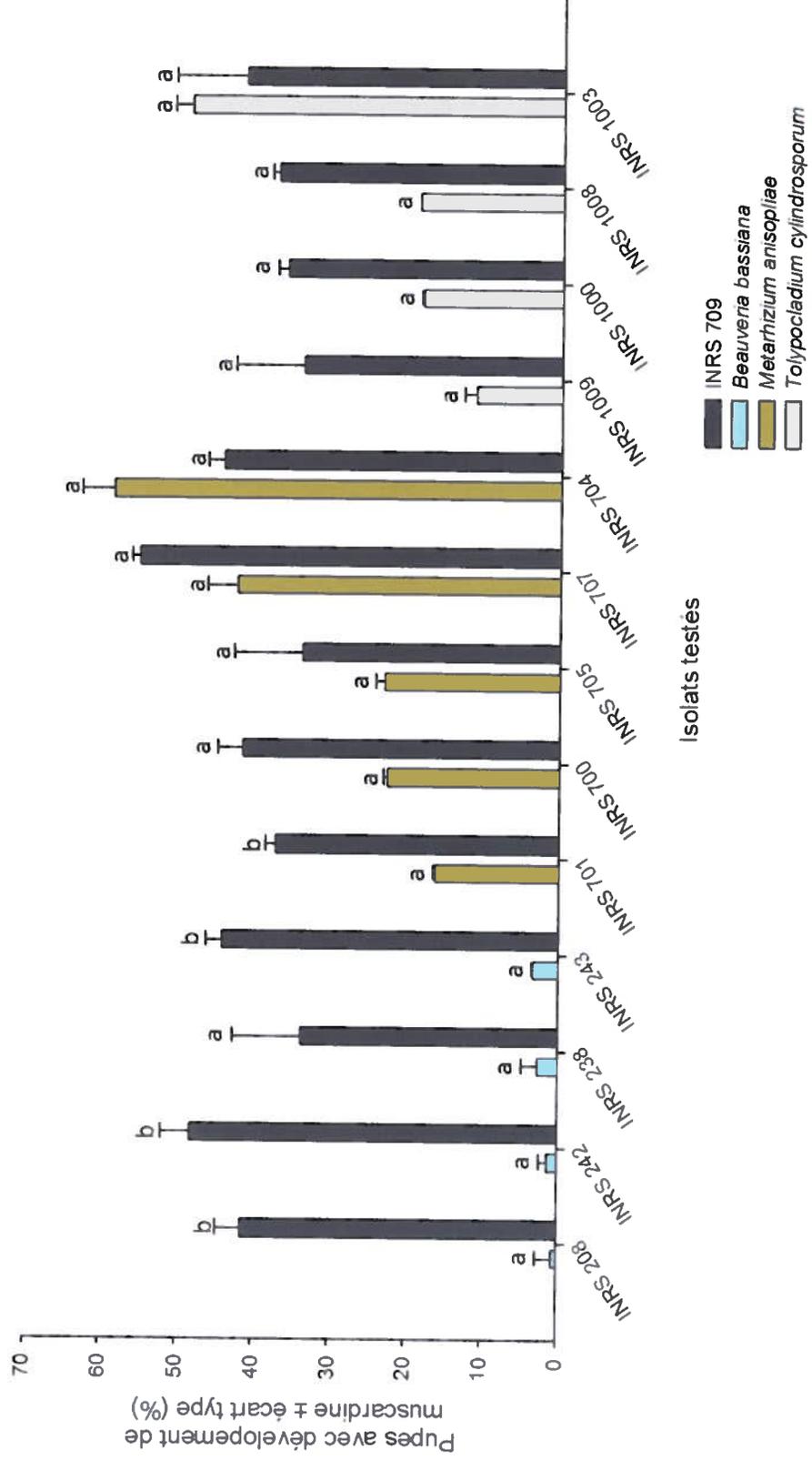


Figure 8.8 : Développement de muscardine observé pour les isolats testés en comparaison avec l'isolat référence INRS 709. Pour chacun des isolats, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de Student;  $\alpha < 0,05$ ).

## **Criblage des isolats chez les adultes**

La mortalité dans les groupes témoins négatifs a été assez élevée, de l'ordre de  $21,8 \pm 9,7$  % en moyenne au cours des huit répétitions. La mortalité observée chez les mouches traitées avec l'isolat INRS 709 a été de  $54,7 \pm 27,8$  % en moyenne. L'optimum de mortalité a été de 100 % alors que seulement 12,8 % des mouches sont décédées lors d'une répétition. Le pourcentage de mortalité occasionnée par l'isolat INRS 709 est significativement supérieur à la mortalité observée dans le groupe témoin négatif selon le test de Student utilisé avec la méthode de Cochran pour les variances hétérogènes (PROC TTEST;  $t = 2,84$ ,  $Pr > t = 0,0251$ ). Suite à l'application de la formule de Schneider-Orelli, la mortalité corrigée en fonction des témoins négatifs s'établit en moyenne à  $43,1 \pm 31,1$  %. Aucun développement de muscardine verte n'a été observé sur les cadavres de mouches incubées appartenant aux groupes témoins négatifs. Une moyenne de  $30,1 \pm 24,3$  % des mouches décédées suite au contact avec l'isolat INRS 709 ont arboré la muscardine suite à la période d'incubation.

## CHAPITRE 9 : DISCUSSION

### Élevage de la mouche du chou

Les résultats concernant la régie de l'élevage de *D. radicum* indiquent que la colonie était vigoureuse et stable au fil de la durée du projet. La donnée ayant fait l'objet du suivi le plus exhaustif, soit le poids moyen des pupes, a déjà été corrélée dans la littérature scientifique avec la fécondité des femelles (Finch *et al.*, 1969b). Dans ce contexte, il était donc important d'obtenir un poids moyen par pupe satisfaisant afin de s'assurer d'un niveau de production d'œufs par femelle adéquat. Cet élément était essentiel à la fois pour le maintien de la colonie et la production des cohortes de larves et de mouches sacrifiées pour les expériences. Or, le poids moyen ( $\pm$  écart type) par pupe obtenu lors du projet ( $13,0 \pm 0,9$  mg) était approprié. En effet, un poids supérieur à 12 mg par pupe s'avère acceptable (Van Keymeulen *et al.*, 1981) quoique 15 mg serait souhaitable selon Whistlecraft et ses collaborateurs (1985). De son côté, Finch (1969b) mentionne que les pupes pesant moins de 10 mg ne devraient pas être utilisées pour le maintien de l'élevage. Un nombre et un poids par pupe supérieurs auraient cependant pu être obtenus si une attention particulière avait été portée au nombre d'œufs inoculés par gramme de rutabaga. En effet, selon différents auteurs, un ratio de 0,7 à 1,6 œufs par gramme de rutabaga est suggéré, ceci afin d'obtenir à la fois une récolte et un poids par pupe adéquat (Finch *et al.*, 1969b, Van Keymeulen *et al.*, 1981, Whistlecraft *et al.*, 1985). Un ratio œufs/poids de rutabaga trop élevé peut par contre occasionner un développement rapide de pourriture bactérienne dans le tissu racinaire, engendrant ainsi de la mortalité larvaire ou des métamorphoses prématurées et des pupes de faible poids (Doane *et al.*, 1964b, Finch *et al.*, 1969b). Cependant, le respect du ratio adéquat s'avère laborieux et exigeant en temps et en ressources humaines. En effet, la moitié du temps requis pour la production des pupes est liée au tranchage et au nettoyage des rutabagas ainsi qu'à l'inoculation de ces derniers avec les œufs de *D. radicum* (Van Keymeulen *et al.*, 1981). Considérant les contraintes relatives au projet, les résultats obtenus concernant le poids des pupes, et donc la fécondité des femelles, étaient tout à fait acceptables pour les besoins des expériences.

L'émergence des adultes s'est également avérée satisfaisante. En effet, dans des conditions fluctuantes de température, des taux d'éclosion de 75 % (Harris *et al.*, 1966) et de 80 % (Van Keymeulen *et al.*, 1981) ont été rapportés. La valeur de  $89,1 \pm 5,1$  % d'imagos émergés obtenue

au cours de cette étude semble donc légèrement supérieure aux données précédemment citées. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la colonie de *D. radicum* a été établie avec des pupes appartenant au biotype hâtif et promptes à émerger au plus au bout de 20 jours à 20 °C (Collier *et al.*, 1989). Également, l'exposition des pupes à des températures supérieures à 20 °C enclenche la période d'estivation, mettant ainsi en veilleuse leur développement (Finch *et al.*, 1985). La température relativement constante à laquelle était soumise la colonie ( $20 \pm 1$  °C) limitait donc le nombre de pupes entrant en période d'estivation, assurant donc un taux d'émergence maximal.

Le taux d'éclosion des œufs, mesure indicatrice de leur viabilité, s'est maintenu à 86,9 %, ce qui concorde avec les informations glanées dans la littérature scientifique. En effet, selon une étude, 86 % des œufs seraient viables en conditions de laboratoire (Finch *et al.*, 1969b), valeur similaire à celle de 87 % rapportée par Van Keymeulen et ses collaborateurs (1981). En ce qui concerne le temps de développement entre la ponte d'un œuf et l'émergence d'un adulte, la valeur obtenue dans la présente étude, soit  $30,8 \pm 0,7$  jours, est légèrement inférieure à la valeur cible. En effet, à une température de  $19 \pm 1$  °C, ces auteurs ont documenté un temps de développement de trois à quatre jours pour les œufs, de 18 à 22 jours pour le stade larvaire et de 12 à 24 jours pour les pupes, ce qui correspond à un temps de développement entre le stade œuf et adulte de 33 à 50 jours (Whistlecraft *et al.*, 1985). Cette petite différence entre les deux valeurs minimales peut s'expliquer par l'utilisation d'une température légèrement supérieure pour le maintien de l'élevage ( $20 \pm 1$  °C), ce qui peut avoir comme effet d'accélérer le développement de tous les stades de l'insecte. À la lumière de tous ces résultats, on peut donc affirmer que la régie d'élevage était adéquate car les valeurs mesurées sont en accord avec les références trouvées dans la littérature scientifique. Ces données permettent de supposer que l'état général des spécimens de *D. radicum* utilisés pour les épreuves biologiques était représentatif de l'espèce.

## **Production et caractérisation des isolats**

La production de conidies aériennes sur substrat solide est la méthode la plus couramment employée pour la production des mycoinsecticides du genre *Beauveria* et *Metarhizium* (Faria *et al.*, 2007). Les isolats sélectionnés ont tous bien répondu à ce mode de culture et les concentrations obtenues ont permis de préparer facilement des suspensions à la concentration requise pour les épreuves biologiques. Quoique que les résultats n'aient pas été soumis à des analyses statistiques, les isolats manifestent des différences relativement à la production de

conidies. Néanmoins, ces différences peuvent s'expliquer tout d'abord par les propriétés inhérentes à leur espèce d'appartenance. En effet, le diamètre moyen des conidies produites par *M. anisopliae* ( $\geq 9 \mu\text{m}$ ) est supérieur au diamètre des conidies de *B. bassiana* ( $\leq 3,5 \mu\text{m}$ ) et de *T. cylindrosporum* ( $4,0-5,8 \mu\text{m}$ ) (Humber, 1997, Soares Jr., 1982). Les conidies de *M. anisopliae* occupent donc un volume supérieur aux conidies de *B. bassiana* et de *T. cylindrosporum* (Jefferies *et al.*, 1999). Par défaut, les suspensions produites par les isolats de *B. bassiana* et de *T. cylindrosporum* peuvent donc contenir un nombre de conidies par unité de volume plus grand que les suspensions de *M. anisopliae*. Également, alors que les conidies de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* ont généralement des propriétés hydrophobes, celles produites par *T. cylindrosporum* sont hydrophiles (Goettel *et al.*, 1997, Jefferies *et al.*, 1999, Wraight *et al.*, 2007). Ainsi, les conidies formées par cette dernière espèce sont plus aptes à être véhiculées par l'eau servant à la récolte tandis que la mise en suspension des conidies hydrophobes s'avère plus problématique. Il a d'ailleurs été remarqué lors du processus de récolte que le coton à fromage faisant office de filtre semblait être obstrué plus facilement par les isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*. L'ajout d'un agent tensioactif aurait cependant pu permettre de faciliter la mise en suspension des conidies hydrophobes produites (Wraight *et al.*, 2007) et ainsi, d'augmenter la concentration des suspensions récoltées. Néanmoins, des précautions s'imposent dans le choix d'un tel additif. En effet, les agents tensioactifs utilisés en forte concentration (plus de 0,1 % v/v) peuvent être toxiques aux conidies (Butt 2000). De plus, sur la base d'essais portant sur des agents phytopathogènes, il est raisonnable de penser que ces agents pourraient modifier le spectre d'hôtes des mycètes entomopathogènes (Jackson *et al.*, 2010). Les résultats obtenus démontrent néanmoins que plusieurs isolats, tel que INRS 1003, possèdent un bon potentiel de production. Cependant, puisque les différents isolats peuvent nécessiter des besoins spécifiques en matières de conditions environnementales et de facteurs nutritifs pour leur croissance (Bhanu Prakash *et al.*, 2008, Dhar *et al.*, 2011, Srei, 2011, Wraight *et al.*, 2001), des travaux pourraient être effectués en ce sens afin d'optimiser leur rendement.

Suite à la production, la viabilité des conidies se doit généralement d'être évaluée (Charnley *et al.*, 2007, Wraight *et al.*, 2007). Pour se faire, deux possibilités s'offrent aux expérimentateurs, soit les tests de germination et les colorations vitales (Goettel *et al.*, 1997, Wraight *et al.*, 2007). Malgré que les résultats des tests de germination n'aient pas fait l'objet d'analyses statistiques, ils suggèrent que la viabilité des conidies produites par les isolats de *T. cylindrosporum* et de *B. bassiana* tend à être supérieure à celles des isolats de *M. anisopliae*. À ce sujet, la virulence des isolats chez les insectes est parfois corrélée avec la rapidité de germination (Altre *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études n'ont pas permis de mettre en évidence cette relation (Liu *et*

*al.*, 2003, Varela *et al.*, 1996). Des recherches suggèrent que ce serait plutôt le niveau d'expression de certaines protéines (Fang *et al.*, 2005, Shah *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2007) et de toxines (Kershaw *et al.*, 1999, Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010, Quesada-Moraga *et al.*, 2006b) qui serait le principal facteur déterminant la virulence. De plus, plusieurs variables telles que la température (Hywel-Jones *et al.*, 1990, Yeo *et al.*, 2003) et le milieu de culture utilisé (Francisco *et al.*, 2006, Ibrahim *et al.*, 2002, Shah *et al.*, 2005) peuvent influencer les résultats des tests de germination. Par contre, une germination et une infection rapide demeurent un trait distinctif des isolats considérés comme étant virulents (Butt *et al.*, 2000). Par surcroît, l'historique de culture des isolats mis en production est inconnu alors que des études ont démontré que la virulence (Morrow *et al.*, 1989, Shah *et al.*, 2007) et la germination des conidies (Safavi, 2011, Vandenberg *et al.*, 2004) de certains isolats de mycètes Hypocréales sont affectées par des cultures successives en milieu artificiel. Cependant, d'autres isolats sont en mesure de conserver leur viabilité en de telles conditions de croissance (Ansari *et al.*, 2011, Brownbridge *et al.*, 2001, Vandenberg *et al.*, 2004) ou du moins, de la retrouver suite à un passage au sein d'un hôte susceptible (Fargues *et al.*, 1983, Prenerová, 1994, Shah *et al.*, 2005). Une production élevée de conidies viables et stables est d'ailleurs un attribut recherché chez les isolats en vue du développement d'un bioinsecticide (Charnley *et al.*, 2007, Wraight *et al.*, 2001) puisque des fluctuations dans la viabilité de l'inoculum produit entravent sa commercialisation (Butt *et al.*, 2006). À cet égard, la viabilité exemplaire des conidies de l'isolat INRS 709 est peu surprenante considérant que cet isolat est disponible commercialement et qu'il a probablement été soumis à une batterie de tests afin de s'assurer de sa stabilité à long terme. Ansari et ses collaborateurs (2011) ont d'ailleurs observé aucune réduction du taux de germination et de la virulence chez cet isolat suite à douze passages consécutifs sur gélose de Sabouraud au dextrose. Dans le cadre des présents travaux, les résultats des tests de germination indiquent que certains isolats, tel que INRS 1003, possèdent une excellente viabilité alors que d'autres, comme INRS 208 et INRS 707 démontrent un faible taux de germination. De par leur viabilité réduite, la pathogénicité de ces isolats a peut-être été sous-estimée lors du criblage chez les larves de la mouche du chou. Le test de germination effectué ne peut cependant pas garantir à lui seul la virulence et la stabilité des isolats. Néanmoins, il serait pertinent de s'assurer de leur stabilité à long terme et de vérifier si leur virulence peut être améliorée suite à un passage *in vivo* au sein de larves de *D. radicum*.

## Développement du protocole de criblage

Le protocole de criblage développé aura permis de vérifier de façon concluante la pathogénicité de 14 isolats de champignons entomopathogènes appartenant à trois espèces taxonomiques envers les larves de troisième stade de la mouche du chou. Or, les tentatives antérieures visant à déterminer la susceptibilité des larves de *D. radicum* et les espèces apparentées aux mycètes entomopathogènes n'ont pas été couronnées de succès (Klingen *et al.*, 2002c, Poprawski *et al.*, 1985, Vänninen *et al.*, 1999b). Selon Davidson et Chandler (2005), ceci serait relié à la difficulté de trouver une diète artificielle n'exerçant pas une action fongistatique tout en étant propice à l'enfouissement des larves (selon leur comportement naturel) et permettant aux évaluateurs de les retrouver facilement pour apprécier leur condition. Les auteurs mentionnent aussi avoir été incapables de trouver une diète adéquate pour l'alimentation des larves de *D. radicum* et ont donc redirigé leurs efforts de criblage sur la mouche de l'oignon. Étrangement, malgré qu'une diète artificielle pour l'alimentation des larves a été mise au point (Dambre-Raes *et al.*, 1976), aucune mention de son utilisation n'a été répertoriée dans la littérature scientifique.

L'étude la plus probante cherchant à évaluer la vulnérabilité des larves de *D. radicum* aux champignons entomopathogènes est celle de Bruck et ses collaborateurs (2005). Par contre, cette étude considérait seulement trois isolats de *M. anisopliae* et un seul isolat de *B. bassiana*. Dans le cadre des présents travaux, il a donc été naturel de s'inspirer de leur méthodologie afin de maximiser les chances d'obtenir des résultats probants. Par ailleurs, les essais préliminaires réalisés sur des individus au début du troisième stade larvaire et traités par immersion dans les suspensions fongiques ont donné des résultats très hétérogènes (données non montrées). Le taux de mortalité dans les groupes témoins était par surcroît inadéquat, étant de l'ordre de 30 %. De plus, de par les contraintes liées à l'approvisionnement en larves, il s'avérait impossible de tester tous les isolats sélectionnés du même coup à l'aide d'un dispositif aléatoire à blocs complets. Il a donc été nécessaire de développer une stratégie alternative permettant d'optimiser l'utilisation des individus du stade larvaire disponibles tout en vérifiant la pathogénicité d'un maximum d'isolats. Or, la susceptibilité des insectes aux pesticides de synthèse et aux agents microbiens est assujettie à des variations naturelles entre les générations et au sein des différentes cohortes d'une population. Ces variations naturelles se manifestent peu importe le souci accordé par l'expérimentateur à la standardisation des techniques utilisées pour les épreuves (Robertson *et al.*, 1995). Inspiré par certaines études (Liu *et al.*, 2002, Wraight *et al.*, 1998, Wraight *et al.*, 2010), il a donc été décidé d'incorporer un traitement témoin positif dans les expériences. L'isolat INRS 709 a été choisi en ce sens

puisque sa pathogénicité envers les larves de second stade de *D. radicum* a été documentée auparavant (Bruck *et al.*, 2005). Ainsi, en exprimant la réponse des isolats en rapport avec celle de l'isolat référence, il a été possible de comparer les isolats testés entre eux et ce même si les expériences se sont déroulées avec des cohortes d'insectes différentes. Cette façon de procéder aura permis de vérifier la pathogénicité d'un plus grand nombre d'isolats envers les larves de *Delia radicum* que dans les études antérieures. De plus, les difficultés soulevées par d'autres auteurs (Vänninen *et al.*, 1999b) concernant la mortalité élevée dans les groupements témoins n'ont pas été rencontrées. Le fait de réaliser les expériences avec des larves de troisième stade, donc plus grosses, facilitait les manipulations et diminuait le risque d'occasionner des blessures potentiellement mortelles. Également, le fait de limiter au minimum leur manipulation a probablement contribué à maintenir bas le taux de mortalité dans les groupes témoins négatifs. Enfin, l'utilisation de larves matures étant sur le point de se métamorphoser en pupes rendait inutile l'ajout de nourriture dans les arènes servant aux épreuves biologiques. En ce sens, les recommandations de Klingen et ses collaborateurs (2002c) concernant la présence de composés pouvant inhiber l'efficacité des mycètes entomopathogènes ont donc été respectées.

## **Criblage des isolats chez les larves**

Les résultats obtenus démontrent que la pathogénicité des mycètes Hypocréales envers les larves de *D. radicum* est soumise à des variations interspécifiques. En effet, que ce soit en observant le ratio de la réduction de l'émergence ou de la mortalité totale comparativement au témoin positif, l'espèce *B. bassiana* apparaît comme étant nettement moins pathogène que les espèces *M. anisopliae* et *T. cylindrosporum*. Par contre, sur la base des résultats obtenus avec les isolats sélectionnés, la pathogénicité exprimée par ces deux dernières espèces semble équivalente. Également, les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer que des variations significatives sont présentes entre les isolats au sein d'une même espèce. On doit donc rejeter en partie l'hypothèse de travail. La situation aurait toutefois pu être différente si le criblage se serait effectué avec un nombre d'isolats plus important. En effet, de par la diversité génétique existant au sein des espèces, des variations intra spécifiques concernant la pathogénicité des mycètes Hypocréales envers divers insectes sont fréquemment rapportées dans la littérature scientifique (Leland *et al.*, 2005, Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a, Sabbahi *et al.*, 2008b, Wraight *et al.*, 2010).

Également, le fait d'utiliser l'isolat INRS 709 à titre de témoin négatif s'est avéré un choix

judicieux puisqu'aucun des isolats testés n'ont conféré une réduction d'émergence ou une mortalité significativement supérieure. Par contre, une forte variabilité dans la réponse de cet isolat a été observée au cours des expériences. D'autres chercheurs ont également observé d'importantes variations lors de l'utilisation d'un isolat témoin afin de comparer la réponse de différents isolats au fil du temps (Wraight *et al.*, 1998). Dans le cas de la présente étude, les variations observées ne sont probablement pas le fruit d'une baisse de la viabilité des conidies de l'isolat référence puisque les tests de germination ont confirmé sa stabilité. Elles peuvent cependant être attribuées, entre autres, à une variation dans la susceptibilité des cohortes d'insectes utilisées. Ces variations exposent cependant les limites de la stratégie consistant à inclure un traitement témoin positif pour comparer la réponse des isolats entre eux. En effet, cette stratégie fut élaborée au départ pour tester différentes préparations de pesticides chimiques contenant le même ingrédient actif. Cependant, les changements environnementaux ou les variations relativement à la susceptibilité des insectes au fil des expériences peuvent avoir des effets différents selon les isolats testés (Wraight *et al.*, 1998, Wraight *et al.*, 2010).

Malgré tout, les présents travaux confirment la susceptibilité du stade larvaire de *D. radicum* à certains champignons entomopathogènes tel que rapporté par d'autres auteurs (Bruck *et al.*, 2005, Vänninen *et al.*, 1999b). Par contre, la faible mortalité observée au stade larvaire (moins de 10 % des individus) suggère que les isolats testés n'étaient pas assez virulents pour tuer les asticots avant que la métamorphose en pupe ne soit entamée. En effet, la pathogénicité s'est majoritairement exprimée alors que les spécimens de *D. radicum* étaient au stade de pupe. Ceci n'est peut-être pas surprenant considérant que sous des conditions optimales, de trois à cinq jours sont souvent nécessaires entre le moment de l'application des conidies et la mort des insectes (Inglis *et al.*, 2001). Les résultats obtenus sont donc en accord avec l'énoncé de Tanada et Kaya (1993) selon lequel les pupes nouvellement formées seraient vulnérables aux mycètes entomopathogènes de par le fait que leur cuticule est plus mince. Par ailleurs, selon les propos de Vasilyevskii (1929) cités par Vänninen et ses acolytes (1999b), les pupes fraîchement formées de *D. floralis* seraient le stade immature de l'espèce le plus susceptible à l'infection par les mycètes entomopathogènes de par un affaiblissement des mécanismes de défense survenant au moment de la métamorphose. Suite à l'exposition des larves de second et troisième stades de *D. radicum* aux conidies de certains isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, Vänninen et ses collaborateurs (1999b) avaient également observé dans leurs essais que la mortalité se manifestait parfois au-delà du stade larvaire chez les pupes. Ce type d'observation a également été rapporté dans des travaux portant sur des diptères de la famille des Tephritidae. Cependant, l'exposition directe des pupes aux conidies occasionne un taux

d'infection plus faible et la mortalité observée diminue avec l'âge des pupes (Cossentine *et al.*, 2010, Ekesi *et al.*, 2002). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'incapacité des tubes germinatifs à pénétrer la cuticule des pupes plus âgées de par sa sclérotisation accrue (Ekesi *et al.*, 2002). En effet, l'épaisseur et le niveau de durcissement de la cuticule conférés par la sclérotisation peut affecter la pénétration des tubes germinatifs (Hajek *et al.*, 1994). La sclérotisation est un procédé complexe qui consiste en la stabilisation et le durcissement de la cuticule par le biais de l'incorporation de composés phénoliques dans sa structure (Andersen, 2010). La méthodologie choisie dans la présente étude aurait donc vraisemblablement permis aux conidies d'infecter les larves avant que la sclérotisation ne se manifeste. Également, il a été démontré que la mise en contact des pupes nouvellement formées de *D. antiqua* avec des suspensions de conidies de *B. bassiana*, de *M. anisopliae* et de *Paecilomyces spp.* provoque un faible taux de décès. Sous certaines conditions, il a par contre été observé qu'une mortalité à retardement se manifestait chez les adultes émergeant des pupes survivantes (Poprawski *et al.*, 1985). Ce phénomène a également été rapporté chez d'autres diptères appartenant au genre *Ceratitis*. Il a été suggéré que l'infection des mouches adultes se faisait pendant la métamorphose ou par contact avec des conidies présentes sur la puppe au moment de l'émergence (Ekesi 2002). Certes, il aurait été fort intéressant de consigner les effets délétères engendrés par les mycètes sur les mouches adultes ayant survécu à l'inoculation au stade larvaire. Hélas, la méthodologie utilisée dans la présente étude ne le permettait pas et seule la susceptibilité des larves matures a été documentée, complétant ainsi les publications antérieures sur le sujet.

Les expériences démontrent donc que tous les isolats de *M. anisopliae* et de *T. cylindrosporum* testés ont induit une réduction d'émergence et une mortalité totale importante lorsque testés sur les larves matures de *D. radicum*. D'autres auteurs ont documenté en conditions de laboratoire une vulnérabilité relativement faible de la part des larves du genre *Delia* aux mycètes Hypocréales (Davidson *et al.*, 2005, Klingen *et al.*, 2002c, Vänninen *et al.*, 1999b). Certains ont émis l'hypothèse que la biodiversité microbienne présente dans l'environnement où se nourrissent les larves pourrait leur conférer une certaine protection contre les champignons entomopathogènes par le biais de mécanismes de coévolution (Vänninen *et al.*, 1999a). Par contre, les résultats obtenus dans l'étude qui nous concerne sont plus en accord avec ceux obtenus par Bruck et ses acolytes (2005). En effet, ce groupe de chercheurs avait démontré la pathogénicité de trois isolats de *M. anisopliae* envers les larves de second stade de *D. radicum* suite au contact avec du sol contaminé avec  $3,85 \times 10^6$  conidies par gramme de sol (Bruck *et al.*, 2005). Le type d'épreuve biologique choisie pourrait cependant avoir eu un impact significatif

sur les résultats de la présente étude. En effet, l'immersion dans les suspensions de conidies produit généralement des résultats variables démontrant une faible susceptibilité de la part des larves de *Delia spp.* (Davidson *et al.*, 2005, Klingen *et al.*, 2002c, Vänninen *et al.*, 1999b) et de d'autres diptères (Daniel *et al.*, 2009, De La Rosa *et al.*, 2002). Bien sûr, cette faible vulnérabilité peut être attribuable à la sélection d'isolats s'avérant peu virulents. Par contre, on a opté dans la présente étude pour une méthodologie ayant été utilisée avec succès par d'autres expérimentateurs consistant à mettre les larves en contact avec un substrat contaminé avec les conidies (Bruck *et al.*, 2005, Cossentine *et al.*, 2010, Ekesi *et al.*, 2002). Contrairement à la méthode d'immersion, la contamination du substrat au taux de  $2 \times 10^7$  conidies par gramme de sable garantissait un contact intime et continu des larves de *D. radicum* avec les propagules infectieuses. Certes, les conidies étaient déposées en surface et non pas incorporées uniformément dans le substrat. Par contre, les nombreuses galeries creusées par les larves dans le sable avant d'amorcer leur métamorphose témoignent d'un brassage et d'une redistribution des conidies dans le milieu. Par ailleurs, Klingen et ses collaborateurs (2002a) ont émis l'hypothèse que les larves de *D. floralis* seraient plus sujettes aux infections par *T. cylindrosporium* avec cette méthode de par le fait qu'elles creusent dans le sol avec leurs pièces buccales. Le même raisonnement peut s'appliquer aux larves de *D. radicum* et s'appuie sur le fait que *T. cylindrosporium* est notoire pour sa capacité à infecter les cavités buccales, le pharynx et l'estomac des larves de certains diptères de la famille des Culicidae (Soares Jr., 1982, Weiser *et al.*, 1981). L'humidité relative élevée retrouvée à ces endroits faciliterait la germination des conidies et le fait que la cuticule y soit généralement plus mince favoriserait la pénétration des tubes germinatifs (Charnley *et al.*, 2007, Tanada *et al.*, 1993). Quoiqu'il en soit, dans les conditions relatives à l'étude qui nous concerne, on peut conclure que les larves matures de *D. radicum* sont relativement susceptibles aux mycètes *M. anisopliae* et *T. cylindrosporium* puisque certains isolats ont été en mesure de causer plus de 50 % de mortalité et une réduction d'émergence significative.

Les observations effectuées dans cette étude sont fidèles à celles de d'autres expérimentateurs qui avaient également remarqué que *M. anisopliae* semblait plus pathogène que *B. bassiana* envers les larves du genre *Delia* (Bruck *et al.*, 2005, Davidson *et al.*, 2005, Vänninen *et al.*, 1999b). Les résultats obtenus permettent donc d'apprécier la pathogénicité de plusieurs isolats de *M. anisopliae* envers les larves matures de *D. radicum*, notamment l'isolat INRS 709. Certes, la vulnérabilité des larves de second stade à cet isolat avait fait l'objet d'une publication auparavant (Bruck *et al.*, 2005) mais la susceptibilité des asticots matures n'avait pas été démontrée à ce jour. Également, les résultats obtenus permettent de statuer sur la vulnérabilité

des larves de troisième stade de la mouche du chou à quatre isolats appartenant à l'espèce *T. cylindrosporum*. Seule une étude effectuée en conditions de laboratoire (Lam *et al.*, 1988) et une expérience en champs (Vänninen *et al.*, 1999a) avaient suggéré la susceptibilité des larves de *D. radicum* envers ce mycète. Également, la pathogénicité de trois isolats de *T. cylindrosporum* avait été documentée chez les larves de premier stade de *D. floralis*. Cependant, un seul isolat avait été en mesure de conférer une réduction de longévité significative de l'ordre de 0,4 jours entre le moment de l'éclosion des œufs et la mort des jeunes larves. Par ailleurs, les chercheurs ont observé que la pathogénicité de deux isolats de *T. cylindrosporum* (20,9 % et 14,0 % de mortalité) était supérieure à celle d'un isolat de *M. anisopliae* (0,9 % de mortalité) chez les larves de deuxième et troisième stade confondu de *D. floralis*. Cependant, les chercheurs sont d'avis que l'utilisation de rutabaga râpé pour alimenter les asticots a eu un effet négatif sur la virulence des isolats testés (Klingen *et al.*, 2002c). Une étude subséquente a d'ailleurs permis d'établir que la germination des conidies de *T. cylindrosporum* et de *M. anisopliae* peut être affectée par la présence de certains composés volatils émis par les Brassicaceae. La présence de rutabaga râpé diminue également la virulence des conidies de *M. anisopliae* lorsque testées envers *G. mellonella* (Klingen *et al.*, 2002b). Puisqu'aucun rutabaga n'était présent dans les arènes lors des expériences, les résultats de la présente étude permettent donc d'apprécier pleinement la vulnérabilité des larves de troisième stade de *D. radicum* aux isolats de *T. cylindrosporum* et de *M. anisopliae* choisis. Comme en témoigne une autre étude de Klingen et ses acolytes, une étroite association semble exister entre *T. cylindrosporum* et *D. floralis* puisque ce mycète est fréquemment détecté dans les sols lorsque cet insecte est utilisé comme appât (Klingen *et al.*, 2002a). Il est donc raisonnable de penser qu'un tel lien existe également avec *D. radicum*. Les présents travaux démontrent que des isolats de *T. cylindrosporum* peuvent occasionner une réduction d'émergence et une mortalité importante lorsque les larves matures y sont exposées peu avant la métamorphose. Ces résultats viennent confirmer les propos de Klingen mentionnant avoir observé lors d'études préliminaires une réduction de l'émergence des adultes de l'ordre de 36% lorsque les larves matures de *D. radicum* sont exposées à *T. cylindrosporum* quelques temps avant la métamorphose en pupes (Klingen *et al.*, 2002c).

Hormis dans les études pilotées par Lam (1988) et Klingen (2002c), le mycète *T. cylindrosporum* n'a pas attiré l'attention des chercheurs lors des études de laboratoire portant sur la susceptibilité des larves du genre *Delia* aux mycètes entomopathogènes (Bruck *et al.*, 2005, Davidson *et al.*, 2005, Vänninen *et al.*, 1999b). Plusieurs études effectuées sur les larves de d'autres espèces de diptères ont également fait abstraction de l'espèce *T. cylindrosporum* lors de la sélection des isolats (Cossentine *et al.*, 2010, Daniel *et al.*, 2009, De La Rosa *et al.*, 2002,

Ekesi *et al.*, 2002, Lecuona *et al.*, 2005). Par contre, des recherches démontrent la forte pathogénicité de ce mycète envers des larves de *M. domestica* (Barson *et al.*, 1994) et de *Lucilia spp.* (Wright *et al.*, 2009). Sur la base des résultats de la présente étude, le mycète *T. cylindrosporum* devrait donc être inclus plus fréquemment dans les études portant sur la susceptibilité des larves de diptères, notamment les asticots du genre *Delia*, aux mycètes entomopathogènes.

Finalement, plusieurs isolats se sont avérés en mesure d'occasionner un développement de muscardine qui ne diffère pas de façon significative de l'isolat INRS 709. Par contre, ce type de données doit être interprété avec précautions. En effet, les mycètes Hypocréales peuvent occasionner la mort des insectes sans toutefois produire de nouvelles conidies de par la compétition avec les organismes saprophytiques présents au sein de l'hôte (Goettel *et al.*, 1997). Une sporulation élevée et un potentiel épizootique sont toutefois des critères de sélection qui peuvent s'avérer importants lors de la sélection d'isolats en vue du développement d'un outil de lutte biologique (Charnley *et al.*, 2007). En effet, chaque puppe arborant la muscardine dans le sol constitue un foyer d'infection potentiel pouvant servir à contaminer d'autres individus (Ekesi *et al.*, 2002). En ce sens, plusieurs isolats semblent présenter cette qualité.

## **Criblage des isolats chez les adultes**

Les résultats obtenus par le biais de la présente étude démontrent pour la première fois la vulnérabilité des adultes de la mouche du chou à l'isolat INRS 709. La susceptibilité des adultes de *Delia antiqua* face au mycète *M. anisopliae* avait été documentée auparavant (Davidson *et al.*, 2005, Rizzo, 1977). La vulnérabilité des imagos de *D. radicum* a également fait l'objet d'une publication dans laquelle trois des quatre isolats de *M. anisopliae* testés avaient occasionné de la mortalité oscillant entre 14 et 54 % après sept jours d'incubation (Meadow *et al.*, 2000). Dans l'étude qui nous concerne, l'isolat INRS 709 a été en mesure de tuer  $43,1 \pm 31,1$  % des individus. On peut donc conclure que sa pathogénicité envers les imagos de *D. radicum* semble similaire à celle des isolats testés par Meadow et ses acolytes. Toutefois, la méthodologie utilisée est différente puisque les mouches sacrifiées dans leurs expériences ont été exposées à des conidies sèches récoltées directement sur les milieux de culture. Ceci pourrait peut-être expliquer l'absence de mortalité dans les groupements témoins de leur étude. Dans la présente recherche, les mouches étaient aspergées avec une suspension de conidies vaporisées. Leurs ailes se retrouvaient donc collées ensemble, ce qui limitait grandement leurs mouvements. Les mouches qui étaient toujours immobiles cinq minutes suivant la pulvérisation étaient retirées des

expériences. Malgré cette précaution, le taux de mortalité dans les groupements témoins a été relativement élevé, soit de  $21,8 \pm 9,7$  %. L'âge des spécimens n'est probablement pas en cause car il a été démontré auparavant que cette variable n'influence pas la pathogénicité de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* envers *D. antiqua* (Rizzo, 1977). Il est donc raisonnable de croire qu'il en soit de même chez *D. radicum*.

Une mortalité élevée dans les groupements témoins a toutefois été rencontrée par d'autres chercheurs travaillant sur les spécimens adultes du genre *Delia*. En effet, Davidson et Chandler (2005) ont observé dans leurs expériences un taux de mortalité de l'ordre de  $25,8 \pm 2,7$  % chez les adultes de *D. antiqua* traités par immersion dans des suspensions de conidies. D'autres chercheurs ont cependant obtenu une mortalité dans les groupements témoins très respectable. Par exemple, chez les spécimens adultes de *H. irritans* traités par vaporisation avec un volume de 300 $\mu$ l de suspension de conidies, seulement 12,2 % des individus dans les groupes témoins sont décédés (Mochi *et al.*, 2010b). Par ailleurs, les écarts type importants des données obtenues dans la présente étude trahissent peut-être le fait que la méthode développée n'était pas tout à fait au point et que des ajustements auraient été nécessaires. Une attention particulière a toutefois été apportée afin de valider la constance des volumes de pulvérisation et de la viabilité des conidies suite à la vaporisation (données non montrées). Néanmoins, il aurait peut-être été sage d'opter pour une méthodologie différente. Les applications locales sur la surface ventrale de l'abdomen des diptères à l'aide d'une micropipette semblent limiter la mortalité dans les groupements témoins (Barson *et al.*, 1994, Castillo *et al.*, 2000, Quesada-Moraga *et al.*, 2006a). En tenant compte de la mortalité dans les témoins négatifs, il n'en demeure pas moins que l'isolat INRS 709 a été en mesure d'occasionner une mortalité appréciable de  $43,1 \pm 31,1$  %. Des travaux supplémentaires pourraient cependant être mis en branle afin de mieux documenter sa pathogénicité.

Certes, il aurait été grandement intéressant d'effectuer le criblage avec tous les isolats de mycètes Hypocréales mis en production. Les contraintes inhérentes à l'approvisionnement en spécimens adultes compliquaient cependant la réalisation de ce volet du projet. Hors, il aurait peut-être été possible d'obtenir des mouches en grande quantité si on avait induit les pupes en diapause selon les recommandations de Whistlecraft et ses acolytes (1985). Alternativement, les pupes auraient pu être entreposées à 3 °C au moment du début de l'émergence des adultes pour une période maximale d'un mois. Suite à cet entreposage et au retour à la température ambiante, 60 % des mouches auraient émergé des pupes en moins d'une semaine. Il aurait cependant été important de maintenir la période d'entreposage la plus courte possible puisque

la longévité des adultes est affectée après une longue période d'entreposage sous ces conditions (Van Keymeulen *et al.*, 1981). Ces deux méthodes auraient donc pu permettre l'entreposage d'un grand nombre de pupes et d'obtenir des cohortes de mouches satisfaisantes après avoir synchronisé l'émergence. Elles n'ont malencontreusement pas été envisagées lors de l'élaboration des protocoles.

Il a été démontré que la susceptibilité des adultes de *D. antiqua* aux mycètes Hypocréales est supérieure à la vulnérabilité des individus du stade larvaire (Davidson *et al.*, 2005). Hélas, il n'a pas été possible de faire cette démonstration chez la mouche du chou. Également, alors que la susceptibilité des diptères adultes du genre *Delia* aux mycètes *B. bassiana* et *M. anisopliae* est relativement bien documentée (Davidson *et al.*, 2005, Meadow *et al.*, 2000, Rizzo, 1977), la pathogénicité de *T. cylindrosporium* envers les imagos n'a pas été démontrée. En fait, hormis chez quelques espèces appartenant au sous-ordre des nématocères (Soares Jr., 1982) et chez *M. domestica* (Barson *et al.*, 1994, Lam *et al.*, 1988), la vulnérabilité des diptères adultes à ce mycète semble peu documentée en général. Toutefois, une très légère mortalité à retardement de l'ordre de 6,8 % a été observée chez les imagos de *D. antiqua* suite à l'application de conidies de *T. cylindrosporium* sur de jeunes pupes fraîchement formées (Poprawski *et al.*, 1985). Il aurait donc été vivement intéressant de documenter la susceptibilité du stade adulte de la mouche du chou à des isolats de *T. cylindrosporium*. Malgré tout, les résultats obtenus dans cette étude concernant la pathogénicité de l'isolat INRS 709 envers les imagos de *D. radicum* pourraient paver la voie au développement d'une nouvelle stratégie de contrôle des populations.

## Perspective de lutte biologique

Le mycète *T. cylindrosporium* n'a pas bénéficié d'une grande attention de la part de la communauté scientifique comparativement aux autres agents entomopathogènes traditionnellement utilisés en lutte biologique (Herrero *et al.*, 2011). Son manque d'efficacité et d'activité résiduelle ont d'ailleurs fait décliner l'intérêt qu'on lui accordait en tant qu'agent de lutte biologique pour le contrôle des populations larvaires de moustiques (Scholte *et al.*, 2004). D'ailleurs, aucun bioinsecticide n'a été élaboré à l'aide de *T. cylindrosporium* (Faria *et al.*, 2007). Concernant les diptères importants en agriculture, les études évaluant le potentiel des mycètes entomopathogènes pour le contrôle des stades larvaires font généralement abstraction de l'espèce *T. cylindrosporium* et portent plutôt leurs efforts sur *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (Campbell *et al.*, 2006, Chandler *et al.*, 2005, Ekesi *et al.*, 2011, Ekesi *et al.*, 2005, Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000). Seule une expérience en champs portant sur *D. radicum* et *D. floralis*

comptait des isolats de *T. cylindrosporum* dans la liste des traitements (Vänninen *et al.*, 1999a). Par contre, sur la base de la pathogénicité observée chez les larves matures de la mouche du chou dans le cadre de la présente étude, *T. cylindrosporum* s'avère aussi intéressant que *M. anisopliae* en tant que candidat comme agent de lutte biologique.

La spécificité des interactions entre le micro-organisme pathogène et l'insecte ciblé semble être un facteur important à considérer lorsque l'on tente de contrôler les insectes terricoles à l'aide d'agents microbiens (Jackson, 1999). En ce sens, *T. cylindrosporum* apparaît spécifique aux diptères (Barson *et al.*, 1994, Nadeau *et al.*, 1994, Scholte *et al.*, 2004, Soares Jr., 1982, Soares Jr. *et al.*, 1985, Wright *et al.*, 2009), quoique d'autres insectes et des acariens lui sont également susceptibles en conditions de laboratoire (Gardner *et al.*, 1987, Herrero *et al.*, 2011, Lam *et al.*, 1988, Steenberg *et al.*, 2000, Zabalgogezcoa *et al.*, 2008). Cette spécificité est peut-être simplement le fruit d'un manque de connaissances de la part de la communauté scientifique concernant ce mycète. Cependant, son spectre d'hôtes, sur la base des connaissances actuelles, semble plus étroit que celui de *M. anisopliae* (Zimmermann, 2007b). Le mycète *T. cylindrosporum* serait donc possiblement plus efficace pour lutter contre les larves de diptères présentes dans les sols, notamment les asticots du genre *Delia*. Également, la capacité de s'établir et de persister dans les sols suite à l'application est une autre qualité que l'on retrouve chez les agents de lutte microbienne efficaces envers les insectes terricoles (Jackson, 1999). À ce sujet, des études ont démontré que des isolats de *M. anisopliae* sont en mesure de persister relativement longtemps dans les sols agricoles (Hu *et al.*, 2002, Pilz *et al.*, 2011, Vänninen *et al.*, 2000). Par contre, peu d'études se sont concentrées sur l'écologie de l'espèce *T. cylindrosporum*. Ce mycète est toutefois fréquemment détecté dans les sols nordiques (Klingen *et al.*, 2002a). Selon les propos de Bisset (1983) rapportés par Herrero et ses collaborateurs (2011), ses conidies seraient aussi en mesure de persister longtemps dans les sols. Une étape importante en regard du choix d'un isolat consiste en l'évaluation de sa compétence environnementale, c'est-à-dire sa capacité à supporter une variété de facteurs abiotiques (température, humidité, propriétés physicochimiques du sol) et biotiques (actions fongistatiques de la microflore du sol) inhérentes à l'environnement où il sera appliqué (Inglis *et al.*, 2001). À ce sujet, il a été démontré que des isolats de *T. cylindrosporum* et de *M. anisopliae* sont très tolérants aux températures froides et donc adaptés au climat tempéré (Bidochka *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2011). Quoique plusieurs informations soient manquantes pour évaluer la compétence environnementale des isolats étudiés, on peut supposer que *T. cylindrosporum* serait un candidat tout aussi valable, sinon plus, que *M. anisopliae* dans le but de développer un outil de lutte biologique visant à réprimer les larves de *D. radicum*.

De par les résultats prometteurs obtenus en laboratoire, l'isolat INRS 709 de *M. anisopliae* a déjà été recommandé afin de lutter contre les asticots de la mouche du chou en champs (Bruck *et al.*, 2005). Par contre, le fait que cet isolat soit d'origine étrangère complique le processus de demande d'autorisation de recherche auprès de l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire du Canada. En ce qui concerne la présente étude, trois isolats de *M. anisopliae* (INRS 701, INRS 704, INRS 705) et un isolat de *T. cylindrosporum* (INRS 1003) sont d'origine canadienne et se sont avérés tout aussi pathogène envers les larves matures que l'isolat INRS 709. Ces isolats pourraient donc être sélectionnés pour les fins d'éventuels essais en champs. D'ailleurs, la sélection d'isolats indigènes est un thème récurrent dans la littérature scientifique portant sur les mycètes entomopathogènes (Goettel *et al.*, 2010).

L'objectif à atteindre lors de la lutte microbienne à l'aide de mycètes contre les insectes terricoles est de créer un environnement contaminé permettant d'infecter les insectes par contact physique lors de leurs mouvements dans le sol et dans la zone racinaire (Jaronski, 2010). Les applications de conidies visant les larves de *D. radicum* devraient donc se faire en coordination avec l'éclosion des œufs, de façon à convoiter les stades de l'insecte qui sont en contact avec le sol (larves de premier et troisième stade ainsi que les pupes) de même que les larves de second stade avant qu'elles ne pénètrent dans les tissus racinaires (Bruck *et al.*, 2005). En ce sens, puisque la pathogénicité des isolats peut varier selon les stades de l'insecte étudié (Boucias *et al.*, 1998), la vulnérabilité des larves de premier et second stade aux isolats sélectionnés dans cette étude pourrait également être documentée. La lutte contre les larves matures et les pupes pourraient également être envisagée (Vänninen *et al.*, 1999a) mais cette stratégie ne préviendrait pas la présence de dommages sur les cultures et devrait plutôt être envisagée avec un objectif de contrôle à long terme. Également, considérant la profondeur à laquelle les larves de troisième stade migrent dans le sol pour amorcer leur métamorphose (Hughes *et al.*, 1959, Smith, 1927), la concentration requise d'inoculum serait probablement très élevée, rendant la méthode économiquement non rentable (Vänninen *et al.*, 1999b).

L'application de suspensions de conidies à la base des plants sur le substrat de culture démontre un bon contrôle sur les larves de *D. radicum* lors d'essais en serres (Chandler *et al.*, 2005). Les applications en champs ont par contre donné des résultats décevants (Chandler *et al.*, 2005, Vänninen *et al.*, 1999a). Il a été observé que les applications par bassinage à la base des plants à l'aide d'un fort volume d'eau occasionnent un mouvement latéral des conidies, diminuant ainsi la charge d'inoculum pouvant atteindre les larves (Chandler *et al.*, 2005). Des études ont d'ailleurs démontré que la pénétration des conidies dans le sol est relativement faible

et tributaire, entre autre, du type de sol (Garrido-Jurado *et al.*, 2011, Storey *et al.*, 1987). Cette approche peut néanmoins demeurer intéressante si les conidies sont appliquées afin d'infecter les jeunes larves issues des œufs présents à la surface du sol (Jaronski, 2010). Toutefois, l'utilisation de mycètes entomopathogènes pour le contrôle des larves de *D. radicum* en champs exige donc que des efforts de recherches soient consacré au développement d'une méthode d'application efficace (Chandler *et al.*, 2005). En ce sens, des applications de conidies au sol sous forme de granules pourraient procurer un meilleur contrôle, tel qu'il a été démontré chez les larves de *Tetanops myopaeformis* (Campbell *et al.*, 2006). Les applications sous forme de granules nutritives permettent par ailleurs aux mycètes de germer, croître et sporuler à nouveau, augmentant ainsi l'inoculum disponible pour infecter les insectes visés (Jaronski, 2010). Par ailleurs, l'utilisation de microsclérotés produites par *M. anisopliae* pourrait éventuellement devenir une solution très avantageuse pour le contrôle des insectes terricoles (Jackson *et al.*, 2009, Jaronski *et al.*, 2008). Toutefois, la production de microsclérotés ne semble pas avoir été documentée chez *T. cylindrosporum*.

Pour les plantes crucifères semées tels que le rutabaga ou le canola, il serait intéressant de vérifier le niveau de contrôle conféré par des conidies appliquées sous forme de granules dans le sillon au moment du semis. Pour les légumes crucifères transplantés tels que le chou-fleur, la même technique pourrait être envisagée. Cependant, puisque *M. anisopliae* est en mesure de coloniser la rhizosphère des plants cultivés dans des substrats à base de mousse de sphaigne (Bruck, 2005), il serait également intéressant d'incorporer les conidies directement dans le substrat de culture des transplants. Certes, les deux méthodes suggérées ne sont pas curatives mais prophylactiques. Cependant, les mycètes entomopathogènes ont plus de chance de succès lorsqu'ils sont utilisés de façon préventive avant que les populations d'insectes deviennent trop élevé et atteignent les seuils d'intervention habituellement utilisé avec les insecticides de synthèse (Jaronski, 2010). Des applications de suspensions de conidies dirigées vers le sol pourraient toutefois être effectuées en complément, selon l'activité des mouches adultes, afin de réprimer les jeunes larves. Des applications de conidies au sol visant les larves pourraient également être accompagnées de pulvérisations foliaires ciblant les adultes (Chandler *et al.*, 2005). À ce sujet, la pathogénicité de l'isolat INRS 709 envers les imagos, nonobstant son origine géographique, pourrait permettre ce type de stratégie. Il a été démontré que les mouches visitent les champs en milieu de journée et sont présentes en bordure des champs le matin et en fin d'après-midi pour l'alimentation et la reproduction (Hawkes, 1972). Il serait donc envisageable de profiter de ce comportement d'agrégation et d'effectuer des applications foliaires en bordure de champs aux moments opportuns. Cependant, la spécificité

de l'isolat en question devrait préalablement être vérifiée afin de ne pas causer de préjudices aux insectes non-ciblés. Finalement, il serait peut-être possible d'utiliser l'isolat INRS 709 dans les pièges attractifs en voie de développement par Meadow et ses collaborateurs (2000) afin de contaminer les mouches et de disséminer l'inoculum au sein des populations. À ce sujet, les effets sous-létal engendrés par des isolats de *M. anisopliae* chez certains diptères adultes (Quesada-Moraga *et al.*, 2006a) pourraient peut-être jouer un rôle important dans la régulation des populations de *D. radicum*.

L'utilisation des mycètes entomopathogènes pour le contrôle des larves de *D. radicum* ne procurerait probablement pas un contrôle absolu (Bruck *et al.*, 2005), comme en témoigne l'étude de Campbell et ses collaborateurs (2006) portant sur la mouche de la betterave. Afin de maximiser les résultats, l'utilisation des mycètes entomopathogènes devrait se faire de concert avec d'autres méthodes de lutte dans un programme de lutte intégrée (Jaronski, 2010). Par exemple, des applications de conidies au sol visant les larves pourraient être combinées avec des appâts insecticides ciblant les mouches adultes. Cette stratégie a d'ailleurs porté fruit pour le contrôle de *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) dans les vergers de manguiers (Ekesi *et al.*, 2011). Les applications de conidies au sol pourraient également être combinées avec des doses réduites d'insecticides de synthèse. À titre d'exemples, des effets synergiques ont été observés lors de l'utilisation de *M. anisopliae* avec une dose sous-létal d'imidaclopride pour le contrôle des adultes d'*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Paula *et al.*, 2011).

Pour conclure, sur la base des résultats de la présente étude, le mycète *T. cylindrosporum* semble posséder un potentiel comme agent de lutte biologique contre *D. radicum* tout aussi intéressant, sinon plus, que *M. anisopliae*. Des travaux devraient cependant être poursuivis afin de mieux caractériser son potentiel et son intégration dans un programme de lutte intégrée.

## CHAPITRE 10 : CONCLUSION

Le but de la présente étude était de fournir des connaissances additionnelles relativement à la pathogénicité des mycètes de l'ordre des Hypocréales envers *D. radicum*. La recherche d'isolats possédant des attributs intéressants était également un but visé. La présence de variations inter et intra spécifiques liées à la pathogénicité des mycètes a été vérifiée.

Considérant le cadre de l'étude, la régie d'élevage implantée fut adéquate et la mise en production des isolats de mycètes s'est bien déroulée. Le criblage de ces isolats envers les larves matures de la mouche du chou a démontré la pathogénicité supérieure des espèces *M. anisopliae* et *T. cylindrosporium* comparativement à *B. bassiana*. En ce sens, des variations interspécifiques se sont manifestées. Ces résultats portent à croire que l'espèce *T. cylindrosporium* serait un aussi bon candidat en vue du développement d'un outil de lutte biologique que *M. anisopliae*. Entre autres, de par sa facilité de production, la viabilité de ses conidies, sa provenance géographique et sa pathogénicité, l'isolat INRS 1003 pourrait être un tel aspirant. Par contre, l'hypothèse de travail est rejetée en partie puisque qu'avec les isolats sélectionnés, aucune différence intra spécifique ne s'est manifestée quant à la pathogénicité des isolats chez les larves. Également, tous les objectifs n'ont pas été atteints car il a été impossible, en tenant compte des limites de ce projet, d'effectuer le criblage de tous les isolats mis en production envers les adultes de *D. radicum*. Les résultats obtenus démontrent cependant pour la première fois leur susceptibilité à l'isolat INRS 709 (F52) de *M. anisopliae*.

La présente étude aura donc permis d'apporter des informations complémentaires à celles présentes dans la littérature scientifique en regard de la susceptibilité de *D. radicum* aux mycètes Hypocréales. Plus spécifiquement, les résultats permettent de mettre en lumière le potentiel de *T. cylindrosporium* comme agent de lutte biologique contre les larves de la mouche du chou. Il serait donc pertinent d'effectuer des travaux supplémentaires afin de mieux documenter la pathogénicité de ce mycète envers les autres stades physiologiques de *D. radicum* et les espèces apparentées. Une meilleure compréhension de la biologie de ce mycète pourrait également servir à faciliter son intégration dans un programme de lutte intégrée visant à contrôler la mouche du chou. Finalement, sur la base des résultats de la présente étude, il est recommandé que *T. cylindrosporium* soit considéré comme un agent de lutte biologique potentiel envers les asticots de diptères au même titre que *M. anisopliae*.

## RÉFÉRENCES

- Aarnio TH & Agathos SN (1989) Production of extracellular enzymes and cyclosporin by *Tolypocladium inflatum* and morphologically related fungi. *Biotechnology Letters* 11(11):759-764.
- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- ACIA (2011) *Manuel d'inspection des légumes frais : Rutabagas*. Agence canadienne d'inspection des aliments, Ottawa), <http://www.inspection.gc.ca/aliments/fruits-et-legumes-frais/inspection-de-la-qualite/manuels-d-inspection-des-legumes-frais/rutabagas/fra/1303759877623/1303760029349> (Consulté le 2012-11-08)
- Altre JA & Vandenberg JD (2001) Factors influencing the infectivity of isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78(1):31-36.
- Altre JA, Vandenberg JD & Cantone FA (1999) Pathogenicity of isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(3):332-338.
- Alves SB, Alves LFA, Lopes RB, Pereira RM & Vieira SA (2002) Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt: Culicidae). *Journal of Applied Entomology* 126(9):504-509.
- Andersen SO (2010) Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(3):166-178.
- Andreassen LD, Kuhlmann U, Mason PG & Holliday NJ (2009) Host range testing of a prospective classical biological control agent against cabbage maggot, *Della radicum*, in Canada. *Biological Control* 48(2):210-220.
- Angel-Sahagún CA, Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Galindo-Velasco E, López-Edwards M, Rebolledo-Domínguez O, Cruz-Vázquez C, Reyes-Velázquez WP, Skoda SR & Foster JE (2005) Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science* 5.
- Anonyme (2003) Projet d'acceptabilité d'homologation continue - PACR2002-03 - Phase 2 de la réévaluation du chlorpyrifos. (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada, Ottawa), p 63.
- Anonyme (2005a) Crop profile for canola in Canada. (Pesticide Risk Reduction Program, Pest Management Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa), p 43.
- Anonyme (2005b) Crop profile for rutabaga in Canada. (Pesticide Risk Reduction Program, Pest Management Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa), p 43.
- Anonyme (2009) *Bio-Insecticide granulaire Met52*. (Canada) Attribué.
- Anonyme (2011) Production de fruits et de légumes. (Statistique Canada-Division de l'agriculture), p 43.
- Ansari MA & Butt TM (2011) Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 110(6):1460-1469.
- Bailey KL, Boyetchko SM & Längle T (2010) Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control* 52(3):221-229.
- Barson G, Renn N & Bywater AF (1994) Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *Journal of Invertebrate Pathology* 64(2):107-113.
- Baur R, Städler E, Monde K & Takasugi M (1998) Phytoalexins from Brassica (Cruciferae) as

- oviposition stimulants for the cabbage root fly, *Delia radicum*. *Chemoecology* 8(4):163-168.
- Bhanu Prakash GVS, Padmaja V & Siva Kiran RR (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 99(6):1530-1537.
- Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender TM, Dekoning J & De Croos JNA (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology* 67(3):1335-1342.
- Bidochka MJ & Small CL (2005) Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. . *Insect-Fungal Associations: Ecology and evolution*, Vega FE & Blackwell M (Édit.) Oxford University Press, New-York. p 28-50.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Joshi L & Roberts DW (1995) The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research* 99(4):403-406.
- Birch ANE, Griffiths DW, Hopkins RJ, Smith WHM & McKinlay RG (1992) Glucosinolate responses of swede, kale, forage and oilseed rape to root damage by turnip root fly (*Delia floralis*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* 60(1):1-9.
- Biron DG, Coderre D, Boivin G, Brunel E & Nénon JP (2002) Genetic variability and expression of phenological and morphological differences in populations of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *Canadian Entomologist* 134(3):311-327.
- Biron DG, Coderre D, Fournet S, Nénon JP, Le Lannic J & Boivin G (2005) Larval respiratory systems of two anthomyiid flies, *Delia radicum* and *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Canadian Entomologist* 137(2):163-168.
- Biron DG, Landry BS, Nénon JP, Coderre D & Boivin G (2000) Geographical origin of an introduced pest species, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae), determined by RAPD analysis and egg micromorphology. *Bulletin of Entomological Research* 90(1):23-32.
- Biron DG, Langlet X, Boivin G & Brunel E (1998) Expression of early and late-emerging phenotypes in both diapausing and non-diapausing *Delia radicum* L. pupae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 87(2):119-124.
- Bissett J (1983) Notes on *Tolypocladium* and related genera. *Canadian Journal of Botany* 61(5):1311-1329.
- Blackwell M (2010) Fungal evolution and taxonomy. *BioControl* 55(1):7-16.
- Blanford S & Thomas MB (2001) Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78(1):1-8.
- Bligaard J (2001) Binomial sampling as a cost efficient sampling method for pest management of cabbage root fly (Dipt., Anthomyiidae) in cauliflower. *Journal of Applied Entomology* 125(3):155-159.
- Bligaard J, Meadow R, Nielsen O & Percy-Smith A (1999) Evaluation of felt traps to estimate egg numbers of cabbage root fly, *Delia radicum*, and turnip root fly, *Delia floralis* in commercial crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 90(2):141-148.
- Boivin G & Richard C (1994) *Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada*. Société d'entomologie du Canada et Société canadienne de phytopathologie. 590 p
- Bomford MK, Vernon RS & Pats P (2000) Importance of collection overhangs on the efficacy of exclusion fences for managing cabbage flies (Diptera: Anthomyiidae). *Environmental Entomology* 29(4):795-799.
- Bouchard CJ, Nénon R & Guay L (1998) *Guide d'identification des mauvaises herbes du Québec*. Conseil des productions végétales du Québec, Québec. 253 p.
- Boucias DG & Pendland JC (1998) *Principles of insect pathology*. Kluwer Academic Publishers, Norwell. 568 p
- Boucias DG, Pendland JC & Latge JP (1988) Nonspecific factors involved in attachment of

- entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticule. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1795-1805.
- Boucias DG, Pendland JC & Latge JP (1991) Attachment of mycopathogens to cuticule : the initial event of mycosis in arthropod host. *The Fungal spore and disease initiation in plants and animals*, Cole GT & Hoch HC (Édit.) Plenum Press, New-York. p 101-128.
- Bracken GK (1988) Seasonal occurrence and infestation potential of cabbage maggot, *Delia radicum* (L) (Diptera: Anthomyiidae), attacking rutabaga in Manitoba as determined by captures of females in water traps. *Canadian Entomologist* 120(7):609-614.
- Bracken GK (1990) Susceptibility of first-instar cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), to strains of the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* Filipjev, *S. bibionis* (Bovien), *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, and *H. heliothidis* (Khan, Brooks, and Hirschmann). *The Canadian Entomologist* 122(4):633-639.
- Broatch JS, Dosedall LM, Clayton GW, Harker KN & Yang R-C (2006) Using degree-day and logistic models to predict emergence patterns and seasonal flights of the cabbage maggot and seed corn maggot (Diptera: Anthomyiidae) in canola. *Environmental Entomology* 35(5):1166-1177.
- Broatch JS & Vernon RS (1997) Comparison of water pan traps and sticky traps for monitoring *Delia* spp. (Diptera: Anthomyiidae) in canola *The Canadian Entomologist* 129(5):979-984.
- Brooks AR (1951) Identification of the root maggots (Diptera: Anthomyiidae) attacking cruciferous garden crops in Canada, with notes on biology and control. *The Canadian Entomologist* 83(5):109-120.
- Brownbridge M, Costa S & Jaronski ST (2001) Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77(4):280-283.
- Bruck DJ (2005) Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: Implications for pest management. *Biological Control* 32(1):155-163.
- Bruck DJ, Snelling JE, Dreves AJ & Jaronski ST (2005) Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 89(2):179-183.
- Butt TM & Goettel MS (2000) Bioassays of entomogenous fungi. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*, Navon A & Ascher KRS (Édit.) CABI Publishing, Wallingford. p 141-196.
- Butt TM, Ibrahim L, Ball BV & Clark SJ (1994) Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontrol Science and Technology* 4(2):207-214.
- Butt TM, Ibrahim L, Clark SJ & Beckett A (1995) The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research* 99(8):945-950.
- Butt TM, Wang C, Shah FA & Hall R (2006) Degeneration of entomogenous fungi. *An Ecological and Societal Approach to Biological Control* (Progress in Biological Control, Eilenberg J & Hokkanen HMT (Édit.) Springer Netherlands, Vol 2. p 213-226.
- Campbell LG, Boetel MA, Jonason NB, Jaronski ST & Smith LJ (2006) Grower-adoptable formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) management. *Environmental Entomology* 35(4):986-991.
- Casséus L (2009) Le canola : un cas de réussite au Canada. (Statistique Canada).
- Castillo M-A, Moya P, Hernández E & Primo-Yúfera E (2000) Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biological Control* 19(3):274-282.
- Chandler D & Davidson G (2005) Evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium*

- anisopliae* against soil-dwelling stages of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) in glasshouse and field experiments and effect of fungicides on fungal activity. *Journal of Economic Entomology* 98(6):1856-1862.
- Chandler D, Hay D & Reid AP (1997) Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology* 5(2):133-141.
- Charnley AK (1989) Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Biotechnology of fungi for improving plant growth*, Whipps JM & Lumsden RD (Édit.) Cambridge University Press. p 85-123.
- Charnley AK & Collins SA (2007) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *Environmental and Microbial Relationships - The Mycota IV*, (Environmental and Microbial Relationship: IV), Kubicek CP & Druzhinina IS (Édit.) Springer, Berlin, 2 Ed. p 159-187.
- Chen S, Han X & Moens M (2003a) Biological control of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) with entomopathogenic nematodes. *Applied Entomology and Zoology* 38(4):441-448.
- Chen S, Li J, Han X & Moens M (2003b) Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *BioControl* 48(6):713-724.
- Clark TB, Kellen WR, Fukuda T & Lindegren JE (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 11(1):1-7.
- Clarkson JM & Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4(5):197-203.
- Coaker TH & Finch S (1971) The cabbage root fly, *Erioischia brassicae* (Bouché). *Report of the National Vegetable Research Station, S.N.* (Édit.) National Cegetable Resarch Station, Wellesbourne, UK Vol 1970. p 23-42.
- Collier RH & Finch S (1983) Effects of intensity and duration of low temperatures in regulating diapause development of the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 34(2):193-200.
- Collier RH & Finch S (1985) Accumulated temperatures for predicting the time of emergence in the spring of the cabbage root fly, *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae). *Bulletin of Entomological Research* 75(03):395-404.
- Collier RH, Finch S & Anderson M (1989) Laboratory studies on late-emergence in the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 50(3):233-240.
- Corlay F & Boivin G (2008) Seasonal development of an invasive exotic species, *Contarinia nasturtii* (Diptera: Cecidomyiidae), in Quebec. *Environmental Entomology* 37(4):907-913.
- Cossentine J, Jaronski S, Thistlewood H & Yee W (2011) Impact of *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on pre-imaginal *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) within and on the surface of orchard soil. *Biocontrol Science and Technology* 21(12):1501-1505.
- Cossentine J, Thistlewood H, Goettel M & Jaronski S (2010) Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). *Journal of Invertebrate Pathology* 104(2):105-109.
- Culliney TW, Pimentel D & Pimentel MH (1993) Pesticides and natural toxicants in foods. *The pesticide question : environment, economics and ethics*, Pimentel D & Lehman H (Édit.) Springer US, New-York. p 126-150.
- Dambre-Raes H, Dambre P & Hertveldt L (1976) Nonaxenic rearing of the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Bouché) on an artificial diet. *Meded. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent.* 41:1575-1585.
- Daniel C & Wyss E (2009) Susceptibility of different life stages of the european cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*, to entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Entomology*

- 133(6):473-483.
- Danilevsky AS (1961) Photoperiodism and seasonal development in insects. *Leningrad Univ. Press*.
- Dapsis LJ & Ferro DN (1983) Effectiveness of baited cone traps and colored sticky traps for monitoring adult cabbage maggots: with notes on female ovarian development *Entomologia Experimentalis et Applicata* 33(1):35-42.
- Davidson G & Chandler D (2005) Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi against larvae and adults of onion maggot (Diptera: Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology* 98:1848-1855.
- De La Rosa W, Lopez FL & Liedo P (2002) *Beauveria bassiana* as a pathogen of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology* 95:36-43.
- Dhar P & Kaur G (2011) Response surface methodology for optimizing process parameters for the mass production of *Beauveria bassiana* conidiospores. *African Journal of Microbiology Research* 5(17):2399-2406.
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Ekesi S & Mueke JK (2003a) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia* 156(4):375-382.
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA & Mueke JM (2003b) Host species, age and sex as factors affecting the susceptibility of the African Tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Anzeiger fur Schadlingskunde* 76(5):113-117.
- Dixon PL, Coady JR, Larson DJ & Spaner D (2004) Undersowing rutabaga with white clover: impact on *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) and its natural enemies. *The Canadian Entomologist* 136(3):427-442.
- Dixon PL, West RJ, McRae KB & Spaner D (2002) Suitability of felt traps to monitor oviposition by cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae). *The Canadian Entomologist* 134(2):205-214.
- Doane JF & Chapman RK (1964a) The relation of the cabbage maggot, *Hylemyia brassicae* (Bouché), to decay in some cruciferous crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 7(1):1-8.
- Doane JF & Chapman RK (1964b) Development of the cabbage maggot *Hylemyia brassicae* (Bouché) on aseptic and decaying rutabaga tissue. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 7(2):115-119.
- Dosdall LM, Good A, Keddie BA, Ekuere U & Stringam G (2000) Identification and evaluation of root maggot (*Delia* spp.) (Diptera: Anthomyiidae) resistance within Brassicaceae. *Crop Protection* 19(4):247-253.
- Dosdall LM, Herbut MJ & Cowle NT (1994) Susceptibilities of species and cultivars of canola and mustard to infestation by root maggots (*Delia* spp.) (Diptera: Anthomyiidae). *Canadian Entomologist* 126(2):251-260.
- Dreves AJ, Dalthorp D, Stone AG & Fisher G (2006) Spring emergence and seasonal flight of *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae) in western Oregon. *Environmental Entomology* 35(2):465-477.
- Eckenrode CJ & Chapman RK (1972) Seasonal adult cabbage maggot populations in the field in relation to thermal-unit accumulations. *Annals of the Entomological Society of America* 65(1):151-156.
- Edwards CA (1993) The Impact of Pesticides on the Environment. *The pesticide question : environment, economics and ethics*, Pimentel D & Lehman H (Édit.) Springer US, New-York. p 13-46.
- Eilenberg J, Hajek A & Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological

- control. *BioControl* 46(4):387-400.
- Eilenberg J & Meadow R (2003) Fungi for biological control of brassica root flies *Delia radicum* and *Delia floralis*. *Advances in microbial control of insect pests*, Upadhyay RK (Édit.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York. p 181-191.
- Eilenberg J & Michelsen V (1999) Natural host range and prevalence of the genus *Strongwellsea* (Zygomycota: Entomophthorales) in Denmark. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(2):189-198.
- Eilenberg J, Wilding N & Bresciani J (1992) Isolation in vitro of *Strongwellsea castrans* [Fungi: Entomophthorales] a pathogen of adult cabbage root flies, *Delia radicum* [Dipt.: Anthomyiidae]. *Entomophaga* 37(1):65-77.
- Ekborn B (1993) *Tolyocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycetes: Moniliaceae) as a biological control agent against the window midge *Sylvicola cinctus* Fabr. (Diptera: Anisopodidae). *Biocontrol Science and Technology* 3(3):309-313.
- Ekesi S, Maniania NK & Lux SA (2002) Mortality in three african tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 12(1):7-17.
- Ekesi S, Maniania NK & Mohamed SA (2011) Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of GF-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards. *Biocontrol Science and Technology* 21(3):299-316.
- Ekesi S, Maniania NK, Mohamed SA & Lux SA (2005) Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biological Control* 35(1):83-91.
- Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y & Pei Y (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1):363-370.
- Fargues JF, Delmas JC, Augé J & Lebrun RA (1991) Fecundity and egg fertility in the adult colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) surviving larval infection by the fungus *Beauveria bassiana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 61(1):45-51.
- Fargues JF & Robert PH (1983) Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 29(5):576-583.
- Faria MRd & Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43(3):237-256.
- Ferry A, Dugravot S, Delattre T, Christides JP, Auger J, Bagnères AG, Poinot D & Cortesero AM (2007) Identification of a widespread monomolecular odor differentially attractive to several *Delia radicum* ground-dwelling predators in the field. *Journal of Chemical Ecology* 33(11):2064-2077.
- Ferry A, Le Tron S, Dugravot S & Cortesero AM (2009) Field evaluation of the combined deterrent and attractive effects of dimethyl disulfide on *Delia radicum* and its natural enemies. *Biological Control* 49(3):219-226.
- Finch S (1971a) Comparison of the nutritive values of proteins and related compounds to adult cabbage root fly, *Erioschia brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 14(1):115-124.
- Finch S (1971b) The fecundity of the cabbage root fly *Erioschia brassicae* under field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 14(2):147-160.
- Finch S (1989) Ecological considerations in the management of *Delia* pest species in vegetable crops. *Annual review of entomology* 34:117-137.
- Finch S (1990) The effectiveness of traps used currently for monitoring populations of the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Annals of Applied Biology* 116(3):447-454.

- Finch S & Ackley CM (1977) Cultivated and wild host plants supporting populations of the cabbage root fly. *Annals of Applied Biology* 85(1):13-22.
- Finch S & Coaker TH (1969a) Comparison of the nutritive values of carbohydrates and related compounds to *Erioischia brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 12(4):441-453.
- Finch S & Coaker TH (1969b) A method for the continuous rearing of the cabbage root fly *Erioischia brassicae* (Bch.) and some observations on its biology. *Bulletin of Entomological Research* 58(03):619-627.
- Finch S & Collier RH (1983) Emergence of flies from overwintering populations of cabbage root fly pupae. *Ecological Entomology* 8(1):29-36.
- Finch S & Collier RH (1985) Laboratory studies on aestivation in the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38(2):137-143.
- Finch S & Collier RH (2000) Host-plant selection by insects – a theory based on 'appropriate/inappropriate landings' by pest insects of cruciferous plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96(2):91-102.
- Finch S, Collier RH & Skinner G (1986) Local population differences in emergence of cabbage root flies from south-west Lancashire: implications for pest forecasting and population divergence. *Ecological Entomology* 11(2):139-145.
- Finch S, Elliott MS & Torrance MT (1999) Is the parasitoid staphylinid beetle *Aleochara bilineata* an effective predator of the egg stage of its natural host, the cabbage root fly? *IOBC/wprs Bulletin* 22(5):109-112.
- Finch S & Skinner G (1982) Trapping cabbage root flies in traps baited with plant extracts and with natural and synthetic isothiocyanates *Entomologia Experimentalis et Applicata* 31(2-3):133-139.
- Fisher JJ, Rehner SA & Bruck DJ (2011) Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(2):289-295.
- Fournet S, Stapel JO, Kacem N, Nenon JP & Brunel E (2000) Life history comparison between two competitive *Aleochara* species in the cabbage root fly, *Delia radicum*: implications for their use in biological control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96(3):205-211.
- Francisco EA, Mochi DA, Barcelos Correia ADC & Monteiro AC (2006) Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciencia Rural* 36(4):1309-1312.
- Furlong MJ & Groden E (2003) Starvation induced stress and the susceptibility of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to infection by *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83(2):127-138.
- Gardner JM & Pillai JS (1987) *Tolypocladium cylindrosporium* (Deuteromycotina: Moniliales), a fungal pathogen of the mosquito *Aedes australis*. *Mycopathologia* 97(2):83-88.
- Garrido-Jurado I, Torrent J, Barrón V, Corpas A & Quesada-Moraga E (2011) Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58(3):277-285.
- Georgis R, Koppenhöfer AM, Lacey LA, Bélair G, Duncan LW, Grewal PS, Samish M, Tan L, Torr P & van Tol RWHM (2006) Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control* 38(1):103-123.
- Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B & Vilcinskis A (2000) Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44(2):49-68.
- Giroux I & Fortin J (2010) Pesticides dans l'eau de surface d'une zone maraîchère - Ruisseau Gibeault-Delisle dans les "terres noires" du bassin versant de la rivière Châteauguay de 2005 à 2007. (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement et Université Laval, Département

- des sols et de génie agroalimentaire.), p 28.
- Glare TR & O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis : Biology, Ecology and Safety*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK. 351 p
- Goble HW, McEwen FL, Braun HE & Frank R (1972) Cabbage maggot control in root and stem crucifers with new insecticides. *Journal of Economic Entomology* 65(3):837-842.
- Goettel MS (1988) Pathogenesis of the hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology* 51(3):259-274.
- Goettel MS & Douglas Inglis G (1997) Chapter V-3 - Fungi: Hyphomycetes. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Lawrence AL (Édit.) Academic Press, London. p 213-249.
- Goettel MS, Eilenberg J & Glare T (2010) Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. *Insect Control - Biological and and Synthetic Agents*, Gilbert LI & Gill SS (Édit.) Academic Press, London. p 387-431.
- Goettel MS, Vandenberg JD, Duke GM & Schaalje GB (1993) Susceptibility to chalkbrood of alfalfa leafcutter bees, *Megachile rotundata*, reared on natural and artificial provisions. *Journal of Invertebrate Pathology* 61(1):58-61.
- Gouinguéné S, Poiger T & Städler E (2006) Eggs of cabbage root fly stimulate conspecific oviposition: Evaluation of the activity and determination of an egg-associated compound. *Chemoecology* 16(2):107-113.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN & Ignoffo CM (1994) Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 64(1):13-17.
- Hajek AE & Delalibera I (2010) Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55(1):147-158.
- Hajek AE & St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology* 39:293-322.
- Harris CR & Svec HJ (1966) Mass rearing of the cabbage maggot under controlled environmental conditions, with observations on the biology of cyclodiene-susceptible and resistant strains. *Journal of Economic Entomology* 59(3):569-573.
- Hartfield C & Finch S (2003) Releasing the rove beetle *Aleochara bilineata* in the field as a biological agent for controlling the immature stages of the cabbage root fly, *Delia radicum*. *IOBC/wprs Bulletin* 26(3):127-133.
- Havukkala I (1988) Non-chemical control methods against cabbage root flies *Delia radicum* and *Delia floralis* (Anthomyiidae). *Ann. Agric. Fenn.* (27):271-279.
- Hawkes C (1972) The diurnal periodicity and cycle of behaviour of the adult cabbage root fly (*Erioischia brassicae*). *Annals of Applied Biology* 70(2):109-118.
- Hawkes C & Coaker TH (1979) Factors affecting the behavioural responses of the adult cabbage root fly, *Delia brassicae*, to host plant odour *Entomologia Experimentalis et Applicata* 25(1):45-58.
- Hawkes C, Patton S & Coaker TH (1978) Mechanisms of host plant finding in adult cabbage root fly, *Delia brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24(3):419-427.
- Hemachandra KS, Holliday NJ, Mason PG, Soroka JJ & Kuhlmann U (2007) Comparative assessment of the parasitoid community of *Delia radicum* in the Canadian prairies and Europe: A search for classical biological control agents. *Biological Control* 43(1):85-94.
- Herrero N, Pérez-Sánchez R, Oleaga A & Zabalgogezcoa I (2011) Tick pathogenicity, thermal tolerance and virus infection in *Tolypocladium cylindrosporum*. *Annals of Applied Biology* 159(2):192-201.
- Hesketh H, Roy H, Eilenberg J, Pell J & Hails R (2010) Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl* 55(1):55-73.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ,

- Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson K-H, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo J-M, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y-J & Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5):509-547.
- Hoffmann MP, Kuhar TP, Baird JM, Gardner J, Schwartz P & Shelton AM (2001) Nonwoven fiber barriers for control of cabbage maggot and onion maggot (Diptera: Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology* 94(6):1485-1491.
- Hu G & St. Leger RJ (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12):6383-6387.
- Hughes RD & Salter DD (1959) Natural mortality of *Erioischia brassicae* (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae) during the immature stages of the first generation. *Journal of Animal Ecology* 28(2):231-241.
- Humber RA (1997) Chapter V-1 - Fungi: Identification. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Lawrence AL (Édit.) Academic Press, London. p 153-185.
- Hummel JD, Dossdall LM, Clayton GW, Harker KN & O'Donovan JT (2009) Effects of canola-wheat intercrops on *Delia* spp. (Diptera: Anthomyiidae) oviposition, larval feeding damage and adult abundance. *Journal of Economic Entomology* 102(1):219-228.
- Hywel-Jones NL & Gillespie AT (1990) Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* 94(3):389-392.
- Ibrahim L, Butt TM & Jenkinson P (2002) Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 106(6):705-715.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM & Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as biocontrol agents : Progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CAB International, Oxfordshire. p 23-71.
- Inyang EN, Butt TM, Doughty KJ, Todd AD & Archer S (1999) The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection of the mustard beetle. *Mycological Research* 103(8):974-980.
- Jackson MA, Dunlap CA & Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55(1):129-145.
- Jackson MA & Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113(8):842-850.
- Jackson TA (1999) Factors in the success and failure of microbial control agents for soil dwelling pests. *Integrated Pest Management Reviews* 4(4):281-285.
- Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55(1):159-185.
- Jaronski ST & Jackson MA (2008) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* 18(8):849-863.
- Jeffs LB, Xavier IJ, Matai RE & Khachatourians GG (1999) Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology* 45(11):936-948.
- Johansen TJ & Meadow R (2006) Population differences in emergence of brassica root flies

- (Diptera: Anthomyiidae). *Environmental Entomology* 35:1161-1165.
- Jonason NB, Boetel MA, Eide JD, Campbell LG & Rao MB (2005) Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) to sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) larvae. *Journal of Sugar Beet Research* (42):103-117.
- Judge FD, Rinick HB & McEwen FL (1968) Field testing candidate insecticides on radish, cabbage, and cauliflower for control of the cabbage maggot in New York state. *Journal of Economic Entomology* 61(6):1572-1577.
- Jyoti JL, Shelton AM & Barnard J (2003) Evaluation of degree-day and julian-day logistic models in predicting cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) emergence and flight in upstate New York. *Journal of Entomological Science* 38(4):525-532.
- Jyoti JL, Shelton AM & Earle ED (2001a) Identifying sources and mechanisms of resistance in crucifers for control of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology* 94:942-949.
- Jyoti JL, Shelton AM & Earle ED (2001b) Identifying sources and mechanisms of resistance in crucifers for control of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology* 94(4):942-949.
- Kaufman PE, Wood LA, Goldberg JI, Long SJ & Rutz DA (2008) Host age and pathogen exposure level as factors in the susceptibility of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 18(8):841-847.
- Keller S, Kessler P & Schweizer C (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *BioControl* 48(3):307-319.
- Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE & Charnley AK (1999) The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74(3):213-223.
- Khachatourians GG & Qazi SS (2008) Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. *Human and Animal Relationships*, (The Mycota, Brakhage AA & Zipfel PF (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin Vol 6. p 33-61.
- King KM & Forbes AR (1954) Control of root maggots in rutabagas. *Journal of Economic Entomology* 47(4):607-615.
- Klingen I, Eilenberg J & Meadow R (2002a) Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 91(1-3):191-198.
- Klingen I, Hajek A, Meadow R & Renwick JAA (2002b) Effect of brassicaceous plants on the survival and infectivity of insect pathogenic fungi. *BioControl* 47(4):411-425.
- Klingen I, Meadow R & Aandal T (2002c) Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. *Journal of Applied Entomology* 126(5):231-237.
- Klingen I, Meadow R & Eilenberg J (2000) Prevalence of fungal infections in adult *Delia radicum* and *Delia floralis* captured on the edge of a cabbage field. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97(3):265-274.
- Konstantopoulou MA & Mazomenos BE (2005) Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. *BioControl* 50(2):293-305.
- Kostal V (1992) Orientation behavior of newly hatched larvae of the cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), to volatile plant metabolites. *Journal of Insect Behavior* 5(1):61-70.
- Kostal V & Finch S (1994) Influence of background on host-plant selection and subsequent oviposition by the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 70(2):153-163.
- Kostal V (1991) The effect of colour of the substrate on the landing and oviposition behaviour of

- the cabbage root fly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59(2):189-196.
- Kozhanchikov PI (1939) Peculiarities in the development of the pupae of the cabbage fly (*Hylemya brassicae* Bché) under different environmental conditions. *Bull. Inst. Zool. appl. Phytopath.* 7:5-14.
- Krieg A & Langenbruch GA (1981) Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, Burges HD (Édit.) Academic Press, London. p 837-896.
- Lacey LA & Brooks WM (1997) Chapter I - Initial handling and diagnosis of diseased insects. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Lawrence AL (Édit.) Academic Press, London. p 1-16.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK & Vail P (2001) Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control* 21(3):230-248.
- Lacey LA, Martins A & Ribeiro C (1994) The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera:Scarabaeidae). *European Journal of Entomology* 91(3):313-319.
- Lam TNC, Goettel MS & Soares Jr. GG (1988) Host records for the entomopathogenic hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum*. *Florida Entomologist* 71(1):86-89.
- Langewald J & Kooyman C (2007) Green Muscle™, a fungal biopesticide for control of grasshoppers and locusts in Africa. *Biological Control: a global perspective*, Lazarovits G, Goettel MS & Vincent C (Édit.) CAB International, Cambridge. p 311-318.
- Lecuona RE, Clement JL, Riba G, Joulie C & Juárez P (1997) Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *Journal of Economic Entomology* 90(1):119-123.
- Lecuona RE, Turica M, Tarocco F & Crespo DC (2005) Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *Journal of Medical Entomology* 42:332-336.
- Leland JE, McGuire MR, Grace JA, Jaronski ST, Ulloa M, Park YH & Plattner RD (2005) Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae). *Biological Control* 35(2):104-114.
- Lepage MP, Bourgeois G, Brodeur J & Boivin G (2012) Effect of soil temperature and moisture on survival of eggs and first-instar larvae of *Delia radicum*. *Environmental Entomology* 41(1):159-165.
- Lezama-Gutiérrez R, De La Luz AT, Molina-Ochoa J, Rebolledo-Dominguez O, Pescador AR, López-Edwards M & Aluja M (2000) Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) : Laboratory and field trials. *Journal of Economic Entomology* 93(4):1080-1084.
- Li Z (2007) *Beauveria bassiana* for pine caterpillar management in the people's republic of China. *Biological Control: a global perspective*, Lazarovits G, Goettel MS & Vincent C (Édit.) CAB International, Cambridge. p 300-310.
- Liu H & Bauer LS (2006) Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology* 99(4):1096-1103.
- Liu H, Skinner M, Brownbridge M & Parker BL (2003) Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 82(3):139-147.
- Liu H, Skinner M, Parker BL & Brownbridge M (2002) Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology* 95(4):675-681.
- Loesch A, Hutwimmer S & Strasser H (2010) Carbon utilization pattern as a potential quality control criterion for virulence of *Beauveria brongniartii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 104(1):58-65.

- Lohmeyer KH & Miller JA (2006) Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 99(6):1943-1947.
- Lord JC (2010) Dietary stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology* 103(5):1542-1546.
- Lukwinski AT, Hill JE, Khachatourians GG, Hemmingsen SM & Hegedus DD (2006) Biochemical and taxonomic characterization of bacteria associated with the crucifer root maggot (*Delia radicum*). *Canadian Journal of Microbiology* 52(3):197-208.
- Lysak MA & Koch MA (2010) Phylogeny, genome and karyotype evolution of crucifers (Brassicaceae). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, Bancroft I & Schmidt R (Édit.) Springer, New York. p 1:32.
- MacAlpine JLP, Marshall KE & Sinclair BJ (2011) The effects of CO<sub>2</sub> and chronic cold exposure on fecundity of female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 57(1):35-37.
- Mailloux G (2001) Échantillonnage séquentiel et fluctuations saisonnières des populations de *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae) dans les plantations de choux. *Agrisol* 12(1):40-48.
- Malchev I, Fletcher R & Kott L (2010) Breeding of rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica* L. Reichenb.) based on biomarker selection for root maggot resistance (*Delia radicum* L.). *Euphytica* 175(2):191-205.
- Margalith Y & Ben-Dov E (2000) Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Insect pest management : Techniques for environmental protection*, Rechcigl JE & Rechcigl NA (Édit.) CRC Press LLC, Boca Raton. p 243-301.
- Matson PA, Parton WJ, Power AG & Swift MJ (1997) Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277(5325):504-509.
- McAlpine JF & Slight C (1981) The wheat bulb fly, *Delia coarctata*, in North America (Diptera: Anthomyiidae). *The Canadian Entomologist* 113(7):615-621.
- McDonald RS & Sears MK (1992) Assessment of larval feeding damage of the cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) in relation to oviposition preference on canola. *Journal of Economic Entomology* 85:957-962.
- McDonald S & Swailes GE (1975) Dieldrin resistance in *Hylemya brassicae* (Diptera: Anthomyiidae) in Alberta *The Canadian Entomologist* 107(7):729-734.
- McEwen FL, Rinick Jr HB, Davis AC & Little Jr RC (1967) Cabbage maggot resistance to organochlorine insecticides. *Journal of Economic Entomology* 60(5):1261-1264.
- Meadow R (2003) Monitoring root flies in *Brassicaceae* - recent developments. *IOBC/wprs Bulletin* 26(3):13-16.
- Meadow R & Johansen TJ (2005) Exclusion fences against brassica root flies (*Delia radicum* and *D. floralis*). *IOBC/wprs Bulletin* 28(4):36-43.
- Meadow R, Vandenberg JD & Shelton AM (2000) Exchange of inoculum of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) between adult flies of the cabbage maggot *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae). *Biocontrol Science and Technology* 10(4):479-485.
- Medo J & Cagáň L (2011) Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological Control* 59(2):200-208.
- Ment D, Gindin G, Soroker V, Glazer I, Rot A & Samish M (2010) *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(2):132-139.
- Meyling NV & Eilenberg J (2006a) Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research* 110(2):188-195.
- Meyling NV & Pell JK (2006b) Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology* 31(2):162-171.
- Meyling NV, Thorup-Kristensen K & Eilenberg J (2011) Below- and aboveground abundance and

- distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. *Biological Control* 59(2):180-186.
- Miles M (1951) Factors affecting the behaviour and activity of the cabbage root fly (*Erioischia brassicae* Bché) *Annals of Applied Biology* 38(2):425-432.
- Miles M (1952) Studies of british anthomyiid flies. *Bulletin of Entomological Research* 43(01):83-90.
- Mishra S, Kumar P, Malik A & Satya S (2011) Adulticidal and larvicidal activity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), in laboratory and simulated field bioassays. *Parasitology Research* 108(6):1483-1492.
- Mochi DA, Monteiro AC, Machado ACR & Yoshida L (2010a) Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology* 167(1):62-66.
- Mochi DA, Monteiro AC, Machado ACR & Yoshida L (2010b) Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology* 168(1-2):105-110.
- Morris RF (1963) Note on strains of the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae), resistant to the chlorinated hydrocarbon insecticides in Western Newfoundland. *The Canadian Entomologist* 95(1):81-82.
- Morrow BJ, Boucias DG & Heath MA (1989) Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serial *in vitro* passage. *Journal of Economic Entomology* 82(2):404-407.
- Mukerji MK & Harcourt DG (1970) Design of a sampling plan for studies on the population dynamics of the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Diptera: Anthomyiidae) *The Canadian Entomologist* 102(12):1513-1518.
- Mulock BS & Chandler LD (2001) Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biological Control* 22(1):16-21.
- Nadeau MP & Boisvert JL (1994) Larvicidal activity of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the mosquito *Aedes triseriatus* and the black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 10(4):487-491.
- Nair KSS & McEwen FL (1975) Ecology of the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Diptera: Anthomyiidae), in rutabaga in southwestern ontario, with some observations on other root maggots *The Canadian Entomologist* 107(4):343-354.
- Nault BA, Zhao J-Z, Straub RW, Nyrop JP & Hessney ML (2006) Onion maggot (Diptera: Anthomyiidae) resistance to chlorpyrifos in New York onion fields. *Journal of Economic Entomology* 99:1375-1380.
- Neveu N, Allo MR, Nénon JP, Langlet X, Brunel E, Lahmer M & Boivin G (1997) The fine structure of the egg shells of the cabbage maggot, *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae), and its relation with developmental conditions and oviposition site. *Canadian Journal of Zoology* 75(4):535-541.
- Neveu N, Krespi L, Kacem N & Nénon J-P (2000) Host-stage selection by *Trybliographa rapae*, a parasitoid of the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96(3):231-237.
- Nicolas G & Sillans D (1989) Immediate and latent effects of carbon dioxide on insects. *Annual Review of Entomology* 34(1):97-116.
- Nielsen O (2003) Susceptibility of *Delia radicum* to steinernematid nematodes. *BioControl* 48(4):431-446.
- Ormond EL, Thomas APM, Pugh PJA, Pell JK & Roy HE (2010) A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS*

- Microbiology Ecology* 74(1):146-154.
- Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Álvarez C & Quesada-Moraga E (2010) Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105(3):270-278.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK & Pereira RM (2008) *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3):267-270.
- Parsons CK, Dixon PL & Colbo M (2007) Relay cropping cauliflower with lettuce as a means to manage first-generation cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) and minimize cauliflower yield loss. *Journal of Economic Entomology* 100(3):838-846.
- Paula AR, Carolino AT, Paula CO & Samuels RI (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors* 4(8).
- Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE & Steinkraus DC (2001) Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. *Fungi as biocontrol agents : Progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CAB International, Oxfordshire. p 71-153.
- Pell JK, Hannam J & Steinkraus D (2010) Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl* 55(1):187-198.
- Pilz C, Enkerli J, Wegensteiner R & Keller S (2011) Establishment and persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in maize fields. *Journal of Applied Entomology* 135(6):393-403.
- Pilz C, Wegensteiner R & Keller S (2007) Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Applied Entomology* 131(6):426-431.
- Pont AC (1981) The Linnaean species of the families Fanniidae, Anthomyiidae and Muscidae (Insecta: Diptera). *Biological Journal of the Linnean Society* 15(2):165-175.
- Poprawski TJ, Robert PH, Majchrowicz I & Boivin G (1985) Susceptibility of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) to eleven isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Environmental Entomology* 14:557-561.
- Prenerová E (1994) Pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* toward *Cephalcia abietis* eonymphs (Insecta, Hymenoptera): enhancement of bioactivity by *in vivo* passaging. *Journal of Invertebrate Pathology* 64(1):62-64.
- Prokopy RJ, Collier RH & Finch S (1983) Leaf color used by cabbage root flies to distinguish among host plants. *Science* 221(4606):190-192.
- Püntener W (1981) *Manual for field trials in plant protection*. Agricultural division, Ciba-Gegy Limited, Second Edition
- Quesada-Moraga E, Maranhao EAA, Valverde-García P & Santiago-Álvarez C (2006b) Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control* 36(3):274-287.
- Quesada-Moraga E, Ruiz-García A & Santiago-Álvarez C (2006a) Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99(6):1955-1966.
- Quesada-Moraga E, Santos-Quirós R, Valverde-García P & Santiago-Álvarez C (2004) Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 87(1):51-58.
- Rakow G (2004) Species origin and economic importance of *Brassica. Brassica*, (Biotechnology

- in Agriculture and Forestry: 54), Pua EC & Douglas CJ (Édit.) Springer, Berlin. p 3-11.
- Rath AC, Guy PL & Webb WR (1996) *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. *Mycological Research* 100(1):57-62.
- Read DC (1965) Rearing root maggots, chiefly *Hylemya brassicae* (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae) for bioassay. *The Canadian Entomologist* 97(2):136-141.
- Read DC (1970) Controlling the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Diptera: Anthomyiidae), with chemical pesticide *The Canadian Entomologist* 102(6):667-678.
- Rehner SA (2005) Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. *Insect-Fungal Associations: Ecology and evolution*, Vega FE & Blackwell M (Édit.) Oxford University Press, New-York. p 3-27.
- Ritchot C (1968) *Biologie et répression des larves des racines Hylemya spp.* Thèse de doctorat (Université McGill, Montréal). 156 p
- Rizzo DC (1977) Age of three dipteran hosts as a factor governing the pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 30(2):127-130.
- Robertson JL, Preisler HK, Ng SS, Hickle LA & Gelernter WD (1995) Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *Journal of Economic Entomology* 88(1):1-10.
- Roessingh P & Städler E (1990) Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behaviour in the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57(1):93-100.
- Roessingh P, Städler E, Baur R, Hurter J & Ramp T (1997) Tarsal chemoreceptors and oviposition behaviour of the cabbage root fly (*Delia radicum*) sensitive to fractions and new compounds of host-leaf surface extracts. *Physiological Entomology* 22(2):140-148.
- Roessingh P, Städler E, Fenwick GR, Lewis JA, Nielsen JK, Hurter J & Ramp T (1992) Oviposition and tarsal chemoreceptors of the cabbage root fly are stimulated by glucosinolates and host plant extracts. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65(3):267-282.
- Roy D (2010) Réseau d'avertissements phytosanitaires - Avertissement No 02 - crucifères - 6 mai 2010. (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec).
- Sabbahi R, Merzouki A & Guertin C (2008a) Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. *Journal of Applied Entomology* 132(2):124-134.
- Sabbahi R, Merzouki A & Guertin C (2008b) Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiorhynchus ovatus*. *Journal of Applied Entomology* 132(2):151-160.
- Sabbahi R, Merzouki A & Guertin C (2009) Research article potential effect of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Anthonomus signatus* (Coleoptera: Curculionidae) in strawberries. *Biocontrol Science and Technology* 19(7):729-741.
- Safavi SA (2011) Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 21(8):883-890.
- Samson RA & Soares Jr GG (1984) Entomopathogenic species of the hyphomycete genus *Tolypocladium*. *Journal of Invertebrate Pathology* 43(2):133-139.
- Santos MP, Dias LP, Ferreira PC, Pasin LAAP & Rangel DEN (2011) Cold activity and tolerance of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium spp.* to UV-B irradiation and heat. *Journal of Invertebrate Pathology* 108(3):209-213.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR & Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):775-806.

- Scholte EJ, Knols BG, Samson RA & Takken W (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of insect science (Online)* 4:19.
- Schroder PC, Ferguson CS, Shelton AM, Wilsey WT, Hoffmann MP & Petzoldt C (1996) Greenhouse and field evaluations of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for control of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) on cabbage. *Journal of Economic Entomology* 89(5):1109-1115.
- Sears MK & Dufault CP (1986) Flight activity and oviposition of the cabbage maggot, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae), in relation to damage to rutabagas. *Journal of Economic Entomology* 79(1):54-58.
- Shah FA, Allen N, Wright CJ & Butt TM (2007) Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 276(1):60-66.
- Shah FA, Wang CS & Butt TM (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251(2):259-266.
- Shan L-T & Feng M-G (2010) Evaluation of the biocontrol potential of various *Metarhizium* isolates against green peach aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Pest Management Science* 66(6):669-675.
- Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW & Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88(1):1-7.
- Smith KM (1927) A study of *Hylemyia (Chortophila) brassicae* Bouché, the cabbage root fly and its parasites. with notes on some other dipterous pests of cruciferous plants. *Annals of Applied Biology* 14(3):312-330.
- Soares Jr. GG (1982) Pathogenesis of infection by the hyphomycetous fungus, *Tolypocladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Dip.: Culicidae). *Entomophaga* 27(3):283-299.
- Soares Jr. GG, Riba G, Caudal A & Vincent JJ (1985) Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen *Tolypocladium cylindrosporum* and two isolates of *Tolypocladium extinguis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 46(2):115-120.
- Sokal RR & Rohlf JF (1981) *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New-York, Second Edition. 861 p
- Soroka JJ, Dosedall LM, Olfert OO & Seidle E (2004) Root maggots (*Delia spp.*, Diptera: Anthomyiidae) in prairie canola (*Brassica napus* L. and *B. rapa* L.): Spatial and temporal surveys of root damage and prediction of damage levels. *Canadian Journal of Plant Science* 84(4):1171-1182.
- Sosa-Gomez DR, Boucias DG & Nation JL (1997) Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology* 69(1):31-39.
- Srei N (2011) *Identification des facteurs permettant d'optimiser la production de Beauveria bassiana et les impacts sur la virulence*. Mémoire de maîtrise (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 135 p
- St Leger RJ (1993) Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. *Parasites and pathogens of insects*, Beckage NE, Thompson SN & Federici BA (Édit.) Academic Press inc., San Diego Vol Volume 2 : Pathogens. p 211-230.
- St Leger RJ, Butt TM, Goettel MS, Staples RC & Roberts DW (1989) Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13(3):274-288.
- St Leger RJ, Cooper RM & Charnley AK (1987) Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology* 133(5):1371-1382.
- St Leger RJ, Goettel M, Roberts DW & Staples RC (1991) Prepenetration events during infection

- of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58(2):168-179.
- St Leger RJ, Nelson JO & Screen SE (1999) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 145(10):2691-2699.
- Steenberg T, Jespersen JB, Jensen KMV, Nielsen BO & Humber RA (2001) Entomopathogenic fungi in flies associated with pastured cattle in Denmark. *Journal of Invertebrate Pathology* 77(3):186-197.
- Steenberg T & Øgaard L (2000) Mortality in hibernating turnip moth larvae, *Agrotis segetum*, caused by *Tolypocladium cylindrosporum*. *Mycological Research* 104(1):87-91.
- Steinkraus D (2007) Management of aphid populations in cotton through conservation: Delaying insecticides spraying has its benefits. *Biological Control: a global perspective*, Lazarovits G, Goettel MS & Vincent C (Édit.) CAB International, Cambridge. p 383-391.
- Storey GK & Gardner WA (1987) Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. *Environmental Entomology* 16(1):178-181.
- Straub RW (1988) Suppression of cabbage root maggot (Diptera: Anthomyiidae) damage to cruciferous transplants by incorporation of granular insecticide into potting soil. *Journal of Economic Entomology* 81(2):578-581.
- Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard JJ, Shrestha B & Spatafora JW (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57(1):5-59.
- Swales GE (1961) Laboratory studies on mating and oviposition of *Hylemya brassicae* (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae). *The Canadian Entomologist* 93(10):940-943.
- Tanada Y & Kaya HK (1993) *Insect Pathology*. Academic Press Inc., San Diego, USA. 666 p
- Thomsen L & Eilenberg J (2000) *Entomophthora muscae* resting spore formation *in vivo* in the host *Delia radicum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76(2):127-130.
- Todorova SI, Côté J-C & Coderre D (1998) Distinction between *Beauveria* and *Tolypocladium* by carbohydrate utilization. *Mycological Research* 102(1):81-87.
- Tomlin AD, McLeod DGR, Moore LV, Whistlecraft JW, Miller JJ & Tolman JH (1992) Dispersal of *Aleochara bilineata* (Col.: Staphylinidae) following inundative releases in urban gardens. *Entomophaga* 37(1):55-63.
- Torrado-León E, Montoya-Lerma J & Valencia-Pizo E (2006) Sublethal effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. *Mycopathologia* 162(6):411-419.
- Trudel R, Lavallée R, Guertin C, Côté C, Todorova SI, Alfaro R & Kope H (2007) Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). *Journal of Applied Entomology* 131(2):90-97.
- Turnock WJ & Boivin G (1997) Inter- and intra-population differences in the effects of temperature on postdiapause development of *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 84(3):255-265.
- Turnock WJ, Boivin G & Ring RA (1998) Interpopulation differences in the coldhardiness of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) *The Canadian Entomologist* 130(2):119-129.
- Turnock WJ, Boivin G & Whistlecraft JW (1995) Parasitism of overwintering puparia of the cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), in relation to host density and weather factors *The Canadian Entomologist* 127(4):535-542.
- Van Keymeulen M, Hertveldt L & Pelerents C (1981) Methods for improving both the quantitative and qualitative aspects of rearing *Delia brassicae* for sterile release program *Entomologia Experimentalis et Applicata* 30(3):231-240.
- Vandenberg JD & Cantone FA (2004) Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces*

- fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology* 85(1):40-45.
- Vandenberg JD, Ramos M & Altre JA (1998) Dose response and age- and temperature-related susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *Environmental Entomology* 27(4):1017-1021.
- Vandermeer JH (1992) *The ecology of intercropping*. Cambridge University Press, Cambridge. 237p. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.00027075734&partnerID=40&md5=ebfd8eb2113b268c88e651b404f5e102>
- Vänninen I (1996) Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research* 100(1):93-101.
- Vänninen I, Hokkanen H & Tyni-Juslin J (1999a) Screening of field performance of entomopathogenic fungi and nematodes against cabbage root flies (*Delia radicum* L. and *D. floralis* (Fall.) (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Agriculturae Scandinavica - Section B Soil and Plant Science* 49(3):167-183.
- Vänninen I, Hokkanen H & Tyni-Juslin J (1999b) Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. and *Delia floralis* (Fall.) (Dipt., Anthomyiidae) with entomopathogenic fungi: Laboratory and greenhouse tests. *Journal of Applied Entomology* 123(2):107-113.
- Vänninen I, Tyni-Juslin J & Hokkanen H (2000) Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finnish agricultural soils. *BioControl* 45(2):201-222.
- Varela A & Morales E (1996) Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67(2):147-152.
- Vasilyevskii NI (1929) Rozovaya muskardina i ee vozbuditeli-*Spicaria aphodii* Vuill. i *S. fumoso-rosea* (Wize). (Summary : Die Rose Muscardine und ihre Erreger *Spicaria aphodii* Vuill. und *Spicaria fumoso-rosea* (Wize). *Bolezn. Rast.* 18(3):113-148 (In Russian).
- Vega FE, Posada F, Catherine Aime M, Pava-Ripoll M, Infante F & Rehner SA (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46(1):72-82.
- Vereecke A & Hertveldt L (1971) Laboratory rearing of the cabbage maggot. *Journal of Economic Entomology* 64:670-673.
- Vernon RS & Broatch JS (1996) Responsiveness of *Delia* spp. (Diptera: Anthomyiidae) to colored sticky traps in flowering and rosette stage canola *The Canadian Entomologist* 128(6):1077-1085.
- Vernon RS & Mackenzie JR (1998) The effect of exclusion fences on the colonization of rutabagas by cabbage flies (Diptera: Anthomyiidae). *The Canadian Entomologist* 130(2):153-162.
- Vestergaard S, Butt TM, Bresciani J, Gillespie AT & Eilenberg J (1999) Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(1):25-33.
- Vey A, Hoagland RE & Butt TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents : Progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CAB International, Oxfordshire. p 311-346.
- Vimala Devi PS, Prasad YG, Anitha Chowdary D, Mallikarjuna Rao L & Balakrishnan K (2003) Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea Rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa Armigera* and *Spodoptera Litura*. *Mycopathologia* 156(4):365-373.
- Vincent JFV & Wegst UGK (2004) Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development* 33(3):187-199.
- von Arx JA (1986) *Tolypocladium*, a synonym of *Beauveria*. *Mycotaxon* 25:153-158.
- Wang C & St. Leger RJ (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with

- blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6(5):808-816.
- Watson DW, Geden CJ, Long SJ & Rutz DA (1995) Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control* 5(3):405-411.
- Weiser J & Pillai JS (1981) *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycetes: Moniliaceae) a new pathogen of mosquito larvae. *Entomophaga* 26(4):357-361.
- Whistlecraft JW, Tolman JH & Harris CR (1985) *Delia radicum*. *Handbook of insect rearing* Singh P & Moore RF (Édit.) Elsevier Science Publishing Company inc., New-York Vol II. p 67-74.
- Wright SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P & Galaini-Wright S (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71(3):217-226.
- Wright SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ & Galaini-Wright S (2000) Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* 17(3):203-217.
- Wright SP, Inglis GD & Goettel MS (2007) Fungi. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Lacey LA & Kaya HK (Édit.) Springer Netherlands. p 223-248.
- Wright SP, Jackson MA & de Kock SL (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents : Progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CAB International, Oxfordshire. p 253-288.
- Wright SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST & Vandenberg JD (2010) Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(3):186-199.
- Wright C, Brooks A & Wall R (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Management Science* 60(7):639-644.
- Wright DA, Cummings NJ, Haack NA & Jackson TA (2009) *Tolypocladium cylindrosporum*, a novel pathogen for sheep blowflies. *N. Z. J. Agric. Res.* 52(3):315-321.
- Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ & Pye BJ (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59(2):156-165.
- Zabalgogazcoa I, Oleaga A & Pérez-Sánchez R (2008) Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology* 158(4):336-343.
- Zhang S, Xia YX, Kim B & Keyhani NO (2011) Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* 80(3):811-826.
- Zimmermann G (2007a) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17(6):553-596.
- Zimmermann G (2007b) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17(9):879-920.