

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

**Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*
dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes
ravageurs en fraiseraies**

Par
Rachid SABBAHI

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr Réjean Beaudet, INRS-IAF
Examineur externe	Dr Paul Albert, Université Concordia
Examineur externe	Dr Domingos de Oliveira, UQÀM
Directeur de recherche	Dr Claude Guertin, INRS-IAF
Codirecteur de recherche	Dr Abderrazzak Merzouki, École Polytechnique de Montréal

Résumé

La production de fraises au Québec correspond à plus du tiers de celle du Canada avec près de 2000 ha cultivés et une production de fruits annuelle d'environ 9000 t. La punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois), l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* (Say) et le charançon de la racine du fraisier, *Otiorhynchus ovatus* (Linnaeus), sont les principaux insectes ravageurs des cultures de fraises. Ces insectes peuvent affecter l'inflorescence, ce qui entraîne une déformation du fruit et une diminution de sa valeur marchande. La punaise terne a développé une résistance à divers pesticides chimiques. Des essais en lutte biologique avec des auxiliaires (prédateurs et parasitoïdes) se sont avérés insatisfaisants. Le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Balsamo) suscite de plus en plus d'intérêt en recherche et constitue une avenue intéressante en lutte biologique contre certains ravageurs. Il n'existe aucune formulation commerciale à base de *B. bassiana* pour le contrôle des populations de la punaise terne. Par ailleurs, la pathogénicité et la virulence de ce champignon sur l'anthonome de la fleur du fraisier et le charançon de la racine du fraisier n'ont pas encore été étudiées.

Cette recherche consiste, dans un premier temps, à déterminer le potentiel insecticide de plusieurs isolats de *B. bassiana* contre les populations de *L. lineolaris*, *A. signatus* et *O. ovatus*. Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* avaient un potentiel insecticide intéressant au laboratoire contre les adultes et les nymphes de la punaise terne et les adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier et du charançon de la racine du fraisier. Ils ont causé des mortalités supérieures à 80 % au septième jour suivant l'inoculation.

Parallèlement aux épreuves biologiques, il est essentiel de caractériser les isolats étudiés avant leur application au champ. La caractérisation des isolats permet de réaliser un suivi environnemental suite à leur emploi au champ. Les isolats de *B.*

bassiana sont actuellement identifiés selon leurs origines géographiques et leurs hôtes spécifiques, sans tenir compte de leurs caractéristiques génétiques. Différentes approches (PCR, analyses des séquences d'ADN et PCR-RFLP) ont été utilisées lors de cette étude comme outils moléculaires de détection, d'identification et d'analyse phylogénétique de différents isolats de *B. bassiana*. L'analyse des séquences nucléotidiques des régions variables ITS1 et ITS2 de l'ADN ribosomal a permis la distinction de *B. bassiana* des hyphomycètes *Tolypocladium*, *Metarhizium* et *Verticillium*. L'extrémité 3' du gène 28S de l'ADNr a accumulé beaucoup de variabilité et elle peut être utilisée pour différencier les isolats de *B. bassiana*. La variation de taille des fragments amplifiés de cette extrémité s'explique par la présence ou l'absence d'introns dans le gène 28S chez chacun des isolats étudiés. La technique PCR-RFLP, basée sur la digestion des fragments amplifiés de l'extrémité 3' du gène 28S, a permis d'obtenir différents profils de restriction permettant ainsi de différencier et de réaliser le suivi environnemental des isolats de *B. bassiana* après leurs applications au champ.

Finalement, la viabilité et la persistance de l'activité insecticide de conidies de *B. bassiana* ont été évaluées en fraiseraies. La viabilité et l'activité insecticide des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* sur le feuillage ont été observées jusqu'à six jours après chaque application. Les résultats ont démontré l'importance des applications multiples d'une formulation à base de *B. bassiana* dans une stratégie phytosanitaire permettant le contrôle des populations des principaux insectes ravageurs en fraiseraies. Les applications multiples des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha, sur une base hebdomadaire, ont entraîné une diminution des populations de nymphes de la punaise terne et d'adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier. De plus, elles ont permis une meilleure protection des plants du fraisier contre les attaques de ces deux ravageurs dans les parcelles traitées comparativement à celles du témoin. Ainsi, les dommages aux fraises associés au comportement alimentaire de *L. lineolaris* ont été réduits de 26 %

et les pertes de rendement en fruits associées au comportement de ponte d'*A. signatus* ont été diminuées de 36 %. Cependant, d'autres travaux doivent être réalisés afin de déterminer les concentrations précises de champignon devant être appliquées aux champs et d'élaborer une formulation assurant une plus grande persistance des conidies.

Cette recherche a permis d'approfondir les connaissances sur la biologie de l'entomopathogène *B. bassiana* et des principaux insectes ravageurs du fraisier et sur la relation de ces derniers avec cet entomopathogène. L'utilisation des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* dans une stratégie phytosanitaire permettra une protection accrue contre les principaux insectes ravageurs des cultures de fraises au Québec.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur Dr Claude Guertin et mon codirecteur de recherche Dr Abderrazzak Merzouki pour leur encouragement, leur patience, leurs conseils et leur enthousiasme communicatif.

Je remercie notre technicien de laboratoire monsieur Marc Henrichon pour son aide et ses conseils précieux. J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes qui, placées sur mon chemin, ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse. Merci donc à Jamal Ziani, Hajbou Iguliz, Virginia Hock, Olivier Morisset, Amilie Forget, Malika Moussadak et Mathieu Aubin pour leur aide précieuse qu'ils ont su m'apporter lors de la collecte de données sur le terrain.

Merci à Étienne Jobin et au Dr Denis Bouchard du Centre de recherche de Mirabel pour leur contribution à ma recherche lors des expériences sur le terrain.

Une grande pensée va à mes parents Mustapha et Souad SABBABI, mes sœurs Asmaa et Salma, mes frères Souhail, Imad, Anas et Jalal et toute la famille qui, malgré l'éloignement, m'ont toujours soutenu et encouragé de façon indéfectible durant ma scolarité. Cette thèse est l'achèvement d'un long périple que j'aimerais leur dédicacer.

Pour terminer, je tiens à adresser ma reconnaissance à la fondation Armand-Frappier, de m'avoir octroyé des bourses d'excellence pour mes années de doctorat.

Réalisation du projet

La réalisation de ce projet fut possible grâce aux subventions du CORPAQ et du FQRNT. Cette thèse fut rédigée sous la supervision des messieurs Claude Guertin et Abderrazzak Merzouki. J'ai réalisé les études expérimentales avec le soutien des stagiaires pour effectuer des manipulations au laboratoire et des expériences sur le terrain.

Articles scientifiques:

Sabbahi R, Merzouki A, Guertin C, 2008. Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus*, and *Otiorhynchus ovatus*. Journal of Applied Entomology. 132, 151-160.

Sabbahi R, Merzouki A, Guertin C, 2008. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. Journal of Applied Entomology. 132, 124-134.

Sabbahi R, Lavallée R, Guertin C, Merzouki A. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Hypocreales) isolates by PCR-RFLP. Soumis au Biochemistry and Molecular Biology Reports.

Communications scientifiques

Sabbahi R, Merzouki A, Guertin C, 2007. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberry crop. The 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and the 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria, 12-16 août, Université Laval, Québec, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, Merzouki A, 2007. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates by

PCR-RFLP of the rDNA-ITS regions. CSM 57th Annual Conference, 17-20 juin, Université Laval, Québec, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, 2006. Efficacité du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* contre les populations de la punaise terne, *Lygus lineolaris*, dans la culture du fraisier. Société d'Entomologie du Québec – Société d'Entomologie du Canada Réunion conjointe, 18-22 novembre, Montréal, Canada.

Sabbahi R, Merzouki A, Guertin C, 2006. Discrimination des isolats du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) par PCR-RFLP au niveau de l'ADN ribosomal. Congrès FEINRS, 16-17 novembre, Bibliothèque Nationale du Québec. Montréal, Québec, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, 2006. Application du champignon *Beauveria bassiana* pour contrôler les populations de la punaise terne, *Lygus lineolaris* dans les fraiseraies. Congrès ACFAS, 14-18 mai, Université McGill, Montréal, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, 2005. Application du champignon *Beauveria bassiana* pour contrôler les populations de la punaise terne, *Lygus lineolaris* dans les fraiseraies. Congrès INRS-Institut Armand Frappier, 3-5 novembre, Auberge du Lac-à-l'Eau-Claire, Mauricie, Saint-Alexis-des-Monts, Québec, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, 2005. Application du champignon *Beauveria bassiana* pour contrôler les populations de la punaise terne, *Lygus lineolaris* dans les fraiseraies. 132^{ème} réunion annuelle de la Société d'Entomologie du Québec, 27-28 octobre, Centre de villégiature Jouvence, Orford, Québec, Canada.

Sabbahi R, Guertin C, Todorova S, 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Lygus lineolaris* and *Anthonomus signatus* populations. Réunion conjointe de la Société d'entomologie du Canada et de la Société entomologique acadienne, 15-18 octobre, Charlottetown (Î.-P.-É.), Canada.

Table de matières

RÉSUMÉ	II
RÉALISATION DU PROJET	VI
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Culture du fraisier	5
2. Principaux insectes ravageurs du fraisier	7
2.1. Punaise terne	7
2.2. Anthonome de la fleur du fraisier	9
2.3. Charançon de la racine du fraisier	14
3. Insectes utiles du fraisier	16
4. Méthodes de lutte contre les insectes ravageurs.....	19
5. Approches de lutte microbienne.....	20
6. Méthodes de lutte contre les insectes ravageurs du fraisier.....	22
6.1. Punaise terne	22
6.2. Anthonome de la fleur du fraisier	23
6.3. Charançon de la racine du fraisier	23
7. Incidence de champignons entomopathogènes sur l'entomofaune utile.....	24
8. Champignons entomopathogènes	25
8.1. <i>Beauveria bassiana</i>	26
8.2. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte.....	34

9. Caractérisation biochimique et génétique des isolats de <i>B. bassiana</i>	35
10. Avantages de l'utilisation de <i>B. bassiana</i>	42
11. Contraintes de l'utilisation de <i>B. bassiana</i>	43
11.1. Conditions environnementales.....	43
11.2. Compatibilité de <i>B. bassiana</i> avec les agrochimiques.....	45
11.3. Compatibilité de <i>B. bassiana</i> avec d'autres agents de lutte biologique.....	46
12. Production de <i>B. bassiana</i>	47
13. Formulation à base de champignons entomopathogènes	49
14. Marché du biopesticide <i>B. bassiana</i>	50
PROBLÉMATIQUE	51
BUT, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	56
MATÉRIEL ET MÉTHODES	59
I. Volet 1 : Expériences au laboratoire	60
1.1. <i>Beauveria bassiana</i>	60
1.2. Production de <i>B. bassiana</i>	60
1.3. Insectes.....	63
1.4. Épreuves biologiques.....	64
1.4.1. Criblage des isolats	64
1.4.2. Potentiel insecticide et virulence de <i>B. bassiana</i>	67
1.5. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>B. bassiana</i>	68
1.5.1. Extraction de l'ADN génomique	68
1.5.2. Amplification par PCR de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal	70
1.5.3. Clonage et séquençage de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal	72
1.5.4. Différenciation des isolats par la technique de PCR-RFLP	75
II. Volet 2 : Essais sur le terrain	77
2.1. Cultivar et condition de production	77
2.2. Conditions météorologiques	78
2.3. Formulation à base de <i>B. bassiana</i>	78
2.4. Effet de <i>B. bassiana</i> sur les populations de la punaise terne en cages	79
2.5. Expériences en parcelles.....	81

2.5.1. Design expérimental et applications fongiques	81
2.5.2. Viabilité des conidies de <i>B. bassiana</i>	82
2.5.3. Persistance de l'activité insecticide des conidies de <i>B. bassiana</i>	83
2.5.4. Survie des populations de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	85
2.5.5. Dommages et pertes associés aux attaques de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	85
RÉSULTATS	87
I. Volet 1 : Expériences au laboratoire	88
1.1. Criblage des isolats de <i>B. bassiana</i> sur les insectes	88
1.2. Potentiel insecticide et virulence de <i>B. bassiana</i> contre <i>L. lineolaris</i> , <i>A. signatus</i> et <i>O. ovatus</i>	91
1.3. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>B. bassiana</i>	95
II. Volet 2 : Essais sur le terrain	104
2.1. Effet de <i>B. bassiana</i> sur les populations de la punaise terne en cages	104
2.2. Expériences en parcelles	106
2.2.1. Viabilité des conidies de <i>B. bassiana</i>	106
2.2.2. Persistance de l'activité insecticide des conidies de <i>B. bassiana</i>	106
2.2.3. Survie des populations de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	110
2.2.4. Dommages et pertes associés aux attaques de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	112
DISCUSSION	117
I. Volet 1 : Expériences au laboratoire	118
1.1. Criblage des isolats de <i>B. bassiana</i> sur les insectes	118
1.2. Potentiel insecticide et virulence de <i>B. bassiana</i> contre <i>L. lineolaris</i> , <i>A. signatus</i> et <i>O. ovatus</i>	121
1.3. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>B. bassiana</i>	124
II. Essais sur le terrain	128
2.1. Effet de <i>B. bassiana</i> sur les populations de la punaise terne en cages	128
2.2. Viabilité des conidies de <i>B. bassiana</i>	128
2.3. Persistance de l'activité insecticide des conidies de <i>B. bassiana</i>	130
2.4. Survie des populations de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	131
2.5. Dommages et pertes associés aux attaques de <i>L. lineolaris</i> et d' <i>A. signatus</i>	133
CONCLUSION	135
RÉFÉRENCES	140

ANNEXES.....163

Liste des figures

Figure 1. Différents stades de développement de la punaise terne.	8
Figure 2. Dommages aux fraises associés au comportement alimentaire de la punaise terne.	10
Figure 3. Différents stades de développement de l'anthonome de la fleur du fraisier.	11
Figure 4. Dommages aux bourgeons floraux associés au comportement de ponte de l'anthonome de la fleur du fraisier.	13
Figure 5. Différents stades de développement du charançon de la racine du fraisier.	15
Figure 6. Dommages aux racines associés au comportement alimentaire du charançon de la racine du fraisier.	17
Figure 7. Site d'agrégation de la coccinelle maculée.	18
Figure 8. Vue microscopique des spores et des hyphes du champignon <i>Beauveria bassiana</i>	27
Figure 9. Schéma du cycle biologique de <i>Beauveria bassiana</i>	29
Figure 10. Organisation de la structure de l'ADN ribosomal de <i>Beauveria bassiana</i>	39
Figure 11. Différentes étapes de production de conidies de <i>Beauveria bassiana</i> sur milieu céréalier.	62
Figure 12. Profusion du mycélium de <i>Beauveria bassiana</i> sur le cadavre des principaux insectes ravageurs du fraisier.	66
Figure 13. Design expérimental et disposition des cages dans les rangées du fraisier.	80
Figure 14. Mortalité des adultes de <i>Lygus lineolaris</i> traités avec plusieurs isolats de <i>Beauveria bassiana</i> après 7 jours suivant l'inoculation.	89
Figure 15. Mortalité des adultes d' <i>Anthonomus signatus</i> traités avec plusieurs isolats de <i>Beauveria bassiana</i> après 14 jours suivant l'inoculation.	90

Figure 16. Mortalité des adultes d' <i>Otiorhynchus ovatus</i> traités avec plusieurs isolats de <i>Beauveria bassiana</i> après 14 jours suivant l'inoculation.....	92
Figure 17. Mortalité des adultes de <i>Coleomegilla maculata</i> traités avec plusieurs isolats de <i>Beauveria bassiana</i> après 14 jours suivant l'inoculation.	93
Figure 18. Produits de l'amplification par PCR de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal de <i>Beauveria bassiana</i>	100
Figure 19. Profils de restriction de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal de <i>Beauveria bassiana</i> par l'enzyme <i>Cla</i> I.....	102
Figure 20. Mortalité, sous cage, des adultes de <i>Lygus lineolaris</i> infectés par les isolats <i>INRS-CFL</i> et <i>INRS-IP</i> de <i>Beauveria bassiana</i> , 7 jours suivant l'application à un taux de 1×10^{13} conidies/ha en fraiseraies.	105
Figure 21. Viabilité et persistance de l'activité insecticide des conidies des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> de <i>Beauveria bassiana</i> contre les populations d'adultes de <i>Lygus lineolaris</i> en fraiseraies.....	107
Figure 22. Viabilité et persistance de l'activité insecticide des conidies des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> de <i>Beauveria bassiana</i> contre les populations d' <i>Anthonomus signatus</i> en fraiseraies.....	108
Figure 23. Effet des applications multiples des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> de <i>Beauveria bassiana</i> sur l'abondance des nymphes de <i>Lygus lineolaris</i> en fraiseraies.	111
Figure 24. Effet des applications multiples des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> de <i>Beauveria bassiana</i> sur l'abondance des adultes d' <i>Anthonomus signatus</i> en fraiseraies.	113
Figure 25. Évaluation des dommages aux fraises associés aux attaques de <i>Lygus lineolaris</i> après applications multiples de <i>Beauveria bassiana</i> en fraiseraies.	114

Figure 26. Évaluation des pertes de rendement en fraises associées aux attaques d' <i>Anthonomus signatus</i> après applications multiples de <i>Beauveria bassiana</i> en fraiseraies.	116
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 1. Hôte et origine géographique des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>	61
Tableau 2. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>	71
Tableau 3. Potentiel insecticide et virulence des isolats <i>INRS-CFL</i> et <i>INRS-IP</i> de <i>Beauveria bassiana</i> contre <i>Lygus lineolaris</i> , <i>Anthonomus signatus</i> et <i>Otiorhynchus ovatus</i>	94
Tableau 4. Amplification par PCR (pb) de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>	97
Tableau 5. Analyse génomique de la petite sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>	98
Tableau 6. Distribution des introns de groupe I présents dans le gène 28S de l'ADN ribosomal des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>	99
Tableau 7. Les tailles (bp) des fragments d'ADN obtenues après digestion de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal des isolats de <i>Beauveria bassiana</i> par les endonucléases de restriction.....	103

Liste des abréviations

A₂₆₀ : densité optique à 260 nm
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomal
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARLA : Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
Ca²⁺ : calcium
CFU : Colony forming units
CL₅₀ : concentration létale tuant 50 % d'une population d'un insecte.
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
HR : humidité relative
kb : kilobase
kDa : kilodalton
M : molaire
mM : millimolaire
Mpb : méga paires de base
NPV : nucléopolyédrovirus
nm : nanomètre
OpMNPV : nucléopolyédrovirus multiple d'*Orgyia pseudotsugata*
pb : paires de bases
PBS : solution saline phosphatée
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
p/v : poids par volume
rpm : rotation par minute
SDS : sodium dodecyl sulfate
TAE : Tris acide acétique EDTA
TL₅₀ : temps nécessaire tuant 50 % d'une population d'un insecte
TMS : temps moyen de survie d'une population d'un insecte
TNE (tampon) : Tris/NaCl/EDTA
UV : ultraviolet
V : volt

Introduction

Le Québec est le premier producteur de fraises au Canada. Plus de 700 producteurs, cultivent près de 2000 ha de fraises avec une production annuelle de près de 9000 t (Urbain et Drouin, 2003). Leur chiffre d'affaires s'élève annuellement à plus de 17 millions de dollars, ce qui place l'industrie de la fraise du Québec en troisième position, après celle de la canneberge et du bleuet (MAPAQ-ISQ, 2005). La récolte est destinée principalement au marché frais, ce qui implique la production de fruits de très haute qualité (Urbain et Drouin, 2003). Étant donné la valeur commerciale considérable de cette culture, le déclasserment des fruits, par toute déformation et toute diminution de la taille, se traduira par une perte économique importante.

La culture de fraises est particulièrement affectée par les attaques de plusieurs insectes nuisibles. Les principaux ravageurs du fraisier sont la punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois), l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* (Say) et le charançon de la racine du fraisier, *Otiorhynchus ovatus* (Linnaeus) (Bostanian et al. 1990). D'autres ravageurs, comme les acariens, peuvent aussi causer des dommages.

La lutte biologique est une solution prometteuse pour assurer une meilleure protection phytosanitaire. De nombreuses expériences ont démontré que l'utilisation d'antagonistes naturels tels que les hyménoptères et les diptères parasitoïdes (Day, 1995) et les prédateurs polyphages (Bostanian et Mailoux, 1994) ne permet pas de contrôler efficacement les populations de la punaise terne.

Tout en préservant l'intégrité environnementale, les micro-organismes peuvent être utilisés en lutte biologique. Parmi ces micro-organismes, se trouve le champignon hyphomycète *Beauveria bassiana* (Balsamo) Veillemin. Ce champignon est reconnu pour les infections qu'il cause chez certains insectes nuisibles (Steinkraus et Tugwell, 1997 ; Snodgrass et Elzen, 1994) et il peut être

considéré un bon candidat pour le développement d'insecticide microbien (Faria et Wraight, 2001 ; McCoy, 1990).

La pathogénicité que l'on définit comme la capacité d'un agent microbien à provoquer une maladie et la virulence correspondant au caractère nocif et violent d'un pathogène sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat de lutte biologique (Lacey, 1997 ; Ferron et al. 1993). La pathogénicité de *B. bassiana* sur la punaise terne a été démontrée pour la première fois par Bidochka et al. (1993). D'autres chercheurs ont identifié certains isolats pathogènes contre la punaise terne en cultures de l'amarante (Leland et McGuire, 2006) et de céleri (Kouassi, 2004). Le champignon a provoqué 90 % de mortalité des adultes en laboratoire, après sept jours suivant l'inoculation. La pathogénicité de *B. bassiana* a été également rapportée pour les hémiptères *L. rugulipennis* (Poppius) (Bajan et Bilewicz-Pawinska, 1971), *Scotinophara coarctata* (Fabricius) (Rombach et al. 1986) et *Blissus leucopterus* (Say) (Krueger et al. 1991). Par contre, il n'existe, à ma connaissance, aucune étude évaluant l'efficacité de *B. bassiana* contre l'anthonome de la fleur et le charançon de la racine du fraisier.

Cette recherche consiste premièrement à étudier la relation existante entre l'entomopathogène *B. bassiana* et les principaux insectes ravageurs du fraisier dans l'optique d'élaborer un programme de lutte biologique efficace et applicable en fraiseraias. Dans un deuxième temps, elle vise à établir des techniques moléculaires permettant l'identification et la différenciation des isolats de *B. bassiana* afin de confirmer leur identité après application sur le terrain. Finalement, cette recherche consiste à démontrer l'efficacité des applications multiples d'une formulation à base de *B. bassiana* pour lutter contre les populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier tout en réalisant un suivi environnemental de la viabilité et de la persistance de l'activité insecticide de conidies en fraiseraias.

Revue bibliographique

1. Culture du fraisier

Le fraisier, *Fragaria x ananassa* Duch., appartient à la famille des rosacées. C'est une plante vivace herbacée, rustique, de 20 à 30 cm de hauteur. Les tiges florales sont dressées. Les feuilles ont trois folioles pétiolées, plus ou moins dentées et parfois velues. Les inflorescences sont en cymes bipares, plus ou moins ramifiées. À chaque étage de ramification, le nombre de fleurs se multiplie en double. L'apparition des fleurs est progressive. Ainsi, chaque plant présente une fleur primaire, deux fleurs secondaires, quatre fleurs tertiaires, etc. La plante émet des stolons qui assurent sa multiplication végétative. Le réceptacle floral demeure vert pendant la croissance et ne devient rouge que vers le mûrissement. Il porte des fruits secs indéhiscentés appelés akènes. Les variétés modernes cultivées pour la production fruitière sont habituellement des croisements entre des espèces comme *Fragaria moschata* (capronier), *F. virginiana* (fraisier de Virginie), *F. vesca* (fraisier des bois) et *F. chiloensis* (fraisier du Chili). L'espèce hybride ainsi formée est désignée par le nom *Fragaria x ananassa* (Colbert, 1989). Le fraisier a fait l'objet de plusieurs développements au niveau des cultivars. Généralement, il y en a trois types : 1) cultivars à production ponctuelle qui déclenchent l'initiation des bourgeons floraux lors de photopériodes courtes ; 2) cultivars à production continue qui produisent généralement deux fois à l'année ; et 3) cultivars à jours neutres, insensibles à la photopériode, qui produisent du printemps à l'automne (Pichette, 1991).

Depuis le développement des premiers cultivars de fraisier à jours neutres au milieu des années 1980, l'intérêt pour cette production ne cesse d'augmenter. Ce type de production permet entre autres de programmer la récolte et ainsi d'offrir aux consommateurs des fraises sur une plus longue période (Pichette, 1991). La production de la fraise à jours neutres s'étend de la mi-juillet au début d'octobre, soit à partir de la fin de la récolte de la fraise conventionnelle aux premières gelées. Le pic de récolte se situe entre la mi-août et la fin août. Sa mise en marché est totalement

différente de la fraise conventionnelle. Durant la saison de production de fraises à jours neutres, plusieurs travaux sont essentiels dont la plantation, la coupe des fleurs et des stolons, le contrôle des mauvaises herbes, le paillage, la récolte et l'arrachage. Certains producteurs maintiennent leur plantation pour une production de trois ans.

Dans le secteur des petits fruits, la fraise est la deuxième production d'importance économique au Québec, après la canneberge et suivie de près par le bleuet, pour une recette monétaire annuelle d'environ 17 millions de dollars (MAPAQ-ISQ, 2005). Les fraises produites au Québec sont presque toutes écoulées, à l'état frais, sur le marché de consommation par le biais de l'autocueillette, la vente à des grossistes ou au marché de détail. Malgré le développement constant de cette production, les producteurs de fraises font face à de nombreux défis afin de cultiver, de façon concurrentielle, des fruits de grande qualité, répondant aux exigences des consommateurs, et ce, dans le contexte d'une agriculture durable.

Sur le plan phytosanitaire, la culture de la fraise comporte un certain nombre de problèmes puisque les plants de fraisiers sont sujets à l'attaque de plusieurs ravageurs (acariens et insectes) et maladies. Les fraisières constituent des agroécosystèmes complexes. Comme indiqué précédemment, elles sont généralement plantées, entretenues et exploitées en un même endroit pour une période de quelques années, ce qui favorise le développement de communautés d'arthropodes nuisibles ou bénéfiques. En général, les fraisières doivent être protégées contre leurs principaux ennemis, par l'application de traitements antiparasitaires. L'arsenal de pesticides, notamment dans le domaine des acaricides et des insecticides, est restreint puisque les petites surfaces en production intéressent peu l'industrie de pesticides. En effet, le marché de la fraise ne justifie pas les coûts importants reliés à l'homologation de nouveaux produits.

Une attaque d'insectes ravageurs peut aboutir à des fraises difformes et à un rendement de faible valeur marchande (Chagnon et al. 1990). Plusieurs ravageurs attaquent le fraisier et s'accaparent ainsi d'une partie importante des efforts de

production. Les ravageurs les plus importants sont ceux qui se nourrissent des boutons floraux, des fleurs et des fruits. Ils provoquent la formation d'un fruit difforme, replié vers l'intérieur ou présentant des pointes multiples ou une forme en éventail (fasciation). D'autres insectes s'attaquent aux feuilles et aux racines du fraisier (Vincent et Bostanian, 2005). Parmi ces insectes, on retrouve la punaise terne, l'anthonome de la fleur du fraisier et le charançon de la racine du fraisier.

2. Principaux insectes ravageurs du fraisier

2.1. Punaise terne

La punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois), est un hémiptère hétérométabole de la famille des miridés. C'est un petit insecte plat d'environ 6 mm de longueur et de couleur jaunâtre à brunâtre (figure 1). Il s'agit d'un insecte multivoltin, puisqu'il compte deux générations complètes et une génération partielle par année (Cermak et Walker, 1992). Les adultes hivernent dans la végétation et le chaume et émergent au printemps. Contrairement à la majorité des espèces de punaises qui passent l'hiver à l'état d'œuf, *L. lineolaris* hiverne au stade adulte (Boivin et Stewart, 1982). Les femelles pondent au début de mai dans les tissus végétaux des graminées, des mauvaises herbes à feuilles larges, telles que le pissenlit et sur les petits fruits. La ponte débute lorsque la température atteint 20°C, et s'échelonne sur 10 à 31 jours. Au cours de cette période, la femelle pond environ 5 œufs par jour (Bostanian et Mailloux, 1994). Les œufs sont introduits dans les tiges, les pétioles ou les nervures principales des feuilles, les boutons floraux, ou insérés parmi les fleurons d'un capitule. Les nymphes émergent une semaine plus tard et ne diffèrent des adultes que par leur taille, l'immaturité sexuelle et l'absence d'ailes, bien que des ébauches alaires soient présentes vers les derniers stades nymphaux, au nombre de cinq.

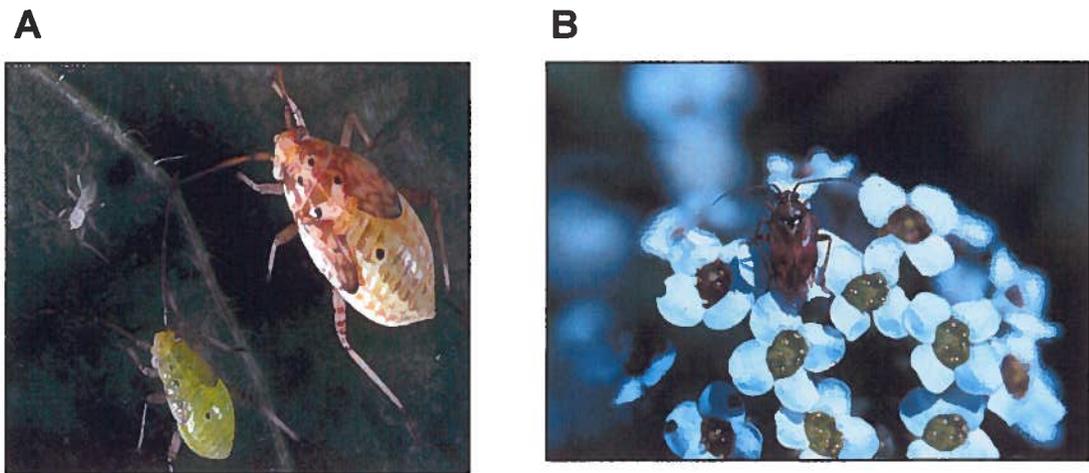


Figure 1. Différents stades de développement de la punaise terne.

A : Nymphe de 1^{er}, 2^e et 4^e stade ; **B** : Adulte de la punaise terne sur l'inflorescence du fraisier (avec la permission de M. Kouassi, 2004).

La punaise terne est l'hémiptère nuisible le plus répandu en Amérique du Nord (Cermak et Walker, 1992). Au Québec, cette punaise attaque plusieurs cultures maraîchères dont le fraisier (Vincent et Bostanian, 2005 ; Handley and Pollard, 1993 ; Chagnon et al. 1990 ; Vincent et al. 1990 ; Sohati, 1989 ; Schaefers 1981). Les adultes et les nymphes se nourrissent des bourgeons floraux et à l'extrémité des pousses du fraisier en suçant la sève, en détruisant les embryons des graines et empêchant la croissance du tissu du fruit sous la graine. La majorité des dégâts provient du fait que la punaise terne est un insecte de type piqueur-suceur qui sécrète des enzymes digestives dans les tissus des plantes-hôtes dont il se nourrit. Ces enzymes provoquent des nécroses et l'apparition de lésions (Grossman, 1989). Ces dégâts se manifestent de deux façons, soit par la chute prématurée des boutons floraux, dans le cas d'attaques aux stades de débourrement et prébouton rose, soit par des malformations plus ou moins prononcées des fruits (figure 2), dans le cas d'attaques du stade bouton rose jusqu'à la chute des pétales. Ces déformations sont variables, allant de la simple piqûre superficielle n'occasionnant pas le déclassement du fruit, à l'apparition de dépressions en forme d'entonnoir et de cicatrices liégeuses affectant l'apparence du fruit (Vincent et Bostanian, 2005).

2.2. Anthonome de la fleur du fraisier

L'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* (Say), est un petit coléoptère holométabole de la famille des curculionidés, probablement indigène de l'Amérique du Nord. L'adulte est brun foncé et mesure environ 3 mm de longueur. La larve est de même longueur que l'adulte et de couleur blanchâtre (figure 3). Le développement des trois stades larvaires se déroule dans le bouton floral.

Au Québec, l'anthonome de la fleur du fraisier est une espèce univoltine qui a une seule génération par année (Mailloux et Bostanian, 1993). Dans le sud du Québec, l'insecte requiert environ deux mois pour passer du stade de l'œuf à celui d'adulte. Après l'accouplement, la femelle pond un œuf parfois deux par tige florale.

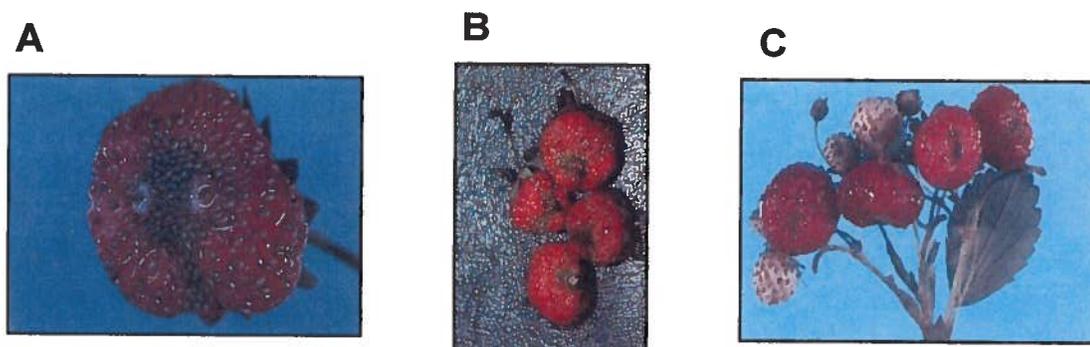


Figure 2. Dommages aux fraises associés au comportement alimentaire de la punaise terne.

A : Agglomération d'akènes à la partie apicale du fruit provoquée par le comportement alimentaire de la punaise terne ; **B :** Boutons durs sur un fruit attaqué par la punaise terne ; **C :** Ensemble de fruits attaqués sur un plant du fraisier (Tiré de : <http://www.gnb.ca/0171/20/0171200010-f.asp>).

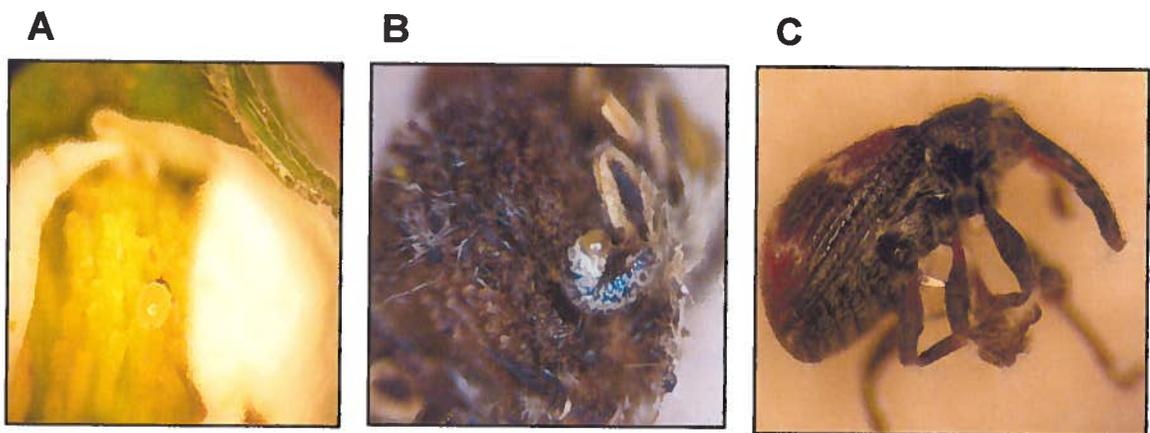


Figure 3. Différents stades de développement de l'anthonome de la fleur du fraisier.

A : Œuf de l'anthonome de la fleur du fraisier dans un bouton floral ; B : Larve dans un bourgeon tombé au sol ; C : Adulte.

La ponte commence à la mi-mai et peut se poursuivre jusqu'à la mi-juin (Mailloux et Bostanian, 1993). La femelle entaille la tige de la fleur quelques centimètres sous le bouton floral, ce qui le fait flétrir et sécher. La larve se développe dans le bouton tombé dans le sol, se transforme en pupa, et les adultes émergent au milieu de l'été. Les adultes qui émergent au début de juillet causent en général peu de dommages aux fruits (Mailloux et Bostanian, 1993). Cette nouvelle génération d'adultes ne se reproduit pas, bien qu'il y ait suffisamment de temps jusqu'à la fin de la saison pour engendrer une deuxième génération d'anthonomes. L'adulte quitte les cultures de fraisiers pour celles des framboisiers quand les fleurs de framboisiers apparaissent. L'anthonome passe l'hiver à l'état adulte dans les débris végétaux accumulés dans les fraisières ou ailleurs.

L'anthonome est devenu un ravageur important du fraisier suite au développement de variétés de fraises qui produisent beaucoup de pollen et de gros fruits, ce qui permet une meilleure survie des larves (Vincent et Bostanian, 2005). L'insecte cause des dégâts aux fleurs et aux boutons floraux (figure 4), ce qui peut réduire la production de fraises entraînant ainsi des pertes économiques. Les déprédations sont habituellement plus graves dans les vieilles fraisières où des populations résidentes se sont implantées.

Les dommages de l'anthonome sont non seulement variables, mais aussi imprévisibles. La perte économique due à l'anthonome de la fleur du fraisier a longtemps été considérée comme importante. En effet, une étude a démontré que les plus graves dommages causés par cet insecte avaient lieu au moment de la pollinisation des fleurs (Khanizadeh et al. 1992). Comme les boutons endommagés ne s'ouvrent pas, les fruits ne se forment pas. Cette perte des bourgeons primaires et secondaires engendrerait des pertes de rendements de 36 à 43 % (Khanizadeh et al. 1992 ; Paradis et Simard, 1979).



Figure 4. Dommages aux bourgeons floraux associés au comportement de ponte de l'anthonome de la fleur du fraisier.

Les femelles coupent le pédoncule des bourgeons floraux après la ponte, ce qui provoque leur dessèchement et leur chute.

2.3. Charançon de la racine du fraisier

Le charançon de la racine du fraisier, *Otiorhynchus ovatus* (Linnaeus), est un coléoptère appartenant à la famille des curculionidés. Il est indigène de l'Amérique du Nord (Bomford et Vernon, 2005 ; Booth et al. 2002 ; Wheeler, 1999). C'est une espèce univoltine (Bruck, 2004 ; Labuschagne, 1999). Le cycle saisonnier se caractérise par deux différentes cohortes d'adultes. L'insecte hiverne aux stades adulte ou larvaire, les adultes hibernant sur les débris du sol et les larves dans le sol. L'adulte est brun foncé et mesure environ 6 mm de longueur. Il possède un proboscis tranchant et les élytres, qui sont soudés, portent des rangées de petites dépressions circulaires. Les adultes se cachent dans les collets des fraisiers et les débris végétaux pendant la journée, et ils se nourrissent surtout la nuit. Les adultes s'alimentent essentiellement du feuillage de la plante-hôte, alors que les larves s'alimentent des racines (Umble et Fisher, 2000). Il n'existe pas de mâles. Ainsi, les femelles se reproduisent par parthénogenèse et les œufs, environ 27 par femelle/semaine, sont pondus dans le sol près des plants (Umble et Fisher, 2002).

Les larves possèdent une tête brune claire ; elles sont blanches, glabres, dépourvues de pattes, et elles mesurent environ 13 mm de long lorsqu'elles sont parvenues à maturité (figure 5). Elles commencent à s'alimenter dès que la température se réchauffe au printemps. L'insecte compte cinq stades larvaires. Il n'y a pas de diapause chez cet insecte. Le développement larvaire se termine à la fin de l'été par la transformation de la larve en puppe et les adultes émergent de la puppe au début de l'automne. Les adultes, incapables de voler, se déplacent sur le sol pour trouver leurs plantes-hôtes.

Le charançon de la racine se nourrit de plusieurs plantes, dont le fraisier, le trèfle et plusieurs graminées (Vincent et Bostanian, 2005). Les symptômes sur les plants infestés deviennent apparents alors que les dommages sont déjà très importants. Les larves causent les dommages les plus étendus. En effet, elles se

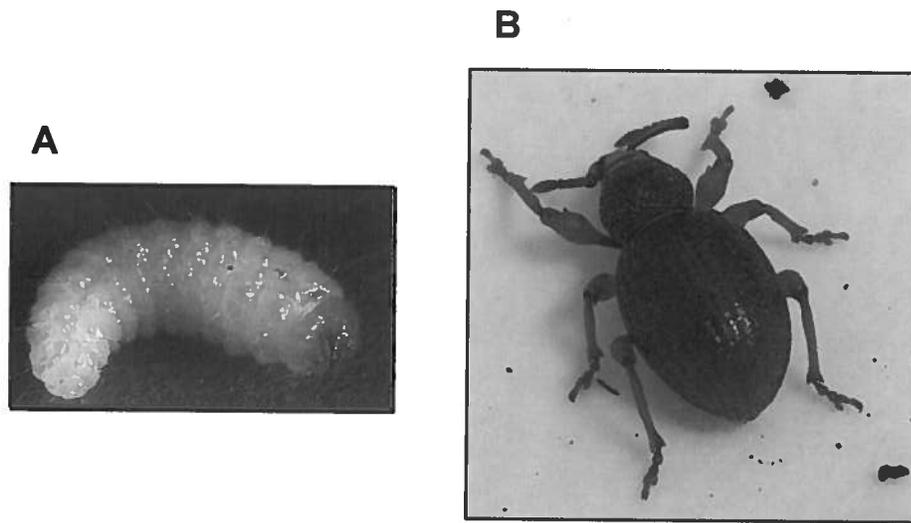


Figure 5. Différents stades de développement du charançon de la racine du fraisier.

A : Larve du charançon de la racine du fraisier ; **B** : Adulte.

nourrissent des racines et du collet de la plante causant un dépérissement des plants (figure 6) qui est souvent confondu avec des dégâts dus à l'hiver. Le système racinaire des plants attaqués s'affaiblit. Les plants se rabougrissent, puis meurent. Si les adultes sont nombreux, ils peuvent ravager le feuillage en se nourrissant, causant ainsi des perforations caractéristiques à la marge des feuilles.

3. Insectes utiles du fraisier

Parmi les arthropodes se développant dans les systèmes agricoles, les ennemis naturels jouent un rôle important dans la dynamique des populations d'insectes ravageurs. Non seulement ils sont souvent responsables du maintien des populations à l'état endémique, ils répondent aussi de diverses façons aux changements de densité des populations. On regroupe dans les ennemis naturels, les parasitoïdes, les pathogènes, les oiseaux et les insectes prédateurs (Richard et Boivin, 1994). Parmi les insectes utiles, il faut rappeler aussi les insectes pollinisateurs, responsables pour environ 36 % de la production en fraises (Chagnon et al. 1989).

Les insectes prédateurs appartiennent à différentes familles. On retrouve les géocorinés, les nabidés, les anthocoridés et les coccinellidés. La coccinelle maculée, *Coleomegilla maculata lengi* (Timberlake) (Coleoptera : Coccinellidae), qui est une espèce endémique de l'Amérique du Nord (Gordon, 1985) bien adaptée aux conditions climatiques du Québec. C'est un insecte holométabole et multivoltin. La coccinelle passe l'hiver au stade adulte dans des sites d'agrégation (figure 7) et redevient active au printemps. La coccinelle maculée est un insecte polyphage et vorace (Hodek et Honek, 1996 ; Cloutier et Cloutier, 1992). Les pucerons constituent sa principale source de nourriture, mais elle se nourrit aussi des œufs et des larves d'autres insectes, dont la punaise terne (Richard et Boivin, 1994). La coccinelle maculée est un insecte que l'on doit maintenir dans un écosystème afin qu'il puisse jouer un rôle de régulateur naturel des populations d'insectes ravageurs.

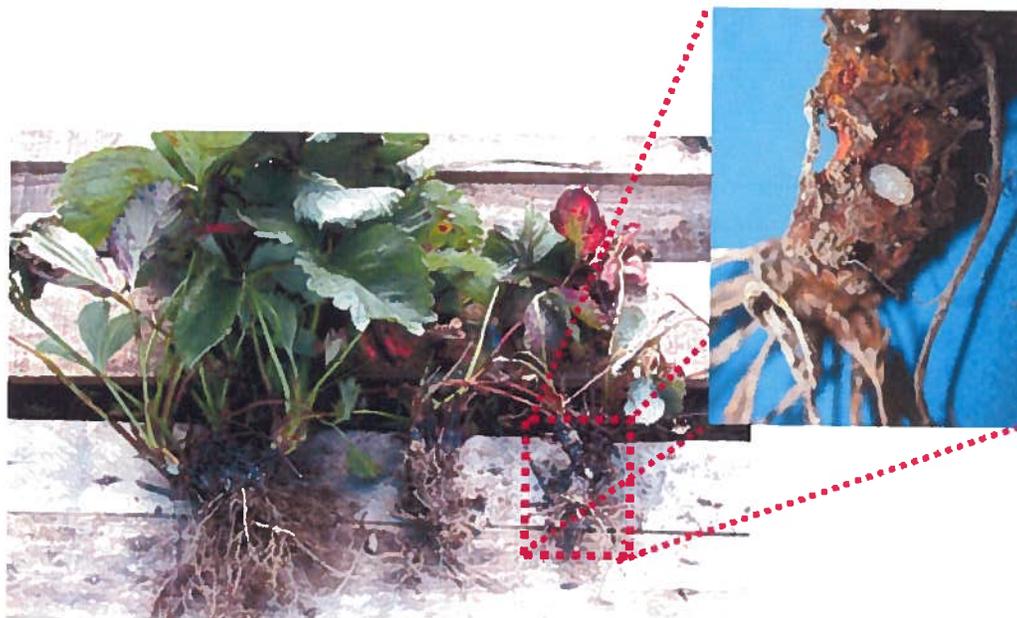


Figure 6. Dommages aux racines associés au comportement alimentaire du charançon de la racine du fraisier.

Les larves se nourrissent des racines et du collet des fraisiers et entraînent un dépérissement complet des plants (Tiré de : http://www.theses.ulaval.ca/2006/23970/23970_2.png).



Figure 7. Site d'agrégation de la coccinelle maculée.

Les adultes de la coccinelle maculée ont un comportement d'agrégation à l'automne. De nombreux individus se regroupent à la base des arbres (Photo de C. Guertin).

4. Méthodes de lutte contre les insectes ravageurs

La lutte chimique constitue actuellement la pratique dominante au Canada, et ce, malgré ses nombreux effets sur l'environnement (insectes bénéfiques, oiseaux, poissons et invertébrés aquatiques) et sur la santé humaine (cancer et déséquilibre neurologique). L'utilisation irrationnelle des pesticides chimiques peut également contribuer au développement de résistances chez les insectes (Wright et Chandler, 1991). D'autres méthodes de lutte contre les insectes ravageurs sont possibles. Ces méthodes se regroupent en quatre grandes catégories : la lutte par amélioration génétique, la lutte physique, la lutte par les pratiques culturales et la lutte biologique.

Le terme "lutte biologique" recouvre différents concepts selon les disciplines impliquées dans la protection des cultures (Ferron, 2000). Généralement, la lutte biologique consiste à utiliser un agent de lutte pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des insectes ravageurs (Vincent et Coderre, 1992). Cet agent peut être un parasitoïde, un insecte prédateur, un pathogène (champignon, bactérie, virus, ou protozoaire) (Jourdeuil et al. 1992).

Les entomophages prédateurs qui, à l'aube du siècle passé, ont contribué à l'essor de la lutte biologique (Caltagirone et Doust, 1989), sont des organismes de choix pour le contrôle de nombreux ravageurs. Cependant, les problèmes liés au cannibalisme, à la prédation intragilde, aux élevages et aux lâchers alimentent encore les recherches dans ce domaine. Les agents microbiens, tels que les champignons entomopathogènes, constituent une autre voie prometteuse pour lutter contre des insectes nuisibles pour lesquels aucun prédateur ou parasitoïde ne réussit à abaisser leurs populations.

Les champignons entomopathogènes, importants dans la régulation naturelle de nombreux insectes ravageurs, n'ont pas connu le même succès ces 20 dernières années que d'autres agents microbiens tels que *Bacillus thuringiensis* ou certains baculovirus, mais leur potentiel insecticide pour lutter contre les acariens et les

insectes dans les habitats naturels a souvent été reconnu. Plusieurs espèces de champignons ont été étudiées afin d'évaluer leur potentiel insecticide pour lutter contre les insectes ravageurs. Seuls quelques-uns d'entre eux ont été utilisés à une échelle industrielle (des genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium* et *Paecilomyces*) (Kamp et Bidochka, 2002).

Plusieurs produits à base de *B. bassiana* ont été employés pour contrôler les populations d'un grand nombre de ravageurs dans la République populaire de la Chine (Feng et al. 1994) et pour contrôler les populations du doryphore de la pomme de terre dans l'ancienne URSS (Ferron et al. 1991). Le champignon *Metarhizium anisopliae* est utilisé commercialement au Brésil pour contrôler les populations d'aphrophores dans les cultures de la canne à sucre (Wraight et Roberts, 1987). Les champignons *Paecilomyces fumosoroseus* et *Verticillium lecanii* sont aussi produits commercialement et utilisés pour contrôler les populations des mouches blanches et des aphidés dans des serres en Europe et aux États-Unis (Copping, 2001). Malheureusement, il n'y a pas encore de champignons entomopathogènes homologués au Canada pour lutter contre les insectes ravageurs.

5. Approches de lutte microbienne

Différentes stratégies de lutte microbienne par les agents entomopathogènes sont proposées. Il s'agit de la lutte biologique classique, le lâcher inoculatif, les traitements inondatifs et la conservation. La lutte biologique classique consiste à introduire un agent entomopathogène dans un nouvel écosystème avec l'intention qu'il s'y établisse pour supprimer à long terme l'insecte ciblé. Cette stratégie est souvent employée pour supprimer des ravageurs d'origine exotique, c'est-à-dire ceux ayant été introduits sans leurs ennemis naturels. Par exemple, le champignon entomopathogène *Entomophaga maimaiga* a été introduit dans des forêts caducifoliées pour la décimation de la spongieuse *Lymantria dispar* L., un

lépidoptère ravageur qui a été accidentellement introduit en Amérique du Nord (Pell et al. 2001).

Le lâcher inoculatif d'un agent microbien vise à maintenir un insecte ravageur à un niveau de population suffisamment bas pendant toute la durée d'une culture. L'agent utilisé doit être capable de persister dans le milieu pendant quelques générations successives et avoir une action efficace sur le ravageur. Cette approche est souvent utilisée en milieu forestier, par exemple l'utilisation d'un baculovirus (OpMNPV) pour le contrôle des populations de la chenille à houppes du sapin Douglas, *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) (Hunter-Fujita et al. 1998).

Les traitements inondatifs, qui consistent à lâcher de grandes quantités d'agents de lutte biologique, sont les plus fréquemment utilisés. Pour cette stratégie, l'agent entomopathogène est appliqué à une population d'un ravageur ayant dépassé son seuil économique. Cette stratégie exige un agent à action relativement rapide, qualité assez rare chez bon nombre de pathogènes. Cette approche a été employée le plus souvent dans le milieu agricole. Un exemple ayant connu le meilleur succès comme agent de contrôle inondatif dans des applications à grande échelle est le NPV, pour contrôler les populations de la chenille du pois noir, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) sur plusieurs hectares de fèves de soja au Brésil. Ce virus a été produit à un coût moins élevé que les insecticides chimiques et offrait un contrôle d'une efficacité comparable à ces derniers (Moscardi, 1999).

Finalement, la stratégie de conservation consiste à conserver les ennemis naturels déjà présents sur un site. Par exemple, la conservation du champignon entomopathogène *Neozygites fresenii* chez le puceron du coton aux États-Unis en est un exemple récent (Steinkraus et al. 2002). Le champignon cause souvent des épizooties chez le puceron du coton. Cependant, une intervention par des insecticides chimiques était souvent mise en place avant que l'épizootie puisse s'établir. À l'aide de diagnostics attentifs d'aphidés pré-épizootiques, les épizooties peuvent être prévues, réduisant ainsi la nécessité d'appliquer des insecticides

chimiques et appuyant la préservation des champignons et d'autres ennemis naturels des aphidés (Pell et al. 2001).

6. Méthodes de lutte contre les insectes ravageurs du fraisier

6.1. Punaise terne

La punaise terne est le troisième insecte en importance, en ce qui concerne l'utilisation d'insecticides chimiques au Québec, avec 10,6 % de la matière active utilisée, n'étant précédé que par le doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (18,9 %) et la mouche de la pomme, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (10,7 %) (Chagnon et al. 1990). Les populations de *L. lineolaris* ont développé une résistance à plusieurs insecticides chimiques (Steinkraus et Tugwell, 1997 ; Snodgrass, 1996 ; Snodgrass et Elzen, 1994 ; Cleveland, 1985 ; Cleveland et Furr, 1979). Il est donc essentiel que des alternatives aux stratégies de gestion phytosanitaire actuellement utilisées soient développées afin de remplacer ces composés et ainsi réduire les risques environnementaux. Les ennemis naturels de *L. lineolaris*, tels que les parasitoïdes hyménoptères et diptères (Day 1995 ; Day et al. 1990) et les prédateurs polyphages (Bostanian et Mailoux, 1994) semblent n'offrir aucune possibilité intéressante comme agents de lutte biologique.

L'entomopathogène *B. bassiana* est actuellement étudié pour lutter contre les populations de la punaise terne (Leland et McGuire, 2006 ; Leland et al. 2005 ; Liu et al. 2003 ; Kouassi et al. 2003a ; Steinkraus et Tugwell, 1997 ; Snodgrass et Elzen, 1994 ; Bidochka et al. 1993). Le choix de l'isolat fongique dépend essentiellement de sa pathogénicité et de sa virulence contre l'hôte (Tanada et Kaya, 1993). En laboratoire, ce mycète peut causer 90 % de mortalité chez les adultes de *L. lineolaris* après 7 jours (Kouassi et al. 2003a). La pathogénicité de *B. bassiana* a été également rapportée chez d'autres espèces hétéroptères telles que *L. rugulipennis* (Poppius) (Bajan et Bilewicz-Pawinska, 1971), *Scotinophara coarctata* (Fabricius) (Rombach et al. 1986) et *Blissus leucopterus* (Say) (Krueger et al. 1991). Par contre, l'application

sur le terrain de *B. bassiana* pour lutter contre les populations de *L. lineolaris* a donné des résultats variables (Kouassi et al. 2003a ; Steinkraus et Tugwell, 1997 ; Kovach, 1996 ; Snodgrass et Elzen, 1994).

6.2. Anthonome de la fleur du fraisier

Plusieurs insecticides chimiques sont utilisés pour lutter contre les populations d'*A. signatus* au Québec (Chagnon et al. 1990). Les produits homologués pour la suppression de l'anthonome de la fleur du fraisier comprennent le carbofuran, la lambda-cyhalothrine, le chlorpyrifos, la cyperméthrine et le méthoxychlore (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2005). Par exemple, le traitement insecticide avec le chlorpyrifos provoque une diminution du nombre de charançons de la génération actuelle et conséquemment, une réduction de la quantité des boutons floraux coupés par ce coléoptère en fraiseraies à la saison suivante. Malheureusement, cette stratégie de lutte n'est pas totalement efficace.

À ce jour, il n'y a pas eu d'études évaluant l'efficacité de *B. bassiana* contre *A. signatus*. Cependant, quelques isolats de ce mycète sont pathogènes contre certaines espèces appartenant à la famille des curculionidés tels que le charançon de la jacinthe d'eau, *Neochetina bruchi* (Hustache) (Chikwenhere et Vestergaard, 2001), le charançon de maïs, *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Adane et al. 1996) et le charançon de la racine d'oranger, *Diaprepes abbreviatus* L. (Quintela et McCoy, 1998).

6.3. Charançon de la racine du fraisier

La lutte chimique contre le charançon de la racine du fraisier vise l'adulte, qui doit être éliminé avant la ponte. Contrairement aux pulvérisations visant les larves, celles qui visent les adultes sont foliaires. Elles ne devraient être appliquées que dans les endroits où l'on constate des entailles fraîches sur les feuilles. Les produits homologués comprennent la lambda-cyhalothrine, la cyperméthrine et le carbofuran

(Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2005). Malheureusement, le synchronisme entre la récolte des fraises et la sortie des adultes d'*O. ovatus* rend l'emploi des insecticides chimiques problématique.

Comme c'est le cas pour la plupart des insectes ravageurs vivants dans le sol, il existe peu d'insecticides homologués pour la lutte contre les larves. Selon Bruck (2004), les méthodes de répression les plus prometteuses semblent être les agents de lutte biologique comme les champignons. Quelques travaux ont été réalisés pour démontrer la susceptibilité de certaines espèces d'*Otiiorhynchus* aux champignons entomopathogènes. Les larves d'*O. ovatus* et d'*O. dubius* (Ström) étaient susceptibles à une préparation à base de *B. bassiana* (Vainio et Hokkanen, 1993). Moorhouse et al. (1993) ont démontré que certains isolats de *M. anisopliae* étaient pathogènes aux larves du charançon de la vigne, *O. sulcatus* (Fabricius). Cependant, des isolats de *M. flavoviride* et *M. album* n'avaient aucun effet sur les larves de ce charançon. Des isolats de *B. bassiana* étaient pathogènes aux adultes et aux larves du charançon de la racine, *Sitona lepidus* (Gyllenhal) et causent des mortalités élevées 15 jours suivant l'inoculation (Willoughby et al. 1998). Cependant, il n'existe aucune étude détaillée qui démontre l'efficacité de *B. bassiana* contre le charançon de la racine du fraisier.

7. Incidence de champignons entomopathogènes sur l'entomofaune utile

Il est reconnu que les hyphomycètes entomopathogènes peuvent avoir un effet néfaste sur certains insectes bénéfiques. Cependant, les impacts actuels des applications fongiques au terrain sur les populations des invertébrés non ciblés peuvent être substantiellement moins significatifs que ceux prédits suite à des études de laboratoire. Par exemple, la souche commercialisée GHA de *B. bassiana* est virulente contre le mégachile de la luzerne, *Megachile rotundata* (Fabricius), quand elle a été appliquée à un grand dosage (Goerzen et al. 1990), mais les taux de mortalité dans les expériences sur le terrain sont inférieurs à 4 % (Goettel et Johnson, 1994). À partir des expériences réalisées en champ de coton, Jaronski et al. (1998)

ont signalé un effet négatif de cette même souche sur les populations d'insectes prédateurs du genre *Orius* et *Nabis*, mais pas d'impact contre les reduviidés, les chrysopidés et les insectes du genre *Geocoris*. Il est très important de porter une attention particulière à l'entomofaune utile avant d'évaluer l'impact des applications de *B. bassiana* au terrain sur les populations d'insectes ravageurs.

8. Champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filaments (hyphes) constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées ou asexuées. La sous-division des deutéromycètes regroupe les ascomycètes et les basidiomycètes qui sont des champignons filamenteux, à hyphes septés, se reproduisant de façon végétative dont on ne connaît pas leur forme de reproduction sexuée (champignons imparfaits) (Humber, 1997 ; Tzean et al. 1997).

Chez les champignons hyphomycètes, environ 500 espèces (Starnes et al. 1993) parmi lesquels, les genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Verticillium* et *Paecilomyces* sont les plus utilisés en lutte biologique (Kamp et Bidochka, 2002). Chacun de ces genres est défini par ses caractéristiques de conidiogénèse. La couleur des spores est une première indication sur l'identité du champignon. Sur milieu gélosé, les genres *Metarhizium*, *Nomuraea* et *Penicillium* produisent des spores vertes. Les spores d'*Aspergillus* sont normalement jaunes ou brunâtres, celles de *Beauveria* sont blanches. La détermination de l'espèce se fait en examinant la forme des spores et des conidiophores (Campos et al. 2005). Dans le genre *Beauveria*, les spores se forment une à une le long de cellules sporogènes en forme de zigzag. Quelques genres, comme *Hirsutella*, *Fusarium* et *Verticillium*, produisent des spores couvertes d'une substance visqueuse. On peut aussi distinguer

les espèces fongiques d'un même genre. À titre d'exemple, *B. bassiana* et *B. brongniartii* peuvent être reconnues à la forme de leurs spores ; celles de *B. bassiana* sont globulaires et celles de *B. brongniartii* sont ovales. De plus, les conidiophores de la première espèce sont arrangés en groupes denses, tandis que ceux de la seconde sont plus épars.

8.1. *Beauveria bassiana*

Le microchampignon *B. bassiana* est un hyphomycète naturellement présent dans l'environnement. Il est d'origine terrigène et est saprophyte ubiquitaire et pathogène pour de nombreux ordres d'insectes. Le mycète *B. bassiana* se multiplie par reproduction asexuée et il produit des spores de couleur blanchâtre à jaunâtre qui sont soutenues par de longs filaments nommés hyphes (figure 8). Ces derniers sont transparents et septaux avec un diamètre de 2,5 à 25 μm . Les conidies sont produites sur des épis courts appelés conidiophores donnant aux cellules conidiogènes un aspect épineux. En condition aérobie, le champignon produit des conidiospores de forme sphérique (1-4 μm de diamètre). Cependant, le champignon a la capacité de se développer en condition anaérobie où il produit des blastospores de forme ovale (2-3 μm de diamètre). Les blastospores sont aussi infectieux que les conidiospores (Lipa, 1975 ; Weiser, 1972).

8.1.1. Mode d'action

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif. Compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotiques, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée. Quoiqu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels.



Figure 8. Vue microscopique des spores et des hyphes du champignon *Beauveria bassiana*.

Les spores constituent l'unité infectieuse, alors que les hyphes sont présentés sous forme de filaments. La photo a été prise sous microscopie photonique à un grossissement de x 400.

La cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La procuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule.

Contrairement aux autres microorganismes (virus, bactéries, nématodes, protozoaires) où l'infection de l'hôte découle de leur ingestion obligatoire, les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Clarkson et Charnley 1996). Au contact de la cuticule de l'insecte, la spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Le champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les hyphomycètes. Le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogenèse (Ferron et al. 1993). Le mode d'infection de *B. bassiana* se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (figure 9). Les processus de la germination, de la croissance intra-tégumentaires, et du développement à l'intérieur de l'hémocoel jouent un rôle très particulier. Ils sont influencés par des facteurs génétiques, physiologiques et écologiques.

Phase d'adhésion. L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes avec l'aide d'agents tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte. L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte-hôte (Tanada et Kaya, 1993 ; Khachatourians, 1991), mais les spores peuvent aussi entrer par le système respiratoire (Clark et al. 1968), le tube

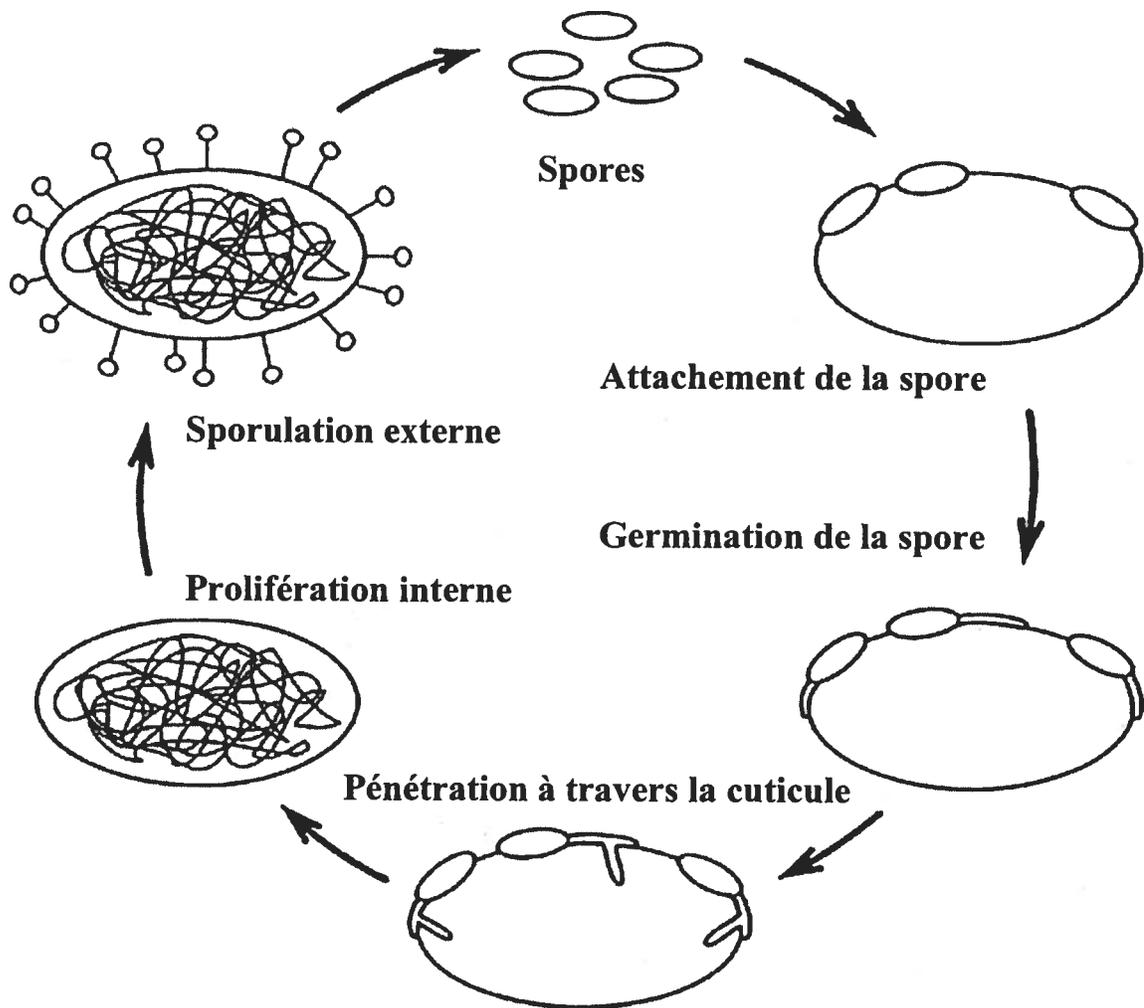


Figure 9. Schéma du cycle biologique de *Beauveria bassiana*.

Le mode d'infection de *B. bassiana* se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination.

alimentaire (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher et al. 1992).

Les spores de *B. bassiana* possèdent des propriétés hydrophobiques grâce à la présence des protéines riches en cystéine appelées hydrophobines (Inglis et al. 2001). L'attachement des spores à la cuticule est donc assujéti aux forces hydrophobiques non spécifiques et aux charges électrostatiques (Boucias et al. 1998 ; Butt, 1990). Cependant, des systèmes de reconnaissance spécifiques, dont des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, ont été identifiés sur la surface de la spore et peuvent être impliqués dans l'attachement de celle-ci (Napolitano et Juárez, 1997 ; Boucias et al. 1991). Par exemple, Gula et al. (1984) ont démontré que les hémagglutinines de la surface des spores de *B. bassiana* sont inhibées par différents sucres haptènes (ex. glucose, glucosamine et N-acétyl-glucosamine). Ainsi, l'incubation des spores avec ces sucres réduit leur affinité à l'insecte. Une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes exocellulaires libérées par ces dernières (Boucias et al. 1991).

Phase de germination. La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 ; Butt et al. 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Ferron et al. 1993 ; Magelhaes et al. 1981).

La germination de *B. bassiana in vitro* se produit en réponse aux sources de carbone (ex. glucose, glucosamine, chitine et amidon) et/ou d'azote (St Leger et al.

1986a, 1986b). Cependant, les acides gras et les lipides situés au niveau de l'épicuticule peuvent aussi influencer la germination de spores (Lecuona et al. 1997). La germination dépend de la tolérance aux composés potentiellement toxiques au niveau de l'épicuticule (ex. acides gras à chaîne courte, phénols) (St Leger et al. 1990) et de l'antagonisme de la flore saprophyte sur la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

Phase de pénétration. La pénétration de *B. bassiana* dans l'hôte s'effectue généralement à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion. En présence d'un niveau élevé d'azote et de carbone, le tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphé (St Leger et al. 1992). Comme plusieurs autres champignons filamenteux, la dureté de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments disponibles influencent la différenciation d'une structure infectieuse ou appressorium. Le développement de l'appressorium implique l'activation de l'AMPc et la libération de Ca^{2+} comme signaux moléculaires intracellulaires (St Leger et al. 1990).

La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel et al. 1989). Précisément, l'hyphé fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek et St Leger, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley et St Leger, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos et al. 2005 ; St Leger, 1993). La croissance de *B. bassiana* dans un milieu liquide contenant des cuticules broyées provoque la sécrétion séquentielle d'estérasés et d'enzymes protéolytiques (endoprotéase, aminoprotéase et carboxypeptidase) dans les premières 24 heures d'inoculation, suivi par de la N-acetylglucosaminidase et finalement des chitinases et lipases après 3 à 5 jours. L'ordre d'apparition des

enzymes est supporté par la séquence des constituants de la cuticule solubilisés dans le milieu de culture. La chitinase est une enzyme inductible et dans la cuticule, la chitine est masquée par les protéines ; donc l'apparence retardée de la chitinase est présumée être un résultat de l'induction par la chitine après la dégradation des protéines de la cuticule (St Leger et al. 1986a, b, c). La protéine majeure produite durant le développement d'appressoria de *B. bassiana in vitro* est la protéase analogue de la subtilisine, PR1 (Campos et al. 2005). Cette enzyme est produite pendant la formation de l'appressoria et qui a une activité contre plusieurs protéines (caséine, élastine, collagène) et la cuticule de l'insecte (St Leger et al. 1987).

L'utilisation de *B. bassiana* nécessite une connaissance approfondie des mécanismes de pathogenèse et, en particulier, les événements biochimiques et moléculaires entourant l'invasion de la cuticule, la croissance dans l'hémocoèle et la toxicité chez l'hôte. La pénétration du germe infectieux dans la cuticule de l'insecte s'accompagne d'une attraction immédiate d'hémocytes autour de l'infection et d'un dépôt brun noirâtre de mélanines le long des sites de perforation. Cette réaction de défense fait suite au contact non spécifique de la pro-phénoloxydase avec une protéine de la paroi fongique, probablement une sérine protéase. En plus, les β 1-3 glycanes pariétaux transforment cette enzyme en phénoloxydase active (Soderhall, 1981) qui, en adhérant avec la paroi, agirait comme une opsonine. Ce phénomène est important, puisque la mélanine ou l'un de ses précurseurs, le 5-6 dihydroxyindol, ont des propriétés fongistatiques (Soderhall et Ajaxon, 1982) et inhibent les chitinases et les protéases microbiennes.

Phase de dissémination. Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte-hôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocoèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace

des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à très faibles concentrations. Cependant, on trouve le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) à fortes concentrations (4 à 20 mg/ml) (Schopf et Nussbaumer, 1996). L'utilisation du tréhalose par les champignons entomopathogènes dépend de la capacité du champignon à hydrolyser le tréhalose à l'extérieur de la cellule en deux molécules de glucose ou de l'assimiler directement. L'encapsulation ne protège l'hôte que contre des pathogènes peu virulents. Dans le cas de pathogènes virulents, l'insecte ne parvient pas à former de granulomes typiques, ou bien le pathogène continue de croître malgré son encapsulation qu'il outrepassera (Hou et Chang, 1985).

Le champignon *B. bassiana* sécrète des métabolites toxiques non-enzymatiques qui ont des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides. Ces métabolites incluent la beauvericine, la bassianolide, la cyclosporine, la beauverolide, l'isarolide et l'oosporeine, lesquelles peuvent accélérer le processus infectieux du champignon et affaiblir le système immunitaire de l'hôte (Hajeck et St-Leger, 1994). De plus, elles permettent aussi au pathogène de surmonter la compétition des bactéries intestinales (Boucias et Pendland, 1998). L'insecte infecté est tué par asphyxie ou inanition suite à une combinaison d'actions telle la déplétion des nutriments, l'invasion des organes et la toxicose (Boucias et Pendland, 1998). Le mycélium se forme par la suite dans l'intestin et les tubes de Malpighi en absorbant tous les éléments nutritifs, déshydratant l'insecte et le momifiant (Cloutier et Cloutier, 1992). Suite à la multiplication du champignon, la cavité entière du corps de l'insecte est remplie d'une masse fongique. Quand les conditions sont favorables, le mycélium sort de l'insecte par les parties plus molles du corps de l'hôte. Il produit un feutrage mycélien blanc cotonneux appelé la muscardine blanche (Weizer, 1972). Les hyphes externes produisent les conidies qui vont être libérées dans l'environnement permettant la reprise du cycle vital du champignon.

Les épizooties des champignons entomopathogènes peuvent avoir lieu chez les populations d'insectes en champs et elles peuvent être importantes pour la régulation naturelle des populations d'insectes ravageurs (Inglis et al. 2001). Elles résultent d'un complexe d'interactions entre l'hôte, le pathogène et l'environnement en fonction du temps. Le phénomène d'épizooties n'est cependant pas bien connu pour la plupart des espèces fongiques.

8.2. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte

Les insectes fournissent un exemple particulier d'une immunité naturelle, dite non spécifique, qui n'implique pas les lymphocytes et les anticorps comme chez les mammifères (Fugita, 2002 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Afin d'empêcher l'invasion par les agents pathogènes, les insectes ont développé, au cours de leur évolution, différents mécanismes de défense. D'ailleurs, la colonisation de l'hémocoel est strictement dépendante de l'aptitude de l'agent infectieux à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte (Ferron et al. 1993). L'arsenal défensif des insectes est constitué des barrières structurelles passives comme la cuticule. Le tégument chitineux de l'insecte constitue donc une barrière primaire efficace contre l'invasion par la majorité des micro-organismes. En absence de blessure, la principale voie d'infection des insectes par les bactéries, les virus et les parasites, est le tube alimentaire. Cependant, comme marqué précédemment, les champignons entomopathogènes ont l'habileté de pénétrer à travers la cuticule pour établir l'infection.

En plus des barrières passives, il existe une cascade de réponses actives lorsque les pathogènes ont atteint l'hémocoel de l'insecte (Hoffmann et Reichhart, 2002). Ces réponses actives incluent la mélanisation, les réactions cellulaires (ex. phagocytose, encapsulation), les réactions humorales (ex. phénoloxidase, lectines) et la production des inhibiteurs de protéases (Gillespie et al. 2000). Les antigènes microbiens sont reconnus par le système immunitaire naturel de l'insecte grâce à des

unités répétitives constituées de polysaccharides trouvés dans les glycoprotéines de la surface microbienne. Parmi ces unités, on retrouve les lipopolysaccharides (LPS) associés aux bactéries Gram négatives, les peptidoglycanes associés aux bactéries Gram positives, les glycanes riches en mannose associés aux levures et les lipophosphoglycanes (LPG) associés aux parasites (Pace et Baum, 2004). D'après Fugita (2002), ces unités répétitives de saccharides sont reconnues par des récepteurs de reconnaissance de formes (PRR).

La reconnaissance des saccharides microbiens par les PRR des insectes induit la libération de peptides antimicrobiens (AMP) qui tuent directement les pathogènes (Hoffmann et Reichhart, 2002). Les AMP sont des molécules cationiques d'environ 10 kDa. Ils sont classés en trois groupes : (1) les peptides linéaires dépourvus de cystine ; (2) les peptides riches en proline et en glycine, et (3) les peptides riches en cystéine (Dimarcq et al. 1998). Chaque AMP a une activité antimicrobienne spécifique. À titre d'exemple, la drosomycine et la metchnikowine ont exclusivement des propriétés antifongiques (Bulet et al. 1999), alors que la défensine, la drosocine, la diptéricine et la cécropine affectent la croissance bactérienne (Boulangier et al. 2001). Alternativement, les pathogènes peuvent aussi être phagocytés par les hémocytes suite à la reconnaissance de certains antigènes.

9. Caractérisation biochimique et génétique des isolats de *B. bassiana*

Les méthodes classiques d'identification des espèces de champignons entomopathogènes sont basées sur la morphologie, l'ontogenèse, la pigmentation des spores et les propriétés immunologiques (Destefano et al. 2004). En pratique, la procédure la plus utilisée est la croissance d'isolats sur un milieu de culture approprié, ce qui permet de reconnaître les traits caractéristiques de ces isolats qui sont génétiquement stables et peu influencés par les changements environnementaux (Verscheure et al. 2002). Cependant, dans certains cas, ces critères sont délicats à utiliser et requièrent une expérience particulièrement approfondie. Depuis quelques

années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des organismes selon leurs caractéristiques biochimiques et / ou génétiques.

Des analyses enzymatiques ont été réalisées pour démontrer le polymorphisme entre les genres *Beauveria* et *Tolyocladium*. Un niveau d'hétérogénéité a été observé entre différents isolats de ces deux genres et les isolats de *Beauveria* testés possèdent une empreinte biochimique permettant de les regrouper par affinité et de les séparer du genre *Tolyocladium* (Todorova, 1998). Le polymorphisme entre plusieurs isolats de *B. bassiana* a été démontré en se basant sur les exigences nutritionnelles (utilisation de différents hydrates de carbone) (Todorova, 1998), la production d'enzymes extracellulaires (chymoélastases, protéases, etc.) impliquées dans la pénétration de *B. bassiana* à travers la cuticule de l'insecte-hôte (Joshi et al. 1995) et la comparaison des profils protéiques (Gorinstein et al. 1996). Les marqueurs protéiques les plus communément utilisés sont les isoenzymes. Ce sont des protéines correspondant aux différentes formes moléculaires d'une enzyme présentant une même activité catalytique vis-à-vis un substrat, mais qui diffèrent par leur mobilité électrophorétique (Varela et Morales 1996 ; St-Leger et al. 1992). L'utilisation des marqueurs protéiques est très limitée, car les gènes codant pour les protéines ne représentent que 1 % du génome et que leur synthèse est souvent liée à un stade particulier du développement des organes ou à l'environnement auquel sont soumis les individus (Powell, 1983).

Il existe plusieurs techniques permettant de mettre en lumière les polymorphismes des séquences nucléotidiques entre les isolats d'un champignon entomopathogène (Liu, 1998). Celle qui reste de loin la plus efficace est le séquençage direct des fragments homologues d'un ou de plusieurs locus ciblés. Après séquençage, il est possible d'identifier des régions polymorphes par simple alignement des séquences obtenues. Par ailleurs, en dépit du progrès de l'automatisation et de son utilisation courante en génétique humaine, cette technique

demeure très onéreuse et ne constitue pas une méthode de routine dans d'autres secteurs, notamment lorsqu'on souhaite analyser un grand nombre d'isolats.

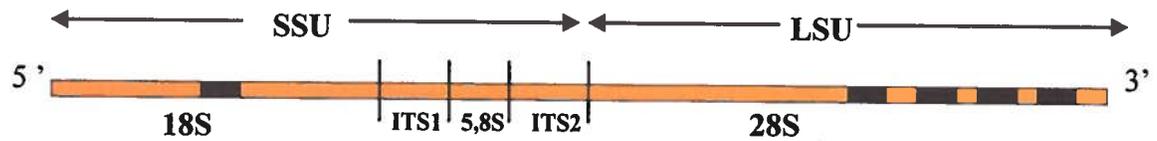
Le développement d'outils moléculaires pour la caractérisation des champignons devient intéressant pour mesurer le niveau de variabilité génétique du pathogène et permettre une analyse de la structure génétique des populations. En outre, ces outils pourraient permettre une identification rapide des sources de virulence. La virulence d'un pathogène varie en fonction de l'insecte hôte. Cette variation est due à l'intervention de plusieurs gènes de virulence qui diffèrent d'un isolat à l'autre. Les outils moléculaires permettent d'évaluer les polymorphismes directement au niveau des séquences d'ADN ou indirectement au niveau des produits de gènes.

Les isolats de *B. bassiana* sont enregistrés selon leurs origines géographiques et leurs hôtes spécifiques, mais ils ne sont pas encore caractérisés génétiquement. La connaissance de la structure génétique des isolats de *B. bassiana* s'avère donc d'un grand avantage et pourrait contribuer à l'élaboration de stratégies de lutte plus efficaces contre les ravageurs ciblés. Grâce à l'apport des techniques de biologie moléculaire, des études sont entreprises dans cette optique. Ces recherches visent à identifier les marqueurs moléculaires pouvant aider à différencier aisément les différents isolats de cet agent entomopathogène.

La PCR et l'analyse des séquences d'ADN sont utilisées intensivement comme outils de détection, d'identification et d'analyse phylogénétique de plusieurs espèces fongiques (Destefano et al. 2004 ; Ownley et al. 2004 ; Chew et al. 1997 ; Rakotonirainy et al. 1991). Dans le cas de *B. bassiana*, les analyses phylogénétiques sont basées sur l'étude d'un gène (locus) (Rakotonirainy et al. 1991), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.) (Nikoh et Fukatsu, 2001), de plusieurs gènes (multiloci) (Viaud et al. 1996) ou encore de l'ADN total (Castrillo et al. 2003).

Le séquençage direct des loci est donc souvent utilisé en dernier recours pour confirmer les polymorphismes révélés par d'autres méthodes, non exhaustives et quantitativement plus avantageuses. Ces techniques sont basées sur la détection des différences, soit des sites de restriction des enzymes, soit de conformations des molécules d'ADN simple brin, soit de stabilité des molécules d'ADN double brin, soit de sites d'hybridation des amorces arbitraires ou encore du nombre des séquences répétées présentes dans une région donnée du génome. Les recherches ont visé au développement de techniques de PCR-RFLP (polymorphisme de taille des fragments de restriction) appelée encore CAPS (polymorphisme de restriction des produits d'amplification) et RAPD (amplification de l'ADN avec des amorces aléatoires) pour une appréciation de la variabilité génétique et donc le classement des isolats d'un même pathogène selon des relations phylogénétiques. L'étude de la phylogénie des isolats par une analyse moléculaire des séquences de l'ADN génomique s'avère une solution très intéressante pour leur identification.

Le génome de *B. bassiana* est constitué d'ADN bicaténaire. Il est composé d'un nombre minimum de chromosomes qui est de 7 ou 8 selon les isolats. La taille de ce génome varie de 34 à 44 Mpb (Viaud et al. 1996). La variation de la taille et du nombre de chromosomes indique un polymorphisme parmi les isolats de ce champignon. Le génome de *B. bassiana* a été partiellement séquencé. L'ADN ribosomal est un marqueur moléculaire important largement utilisé pour l'identification et la différenciation des espèces (Destefano et al. 2004). Ce dernier est présent en copies multiples dans le génome dont chaque unité comporte des régions codantes pour l'ARNr appelées les gènes 18S, 5,8S et 28S et deux espaceurs internes transcrits nommés ITS1 et ITS2 (figure 10). Ces derniers sont des régions non-codantes pour l'ARNr contenant des séquences nucléotidiques s'intercalant entre les gènes 18S et 5,8S (ITS1) et entre les gènes 5,8S et 28S (ITS2). Chaque unité de l'ADNr est séparée par un espaceur intergénique (IGS). L'unité de l'ADNr présente des variations au niveau des séquences nucléotidiques permettant son utilisation dans



SSU (petite sous-unité)

- gènes 18S et 5,8S de l'ADNr
- régions ITS (espaceur interne transcrit)
- intron classe I type 2 ; gène 18S

LSU (grande sous-unité)

- gène 28S de l'ADNr
- intron classe I type 1, 2 et 3 ; extrémité 3' du gène 28S

Figure 10. Organisation de la structure de l'ADN ribosomal de *Beauveria bassiana*.

Les rectangles noirs indiquent les positions de certains introns présents dans l'ADNr de certains isolats de *B. bassiana*.

les études systématiques à différents niveaux taxonomiques (Fouly et al. 1997). Il a été démontré que l'ADNr contient des régions variables et conservées. Par exemple, les régions 18S et 28S de l'ADNr sont les sous-unités les plus conservées et elles peuvent être utilisées pour différencier les genres et les espèces, tandis que les régions ITS et IGS ont accumulé beaucoup de variabilité et elles peuvent être utilisées pour différencier les espèces ou même les isolats de la même espèce (Destefano et al. 2004).

Des recherches ont été réalisées afin de mettre en évidence les variations génétiques entre les isolats de *B. bassiana*. Par exemple, Pfeifer et Khachatourians (1993) et Viaud et al. (1996) ont montré des profils électrophorétiques différents entre différents isolats. Berretta et al. (1998), Castrillo et Brooks (1998), Glare et Inwood (1998) et Urtz et Rice (1997) ont comparé des séquences nucléotidiques de l'ADNr de différents isolats par la technique RAPD. Enfin, Coates et al. (2002), Maurer et al. (1997) et Pfeifer et al. (1993) ont comparé des séquences nucléotidiques de l'ADNr par la technique PCR-RFLP.

D'autres chercheurs ont démontré que les variations au niveau de microsatellites (séquences répétitives de 2 à 5 paires de bases réparties de manière aléatoire dans le génome) et minisatellites (séquences répétitives d'environ 20 paires de bases) peuvent être utilisées pour l'identification des isolats (Coates et al. 2002 ; Enkerli et al. 2001). Par exemple, une étude comparative de plusieurs isolats de *B. bassiana* a démontré que l'amplification du locus *BbMin1* (minisatellite composé d'insertions contenant une suite poly(GA)) a produit des amplicons de différentes tailles. Les isolats avaient donc des locus *BbMin1* de différentes tailles (Coates et al. 2002). Des résultats semblables ont été obtenus chez les espèces *B. amorpha*, *B. brogniartii* et *B. caledonica* (Coates et al. 2002).

Les analyses de séquences nucléotidiques de certains gènes de l'ADNr ont démontré la résolution de profils taxonomiques du genre *Beauveria*. Par exemple, les

variations du gène 28S de l'ADNr révèlent une distinction définitive entre les genres *Beauveria* et *Tolypocladium* (Rakotonirainy et al. 1991). Une étude a aussi été réalisée sur les relations génétiques existant entre les isolats de *B. bassiana* et l'origine géographique en analysant des séquences nucléotidiques du gène 28S de l'ADNr. Les chercheurs ont identifié quatre introns de groupe I (portion de gène non codante) et par la suite, ils ont détecté leur présence ou absence chez différents isolats (Wang et al. 2003). Les introns de groupe I possèdent trois particularités : ils catalysent eux-mêmes leur épissage ; ce sont des éléments génétiques mobiles ; nombre d'entre eux possèdent une phase ouverte de lecture (Bhattacharya et al. 2005). Le transfert des introns de groupe I procède par un mécanisme de conversion génique qui est initié par une coupure endonucléolytique produite par une endonucléase codée dans l'intron (Haugen et al. 2005). Le rôle supposé des introns est de permettre une combinatoire lors de l'épissage. Cela permet aux gènes à ARNm de coder plusieurs protéines, ce qui représente une économie d'énergie pour la cellule, surtout lorsque la transcription se fait à haute fréquence (Belshaw et Bensasson, 2006).

Les régions variables ITS1 et ITS2 de l'ADNr ont aussi été étudiées. La comparaison des profils génétiques en utilisant la technique PCR-RFLP au niveau de ces régions a révélé un grand degré de polymorphisme entre les isolats de *B. brangniartii* et elle a abouti à leur séparation en sept groupes distincts. La séparation génétique de ces isolats a été supportée par leurs origines biologiques (Neueglise et al. 1994). D'autre part, l'alignement de la séquence du gène 5,8S et des séquences ITS a démontré des variations entre les isolats de *B. bassiana*. Un niveau de mutation de 6,62 % a été observé dans les régions ITS (Coates et al. 2002). D'ailleurs, ces mêmes auteurs ont identifié six endonucléases de restriction (*Alu I*, *Hha I*, *Sin I*, *Hinf I*, *Tru9A I* et *Tha I*) pour fractionner la région ITS1.

Toutefois, aucune étude n'a été réalisée pour mettre en évidence une technique d'identification génétique des isolats de *B. bassiana*. Le développement d'un tel outil permettrait l'identification des isolats de cet entomopathogène par les

profils génétiques au niveau de l'ADNr. Cet outil devrait aussi permettre, de façon rapide et conviviale, de confirmer l'identité génétique des isolats et aussi leur suivi environnemental après application au champ. L'enregistrement des isolats portant une signature génétique dans une banque de données pourrait servir pour d'autres recherches et aussi pour l'identification de nouveaux isolats.

10. Avantages de l'utilisation de *B. bassiana*

Le champignon *B. bassiana* est devenu la pierre angulaire de plusieurs programmes de lutte intégrée, notamment dans les secteurs agricoles où la présence de résidus de pesticides dans les aliments constitue une source de préoccupation majeure. Le champignon *B. bassiana* est inoffensif pour la santé humaine, en plus d'être sans danger pour l'environnement (Faria et Wraight, 2001 ; Althouse et al. 1997).

Plusieurs facteurs favorisent une plus grande utilisation de *B. bassiana* dans le futur, en particulier l'augmentation des coûts sociaux résultant de l'utilisation massive des pesticides chimiques et l'escalade rapide des coûts directs du développement et de production des nouveaux insecticides chimiques. Les occasions d'utiliser cet entomopathogène conjointement à d'autres agents de lutte biologique et à diverses pratiques culturales et pesticides courants se sont accrues considérablement avec la découverte de nouveaux isolats plus efficaces, l'optimisation des formulations et l'amélioration des procédés d'application.

Le mycète *B. bassiana* comporte d'autres avantages. En effet, son activité insecticide est plus rapide que d'autres agents entomopathogènes et sa durée de conservation est longue. De plus, sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux. Son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effets sur les insectes bénéfiques et les autres organismes non ciblés sont nuls à négligeables. Le champignon *B. bassiana* peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui

doivent être ingérés pour infecter. Ce mode d'action particulier rend tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles. De plus, les conidies peuvent persister dans l'environnement par la propagation des enzooties ou des épizooties.

Un des avantages écologiques des isolats de *B. bassiana* provient de leur grande sélectivité, leur action infectieuse ou létale étant limitée à seulement quelques ravageurs ciblés (Maurer et al. 1997). En plus, il est impossible théoriquement que les insectes développent leur résistance vis-à-vis *B. bassiana* car ce dernier utilise simultanément plusieurs modes d'actions et comme un "pesticide vivant", il est aussi assujetti à l'adaptation.

11. Contraintes de l'utilisation de *B. bassiana*

11.1. Conditions environnementales

Bien que les produits à base de champignons entomopathogènes semblent prometteurs, plusieurs problèmes doivent être résolus avant qu'ils puissent être utilisés de manière systématique. L'utilisation des champignons entomopathogènes ne permet pas toujours une suppression consistante des insectes ravageurs. Il y a quelques contraintes à leur utilisation. L'utilisation des champignons sous des conditions contrôlées au laboratoire permet de tuer les insectes après 3 jusqu'à 6 jours (Inglis et al. 2001). Cependant, en conditions de terrain, la mort des insectes par les champignons peut prendre plus de temps. Ceci est dû aux conditions sous-optimales de l'environnement qui sont responsables de la prolongation de l'initiation de maladie ainsi que sa progression chez l'hôte.

Les principaux facteurs limitant l'utilisation de *B. bassiana* sont abiotiques (température, humidité relative, rayons UV, etc.). Ils peuvent entraîner la perte de son efficacité sur le terrain. Ces facteurs ont une grande influence sur la formation de l'inoculum et sa conservation. De plus, les conditions climatiques influencent la physiologie du champignon, sa capacité à infecter l'hôte, la progression de l'infection

au sein de l'hôte vivant ou mort, la sporulation sur le cadavre, la capacité de dispersion et de survie des conidies infectieuses, mais aussi la sensibilité ou la résistance de l'hôte à l'infection.

La température et l'humidité affectent le pourcentage de survie, de germination et le taux d'infection de *B. bassiana* (Fargues et al. 1997a, b ; Ouedraogo et al. 1997 ; Vidal et al. 1997). La température optimale pour la majorité des hyphomycètes entomopathogènes se situe entre 20 et 25°C, mais l'infection et la maladie des insectes peuvent avoir lieu à des températures situées entre 15 et 30°C (Inglis et al. 2001). Toutefois, il existe des isolats de champignons qui sont adaptés aux conditions environnementales sous-optimales voir même désertiques (Kouassi, 2004). La conidiogénèse, sur les surfaces de l'insecte tué par une mycose, requiert une humidité élevée et la production des conidies peut influencer la transmission horizontale du pathogène. En général, l'efficacité de *B. bassiana* contre les insectes requiert un niveau d'humidité relativement élevé (Walstad et al. 1970). Par exemple, une humidité relative de 97 % a été nécessaire pour la production des conidies dans les cadavres de *Rhodnius prolixus* (Stal), vecteur de la maladie de Chagas (Fargues et Luz, 2000). Cependant, Marcandier et Khachatourians (1987) ont démontré que *B. bassiana* peut tolérer une humidité relativement faible. Plus précisément, Fargues et al. (1997b) ont démontré que *B. bassiana* requiert pour son développement l'humidité existante dans le micro-habitat de l'insecte-hôte ou bien dans le micro-environnement de surfaces corporelles de l'hôte (Faria et Wraight, 2001), ce qui lui permettrait d'évoluer dans des conditions plus arides.

Les conidies des champignons hyphomycètes adhèrent fortement à la cuticule des insectes (Boucias et al. 1991). Les précipitations ne causent pas une grande perte du nombre de conidies qui ont adhéré sur le tégument de l'insecte (Burgess, 1998). Cependant, d'autres études ont indiqué que les précipitations sont responsables d'une perte significative des conidies de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* adhérentes au

feuillage de certaines plantes monocotylédones et dicotylédones (Inyang et al. 2000 ; Inglis et al. 2000, 1995).

Un des facteurs cruciaux dans l'utilisation pratique des champignons est leur persistance relativement courte à la surface des feuilles. Il a été démontré que les conidies de *B. bassiana* sont rapidement inactivées par les rayons UV du soleil (Inglis et al. 1993), particulièrement les UV de type B (longueur d'onde de 285 à 315 nm) (Inglis et al. 2001). Les rayons UV peuvent affecter l'efficacité et la persistance de conidies de *B. bassiana* sur les feuillages traités. Des demi-vies de moins de 2 jours ont été observées chez certains isolats de *B. bassiana* soumis aux rayons UV (Inglis et al. 2001). Alors que la susceptibilité des conidies de *M. anisopliae* aux irradiations a été significativement différente entre les isolats (Fargues et al. 1996).

11.2. Compatibilité de *B. bassiana* avec les agrochimiques

Non seulement la répétition d'applications intenses de pesticides chimiques amène au développement de la résistance chez les insectes (Casida et Quinstad, 1998), mais aussi plusieurs pesticides peuvent provoquer des effets toxiques sur les champignons entomopathogènes (Todorova et al. 1998 ; Majchrowicz et Poprawski, 1993). Par exemple, un fongicide à base de metalaxyl a inhibé complètement la croissance de *B. bassiana* (Kouassi et al. 2003b). Il interfère avec le complexe de l'ARN-polymérase-I-template des champignons sensibles, inhibant ainsi la synthèse de l'ARN ribosomal (Griffith et al. 1992). Les fongicides peuvent affecter *B. bassiana* différemment selon leurs natures chimiques (Olmert et Kenneth, 1974) et le temps d'application (Jaros-Su et al. 1999). La survie et l'efficacité de conidies dans les agrosystèmes dépendent de leur compatibilité avec les pesticides chimiques.

Les hyphomycètes entomopathogènes ne peuvent pas supplanter le besoin des pesticides chimiques dans tous les systèmes de production. Par exemple, les insecticides peuvent être nécessaires pour la suppression rapide d'une population en expansion d'un ravageur ou pour contrôler les populations de certains ravageurs non

ciblés par les champignons. Les fongicides sont souvent exigés pour contrôler les maladies des plantes, mais plusieurs fongicides possèdent un large spectre d'activité et ils peuvent diminuer la germination, la croissance et l'efficacité des champignons entomopathogènes (Li et Holdom, 1994 ; Majchrowicz et Poprawski, 1993). L'effet du délai et de la synchronisation des applications de *B. bassiana* avec certains fongicides incompatibles a été étudié. Par exemple, l'efficacité de *B. bassiana* contre les adultes de *L. lineolaris* n'a pas été altérée en respectant un délai de quatre jours avant d'appliquer les fongicides. L'application des fongicides quatre jours avant l'application de *B. bassiana* a entraîné un effet antagoniste causant des mortalités plus faibles de la population des adultes de *L. lineolaris* (Kouassi et al. 2003c).

Les herbicides et les régulateurs de croissance de plantes sont aussi utilisés de façon intensive dans la plupart des agrosystèmes, et leur compatibilité avec les champignons est souvent incertaine. Par exemple, un herbicide à base de glufosinate-ammonium (Ignite) a inhibé la croissance mycélienne et la sporulation de *B. bassiana*. Toutefois, un autre herbicide à base de dichlorure monohydraté (Diquat) n'a pas démontré un effet significatif sur la croissance mycélienne et la sporulation de *B. bassiana* (Todorova, 1998). De plus, ce produit a exercé un effet synergique sur l'activité insecticide de *B. bassiana* et le traitement simultané a provoqué une mortalité de 50 % de la population des adultes du doryphore de la pomme de terre.

11.3. Compatibilité de *B. bassiana* avec d'autres agents de lutte biologique

Les recherches doivent aussi caractériser les interactions intragilde et les interactions trophiques complexes entre un agent pathogène, un parasitoïde et un prédateur généraliste face à un insecte ravageur, tant au niveau de l'individu qu'à celui des populations. D'autres études doivent porter sur les critères généraux de compatibilité et de synergie d'agents susceptibles d'être utilisés ensemble pour le contrôle biologique des insectes ravageurs.

Pour l'homologation d'un agent de contrôle microbiologique, il est nécessaire de s'assurer qu'il ne présente pas un danger pour les organismes non ciblés, plus particulièrement pour les insectes prédateurs et les parasitoïdes (Inglis et al. 2001). Il est connu que *B. bassiana* a un large spectre d'insectes-hôtes. Cependant, la pathogénicité et la virulence de ce mycète varient entre les isolats et les insectes-hôtes (Goettel et al. 1990). Les hyphomycètes entomopathogènes sont compatibles avec un nombre d'insectes bénéfiques (James et Lighthart, 1994 ; Goettel et al. 1990).

Peu d'attention a été accordée sur la possibilité d'appliquer conjointement des entomopathogènes tels les virus, les protozoaires et les bactéries avec les champignons hyphomycètes afin d'augmenter l'efficacité. Dans une des rares études sur le sujet, Lewis et al. (1996) ont observé que la co-application de *Bt* et *B. bassiana* dans un champ de maïs augmente la mortalité des chenilles de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Les travaux de Barbercheck et Kaya (1991, 1990) ont indiqué que les co-infections par les nématodes et *B. bassiana* peuvent accélérer le taux d'infection létal et causer une mortalité élevée dans les populations d'insectes traités.

12. Production de *B. bassiana*

Le champignon *B. bassiana* possède deux phases de croissance. La phase végétative est caractérisée par la croissance du mycélium formé d'hyphes et la phase reproductive est celle pendant laquelle les spores sont formées et relâchées dans l'environnement (Kamp et Bidochka, 2002). Selon les conditions de croissance, trois types de spores peuvent être produits par le champignon. Lorsqu'il croît en milieu solide, *B. bassiana* produit des conidies aériennes. En milieu liquide, il produit surtout des blastospores et en moins grande quantité, des conidies submergées (Jenkins et al. 1998). Les blastospores sont généralement de plus grande taille que les conidies et tendent à avoir une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (Vega et al. 2003). Chez les champignons *M. anisopliae* et *Hirsutella*

thompsonii, les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies (Hegedus et al. 1990). De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies (Burges, 1998). Pour ces raisons, les formulations contenant des conidies sont plus souvent utilisées sur le terrain.

Les champignons entomopathogènes peuvent être produits de différentes façons : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu du riz stérile, des grains concassés de maïs, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides. La production en milieu solide présente l'avantage qu'elle est facile à réaliser et que les conidies produites ont tendance à être plus tolérantes à la dessiccation et plus stables que les spores produites en culture liquide. Malheureusement, les méthodes de fermentation solide présentent de nombreuses contraintes techniques et économiques (problèmes de stérilisation de substrats, échanges de gaz, contrôle de température, maintien d'une culture pure et récupération du produit à partir du substrat). Il faut alors que les cultures impliquées soient de haute valeur ajoutée (légumes, petits fruits), ou que la concentration des conidies produites sur le substrat solide soit très importante et que la main d'œuvre soit bon marché. La fermentation liquide est une méthode plus économique. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (pH, température, aération) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide.

Plusieurs paramètres de croissance doivent être considérés afin d'obtenir de grandes quantités de spores et une forte virulence de celles-ci. Il a été démontré que la température d'incubation est un paramètre important lors de la production de champignons. La température optimale peut varier non seulement entre les espèces de champignons, mais aussi entre les isolats de la même espèce (Mondal et Bhattacharya, 2004 ; Lopez-Lastra et al. 2002 ; Jenkins et al. 1998). Pour *Nomuraea rileyi*, un autre hyphomycète, la température optimale pour la croissance optimale du mycélium se situe entre 22 et 26°C (Edelstein et al. 2004). D'autre part, une étude a

démontré que la production de conidies de *M. anisopliae* était plus importante à 20°C qu'à 23°C ou 30°C (Nelson et al. 1996). Le niveau d'humidité peut aussi influencer la croissance et la sporulation de *B. bassiana*. Des degrés d'humidité différents ont permis la production de conidies chez *B. bassiana* : 75 % (Barranco-Florido et al. 2002), 85 % (Mondal et Bhattacharya, 2004) et 90 % (Devi et al. 2005). La disponibilité de l'eau a aussi un effet significatif sur la croissance des conidies de *B. bassiana* (Devi et al. 2005). La photopériode normale (Nelson et al. 1996) ou à un cycle de lumière/ obscurité de 12 : 12 (Kamp et Bidochka, 2002) pourrait aussi affecter la production de conidies.

13. Formulation à base de champignons entomopathogènes

Pour obtenir les conditions optimales de production, on doit considérer non seulement le rendement en conidies, mais aussi la stabilité des conidies (ex. tolérance à la dessiccation, durée de vie, etc.) et leur efficacité. La technologie de production et la formulation sont donc interdépendantes. Les formulations granulées peuvent être obtenues soit par enrobage des spores préalablement récoltées (Leland et Behle, 2005), soit par croissance et sporulation du champignon à la surface d'un support nutritif granulé. Ce premier procédé, déjà appliqué à de nombreux microorganismes auxiliaires, facilement industrialisable, est encore insuffisamment éprouvé au champ pour les champignons entomopathogènes et ses perspectives d'utilisation agronomique ne peuvent pas être précisément estimées.

Les produits formulés, contenant de matériels tels que de protecteurs UV, d'huiles, d'humectants et de nutriments pour stimuler la germination et la croissance des spores, ont un grand potentiel pour obtenir des meilleurs résultats (Wraight et al. 2001 ; Goettel et al. 2000 ; Burges, 1998 ; Bateman, 1994). Par exemple, les huiles permettent une meilleure adhésion et un épandage adéquat des spores sur la cuticule hydrophobique de l'insecte (Ibrahim et al. 1999). De plus, les conidies d'hyphomycètes formulées dans l'huile végétale pure et en présence d'adjuvants

semblent être plus résistantes aux radiations UV que les conidies non-formulées (Alves et al. 1998 ; Moore et al. 1993).

14. Marché du biopesticide *B. bassiana*

La commercialisation d'un nouveau produit est subordonnée à des études préalables de rentabilité du point de vue du producteur et du consommateur, comparée au choix des produits existants. Actuellement, le coût de production de *B. bassiana* n'est pas encore connu. Le prix de revient d'un traitement dépend du prix du produit, du nombre et du coût des opérations nécessaires pour réduire la population des ravageurs ciblés.

Les formulations d'un insecticide à base de micro-organismes deviennent de plus en plus performantes avec des prix compétitifs (Navon, 2000 ; Gaugler, 1997 ; Ahmed et Leather 1994 ; Starnes et al. 1993). La production sur une base commerciale de différents isolats de *B. bassiana* a été réalisée depuis plus d'une vingtaine d'années pour lutter contre les populations du doryphore de la pomme de terre en ex-URSS et en République Tchèque (Ferron et al. 1993). Des produits à base de *B. bassiana* ont aussi été élaborés en France pour lutter contre les populations de la pyrale du maïs et du doryphore de la pomme de terre (Ferron et al. 1993). Une autre formulation de *B. bassiana* a été homologuée en Chine pour lutter contre les populations de la noctuelle de légumineuses (Todorova, 1998). Plusieurs produits homologués à base de *B. bassiana* sont utilisés pour lutter contre les populations de différents insectes ravageurs aux États-Unis. Par contre, au Canada, aucun programme d'utilisation de *B. bassiana* n'est encore en place.

Problématique

Depuis une soixantaine d'années, la lutte contre les insectes ravageurs s'est réalisée presque uniquement par l'utilisation des pesticides chimiques de synthèse non sélectifs (Floate et al. 2001). L'utilisation intempestive de ces pesticides cause l'élimination d'arthropodes utiles, de prédateurs et de parasites spécifiques aux insectes qui servaient d'agents de contrôle naturels des populations d'insectes ravageurs. Cette utilisation engendre un problème croissant de l'émergence de populations secondaires d'insectes ravageurs. Certains insectes ravageurs ont développé des résistances aux insecticides. De plus, les risques potentiels à la santé humaine et à l'environnement associés à l'utilisation d'insecticides chimiques non sélectifs deviennent de plus en plus préoccupants.

L'exigence maintenue de qualité et de régularité de la production imposera de raisonner et intégrer la mise en œuvre de méthodes biologiques en fonction d'obligations multiples d'efficacité agronomique, de respect de l'environnement, de qualité sanitaire, de viabilité économique et de durabilité des pratiques agricoles. L'utilisation des pathogènes microbiens contre les insectes ravageurs pourrait constituer une stratégie durable pour l'environnement, ce qui est largement dû à leur plus grande spécificité de cible. De plus, le mode d'action de ces agents est complexe, et il y a donc moins de potentiel pour les espèces d'insectes ravageurs de développer rapidement une résistance à ces agents. Les agents entomopathogènes détiennent un grand potentiel pour la production à l'échelle industrielle et le développement comme biopesticides.

Les champignons entomopathogènes sont importants dans la régulation naturelle d'un grand nombre d'insectes ravageurs, et les populations de ces derniers sont souvent détruites lors d'épizooties répandues (McCoy et al. 1988). L'invasion se fait habituellement par la cuticule, ne nécessitant donc aucune ingestion, tel qu'il est le cas avec la plupart des autres pathogènes d'insectes. Le mycète *B. bassiana* a démontré son efficacité contre certains ravageurs et pourrait être un excellent

candidat pour utilisation contre les populations d'insectes ravageurs du fraisier, dont les plus importants sont la punaise terne, l'anthonome de la fleur du fraisier et le charançon de la racine du fraisier.

La problématique des insectes ravageurs est un phénomène récurrent qui se traduit par des impacts majeurs sur les plans écologique et socio-économique. Les effets sont particulièrement importants dans le cas d'épidémies de ravageurs. La punaise terne est un ravageur phytophage cosmopolite et d'importance économique en Amérique du Nord. Elle a développé une résistance à plusieurs pesticides chimiques homologués (Hollingsworth et al. 1997). Au niveau de la lutte biologique, des essais de contrôle avec des auxiliaires de lutte se sont avérés insatisfaisants. Certains isolats de *B. bassiana* ont provoqué une mortalité élevée des adultes de *L. lineolaris* en laboratoire (Kouassi, 2004).

La pathogénicité de *B. bassiana* contre certains charançons appartenant à la famille des curculionidés a été étudiée (Chikwenhere et Vestergaard, 2001 ; Quintela et McCoy, 1998 ; Adane et al. 1996 ; Markova, 1992). Cependant, il n'existe aucune étude, à ma connaissance, démontrant l'efficacité de ce champignon contre l'anthonome de la fleur du fraisier, deuxième phytophage en importance en fraiseraies. Actuellement au Canada, il n'existe pas d'alternative efficace aux pesticides chimiques contre ce ravageur.

Au Québec, le charançon de la racine du fraisier semble être problématique pour la culture de la fraise. Les dommages qu'il cause aux fraisières peuvent être considérables et peuvent occasionner d'importantes baisses de rendement. Cependant, il n'existe actuellement aucun insecticide homologué pour lutter spécifiquement contre ce ravageur et aucune méthode alternative de lutte n'est encore disponible.

L'utilisation de *B. bassiana* est limitée par l'adaptation des isolats appliqués aux contraintes environnementales et par le temps de développement de la maladie. Les principaux facteurs limitant son utilisation sur le terrain sont abiotiques. Ces

facteurs peuvent entraîner la perte d'efficacité de l'inoculum fongique sur le couvert végétal. Les effets de certains facteurs sur la viabilité des conidies ont été étudiés, comme la température et l'humidité (Fargues et al. 1997a, b ; Ouedraogo et al. 1997 ; Vidal et al. 1997). L'effet du rayonnement solaire sur la rémanence ou l'inactivation de l'inoculum infectieux a aussi été étudié (Inglis et al. 2001). Moore et al. (1993) ont démontré que l'ajout de certains adjuvants à base d'huile végétale aux conidies formulées contribue à une meilleure résistance aux conditions abiotiques défavorables que les conidies non formulées.

Le développement d'une formulation à base de ce champignon devrait permettre d'assurer une protection efficace des plantations de fraises contre les principaux insectes ravageurs. De plus, l'intérêt d'appliquer *B. bassiana* en fraiseraies augmente du fait de l'humidité élevée qui caractérise ces cultures durant le temps de floraison, condition favorisant son développement.

L'emploi de *B. bassiana* dans l'environnement doit nécessairement être assujéti à une connaissance profonde des isolats permettant une identification précise et un suivi environnemental après leurs applications sur le terrain. Les isolats de *B. bassiana* sont actuellement enregistrés selon leurs origines géographiques et leurs hôtes spécifiques, mais ils ne sont pas encore caractérisés génétiquement. La PCR et les analyses des séquences d'ADN sont utilisées comme des outils de détection, d'identification et d'analyse phylogénétique de plusieurs espèces fongiques. La présente recherche consiste à étudier l'ADN ribosomal de *B. bassiana* afin d'identifier des variations dans les régions 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 et 28S.

Une étude détaillée sur la biologie de *B. bassiana* est nécessaire avant son utilisation dans un programme de lutte biologique. Dans ce contexte, le projet a porté sur la caractérisation génétique des isolats, les paramètres de production et de formulation, la relation pathogène-insecte par la réalisation des épreuves biologiques en laboratoire et des expériences sur le terrain. De plus, les objectifs de cette étude sont de mieux définir les conditions du succès de l'utilisation de *B. bassiana*, mais

aussi d'identifier les causes pouvant affecter son potentiel insecticide, que ce soit par une meilleure connaissance des propriétés que doit avoir un agent de lutte biologique ou par une meilleure compréhension des conditions environnementales nécessaires à son maintien, son développement et son efficacité.

But, hypothèses et objectifs

Le but de cette recherche est de sélectionner et caractériser génétiquement des isolats spécifiques et virulents contre les principaux insectes ravageurs présents dans les cultures de la fraise et par conséquent, la réduction des dommages et des pertes de rendements en fruits associés aux attaques des ravageurs ciblés. Ce projet est réalisé dans le contexte d'une éventuelle utilisation du champignon *B. bassiana* pour lutter contre les populations de la punaise terne, de l'anthonome de la fleur du fraisier et du charançon de la racine du fraisier en fraiseraies.

L'hypothèse principale du projet de recherche est qu'il est possible de contrôler efficacement les populations des principaux insectes ravageurs en fraiseraies par l'utilisation du champignon entomopathogène *B. bassiana*.

Les hypothèses particulières suivantes ont été vérifiées expérimentalement :

- 1) Il existe une spécificité infectieuse chez les isolats de *B. bassiana* permettant de les sélectionner sur la base de leur potentiel insecticide contre les principaux insectes ravageurs du fraisier ;
- 2) Il est possible d'établir un outil moléculaire permettant d'identifier et de différencier les isolats de *B. bassiana*.

Les objectifs de recherche sont de :

- 1) Réaliser le criblage d'isolats de *B. bassiana* chez la punaise terne, l'anthonome de la fleur du fraisier, le charançon de la racine du fraisier et la coccinelle maculée ;
- 2) Déterminer le potentiel insecticide et la virulence de *B. bassiana* contre les populations des ravageurs ciblés en évaluant les concentrations létales (CL₅₀) et les temps moyens de survie (TMS) ;
- 3) Établir un outil moléculaire d'identification et de différenciation des isolats de *B. bassiana* ;

- 4) Mesurer la viabilité des conidies et évaluer la persistance de l'activité insecticide de celles-ci ;
- 5) Déterminer l'impact de *B. bassiana* sur les populations d'insectes ravageurs en conditions de terrain par deux approches :
 - Approche directe en réalisant des suivis réguliers de la dynamique des populations de nymphes de la punaise terne et d'adultes de l'anthonome ;
 - Approche indirecte en évaluant les dommages reliés au comportement alimentaire de la punaise terne et les pertes de rendement associées aux attaques de l'anthonome.

Matériel et méthodes

I. Volet 1 : Expériences au laboratoire

1.1. *Beauveria bassiana*

Les isolats de *B. bassiana* proviennent de la banque de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Canada) qui compte près de 100 isolats d'hyphomycètes. Les échantillons de cette banque sont conservés à -80°C dans du glycérol 70 %. Les différentes cultures, conservées dans la mycothèque, ont été repiquées au même moment et placées dans des conditions identiques. Avant d'être utilisés, les isolats, sélectionnés pour la réalisation des expériences, ont été cultivés sur milieu nutritif Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (néopeptone 10 %, glucose 40 %, agar 15 %) (Difco Laboratories, Mannheim, Allemagne) sous conditions contrôlées, à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et à l'obscurité. Les isolats sélectionnés ont été choisis en fonction de leurs hôtes et origines géographiques (tableau 1).

1.2. Production de *B. bassiana*

Les spores des isolats de *B. bassiana* ont été produites par fermentation sur milieu solide à base de la céréale orge perlé (Clic Import Export Inc., Montréal, QC). La production a été réalisée dans des sacs plastiques autoclavables munis d'un filtre de 0,22 µm (Fungi Perfecti, Olympia, WA) (figure 11). L'utilisation de sacs autoclavables jetables est une méthode efficace et peu coûteuse pour la culture de *B. bassiana* (Mazumder et al. 1995). Chaque sac contenait 200 g de l'orge perlé comme substrat de croissance et 100 ml d'une suspension fongique à une concentration de 1×10^7 conidies/ml. Pour chaque isolat, plusieurs sacs ont été préparés, scellés et placés en chambre de production à une température de 25°C et à l'obscurité pour une période de culture de deux semaines. L'extraction des spores a été réalisée en ajoutant 200 ml d'eau distillée à chacun des sacs de production.

Tableau 1. Hôte et origine géographique des isolats de *Beauveria bassiana*.

Isolat	Hôte	Origine géographique
INRS-CFL	<i>Tomiscus piniperda</i> (Coleoptera : Scolytidae)	Québec, Canada
INRS-IP	<i>Lygus</i> sp. (Heteroptera : Miridae)	Québec, Canada
INRS-2001	Hemiptera	Québec, Canada
ARSEF 1322	<i>Lygus lineolaris</i> (Heteroptera : Miridae)	Senneville, France
ARSEF 1516	<i>Adelphocoris</i> sp. (Heteroptera : Miridae)	Senneville, France
ARSEF 2988	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera : Chrysomelidae)	Québec, Canada
ARSEF 1395	N.A.	Seine-St Denis, France
ARSEF 2991	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera : Chrysomelidae)	Québec, Canada
DAOM 195005	<i>Choristoneura fumiferana</i> (Lepidoptera : Tortricidae)	Québec, Canada
DAOM 196605	<i>Melanopus bivittatus</i> (Orthoptera : Acrididae)	Saskatchewan, Canada
DAOM 210087	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera : Chrysomelidae)	Québec, Canada
DAOM 210569	<i>Cicindela sexguttata</i> (Coleoptera : Carabidae)	Colombie-Britannique, Canada
DAOM 216540	<i>Reticulitermes flavipes</i> (Isoptera : Rhinotermitidae)	Ontario, Canada
LRS 12	<i>Hypera postica</i> (Coleoptera : Curculionidae)	Drome, France
LRS 20	Sol	Bénin, Afrique
LRS 33	Sol	Alberta, Canada
LRS 49	<i>Galerucella californiensis</i> (Coleoptera : Chrysomelidae)	Alberta, Canada
IPP 206	Heteroptera	Bulgarie

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

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

DAOM : Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Ottawa, Ontario, Canada.

LRS : Lethbridge Research Station, Agriculture and Agri-Food Canada, Alberta, Canada.

IPP : Institute of Plant Protection, Sofia, Bulgaria.



Figure 11. Différentes étapes de production de conidies de *Beauveria bassiana* sur milieu céréalier.

A : Sac autoclavable utilisé pour la production des spores de *B. bassiana* ; B : Production des spores sur milieu solide à base de l'orge perlé ; C : Extraction des spores.

Après agitation, la suspension de spores a été filtrée à travers une mousseline et les conidies contenues dans le filtrat ont été dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre sous microscopie photonique (Bright-Line Improved Neubauer; Hausser Scientific, Horsham, PA). Toutes les suspensions fongiques obtenues ont été maintenues à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les conidies de *B. bassiana* sont des organismes vivants dont la viabilité peut diminuer au fil du temps selon les conditions de stockage. Par conséquent, il est important de connaître la viabilité de ces conidies avant leur utilisation. Dans ce contexte, la viabilité des conidies de chaque suspension préparée a été évaluée en mesurant le pourcentage de germination comme décrit par Inglis et al. (1993). Pour chaque essai de germination, au moins 200 conidies ont été examinées sous microscopie photonique après 24 heures d'incubation sur milieu SDA à 25°C, une humidité relative de 70 % et à l'obscurité. Pour tous les isolats, le pourcentage de germination était entre 97 et 100 %.

1.3. Insectes

Les adultes de la punaise terne ont été récoltés à l'aide du filet entomologique dans des champs environnants de Mirabel, QC (45°08'N : 74°05'O). Une colonie de *L. lineolaris* a été maintenue en laboratoire à l'intérieur des cages en mousseline 30 x 20 x 20 cm, dans une chambre de croissance (MLR-350, Sanyo, Osaka, Japon), à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur). La laitue romaine et les germes de pommes de terre ont été utilisés comme source de nourriture et de substrats de ponte. Ce sont les insectes provenant de cette colonie qui ont été utilisés lors des différentes expériences.

Les adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier ont été récoltés par une technique de battage. Les récoltes ont été effectuées principalement dans la région de Mirabel et dans une moindre mesure dans une ferme biologique située à Laval, QC

(45°35'N : 73°45'O). Les insectes ont été maintenus dans des cages approvisionnées en eau et en plants de fraisier dans des chambres environnementales à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur). Les insectes ont été maintenus dans ces conditions jusqu'à leur utilisation pour les épreuves biologiques.

Les adultes du charançon de la racine du fraisier ont été récoltés en utilisant des pièges-fosses placés au pied des plants du fraisier dans des serres infestées par ce ravageur, près de Portneuf, QC (46°52'N : 71°54'O). Les pièges-fosses ont été distribués uniformément dans les serres au long de lignes et ils ont été enfouis dans le sol dans les rangs de fraisiers, en prenant soin de placer l'entonnoir du piège au niveau de la surface du sol. Ils ont été visités trois fois par semaine. Une fois capturés, les adultes d'*O. ovatus* ont été maintenus dans des cages en présence de plants de fraisier et incubés dans une chambre environnementale à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur).

Les adultes de la coccinelle maculée ont été récoltés sur un site d'agrégation automnal situé près de la ville Saint-Hyacinthe, QC (45°37'N : 72°63'O). Les insectes ont été maintenus en cages à 5°C pendant deux jours avant de réaliser les expériences. Les insectes ont été transférés par la suite, pour une période de 24 heures, dans une chambre environnementale à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur) avant le début des épreuves biologiques.

1.4. Épreuves biologiques

1.4.1. Criblage des isolats

La susceptibilité des adultes de la punaise terne, de l'anthonome de la fleur du fraisier et du charançon de la racine du fraisier au *B. bassiana* a été étudiée. Seize

isolats de *B. bassiana* ont été testés. L'innocuité des isolats sélectionnés a été vérifiée sur une coccinelle prédatrice, la coccinelle maculée.

Pour chaque isolat, 20 adultes de chacune des espèces ont été inoculés individuellement par immersion dans 50 ml de suspensions de 1×10^7 conidies/ml durant cinq secondes (Butt et al. 1994). Les insectes des groupes témoins ont été soumis au même traitement, dans des volumes de 50 ml d'eau stérile. Les insectes ont été par la suite placés individuellement dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant un papier filtre Whatman 3 M (Whatman International Ltd, Maidstone, Angleterre) humecté avec de l'eau distillée. Les insectes ont été incubés en présence de nourriture. Il s'agissait du feuillage de laitue romaine pour la punaise terne, des bourgeons de fraises pour l'anthonome de la fleur et des plants du fraisier pour le charançon de la racine du fraisier, alors que la coccinelle maculée avait des punaises ternes comme source nutritionnelle. Les insectes ont été placés dans des chambres environnementales (MLR-350, Sanyo, Osaka, Japon) à une température de 25°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur). La mortalité a été suivie quotidiennement durant 7 jours pour *L. lineolaris* et 14 jours pour *A. signatus*, *O. ovatus* et *C. maculata*. Pour chaque isolat, l'expérience a été répétée 4 fois pour un total de 80 insectes testés et les isolats ont été classés selon le pourcentage de mortalité observée chez les insectes.

Les insectes morts ont été maintenus dans une chambre de croissance à 25°C, 70 % HR et à la noirceur pendant 2 semaines afin de favoriser la croissance de *B. bassiana*. L'observation d'un feutrage blanc, appelé muscardine, sur les cadavres d'insectes dans le laboratoire est habituellement employée pour vérifier la mort par infection fongique (Vandenberg et al. 1998 ; Moorhouse et al. 1993) (figure 12).

Les données de mortalité des insectes ont été exprimées en moyennes avec les écarts-types. Le pourcentage de mortalité des insectes a été corrigé en fonction des témoins en appliquant la formule d'Abbott (1925). Les données de mortalité des insectes ont été analysées en utilisant une analyse de variance (Anova ; $\alpha = 0,05$)

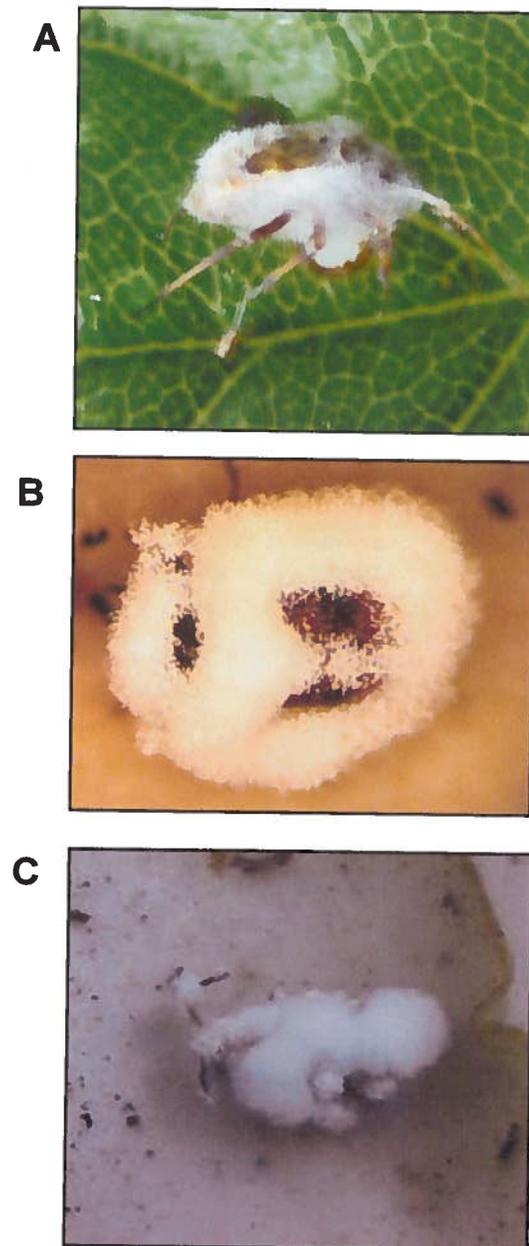


Figure 12. Profusion du mycélium de *Beauveria bassiana* sur le cadavre des principaux insectes ravageurs du fraisier.

A : Adulte de la punaise terne ; B : Adulte de l'anthonome de la fleur du fraisier ; C : adulte du charançon de la racine du fraisier. Les photos montrent la formation d'un feutrage mycélien blanc cotonneux, appelé muscardine, sur les cadavres des insectes suite à l'infection par *B. bassiana*.

(SAS Institute, 2002). Ces données ont été par la suite assujetties à des comparaisons multiples par le test de Tukey HSD afin de vérifier s'il y avait des différences significatives entre les isolats.

Les résultats des criblages des isolats de *B. bassiana* ont permis de sélectionner d'une part, les isolats ayant une grande pathogénicité contre les trois ravageurs et d'autre part, ceux qui ne représentent pas un effet pathogène significatif sur la coccinelle maculée.

1.4.2. Potentiel insecticide et virulence de *B. bassiana*

Selon les résultats de criblage des isolats de *B. bassiana* sur les trois insectes ravageurs et la coccinelle maculée et selon l'origine géographique, les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP*, indigènes du Québec, ont été sélectionnés pour la poursuite des expériences au laboratoire et sur le terrain. Quelques isolats, comme l'isolat *ARSEF2988*, ont causé des mortalités élevées chez les ravageurs étudiés. Cependant, ces isolats n'ont pas été considérés pour la poursuite des expériences à cause de leur impact nocif sur la coccinelle maculée.

Le potentiel insecticide des isolats de *B. bassiana* a été évalué en déterminant les concentrations létales (CL_{50} : concentration létale d'un agent pathogène nécessaire pour causer la mort de 50 % d'une population d'un insecte). La virulence des isolats de *B. bassiana* a été estimée en déterminant le temps moyen de survie (TMS : temps moyen de survie d'une population d'un insecte exposée à une concentration déterminée d'un pathogène) (Goettel et Inglis, 1997).

La mortalité associée aux différentes préparations fongiques de *B. bassiana* a été évaluée sur les nymphes et les adultes de la punaise terne et sur les adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier et du charançon de la racine du fraisier. Afin de déterminer les concentrations létales (CL_{50}), les insectes ont été soumis à des concentrations de 0, 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 et 1×10^9 conidies/ml de chaque isolat de *B. bassiana*. Ces concentrations ont été confirmées à l'aide d'un hémacytomètre sous

microscopie photonique. Pour chaque concentration, 20 individus sélectionnés aléatoirement ont été soumis individuellement à des préparations de *B. bassiana*. Pour chacun des trois insectes ravageurs étudiés, l'expérience a été répétée 4 fois pour un total de 400 insectes testés.

L'inoculation des insectes a été réalisée par immersion (Butt et al. 1994). Les insectes des groupes témoins ont été soumis au même traitement, dans des volumes de 50 ml d'eau stérile. Après inoculation, les insectes ont été transférés dans des boîtes de Pétri et incubés dans des chambres environnementales à 25°C, une 70 % d'humidité relative et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur). Un papier filtre Whatman 3M, humecté avec de l'eau distillée, a été placé au fond de chaque boîte de Pétri. Les insectes ont été incubés en présence de nourriture.

Pour chaque insecte étudié, le temps moyen de survie (TMS) a été déterminé en utilisant cette fois-ci une concentration unique de 1×10^8 conidies/ml. La technique d'immersion a été utilisée (Butt et al. 1994) et la mortalité des insectes a été notée. Les insectes morts ont été maintenus dans une chambre de croissance à 25°C, 70 % d'humidité relative et à la noirceur pendant 2 semaines pour favoriser la croissance fongique.

Les données de mortalité des insectes ont été analysées à l'aide du logiciel SAS version 9.1 (SAS Institute 2002, USA). Les valeurs de la concentration létale (LC_{50}) ont été déterminées en utilisant des analyses de probabilité "Probit". Les valeurs du temps moyen de survie (TMS) ont été estimées en appliquant le test de survie "Lifetest".

1.5. Caractérisation moléculaire des isolats de *B. bassiana*

1.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Les isolats de *B. bassiana* ont été sélectionnés initialement sur milieu sélectif ODA (oatmeal dodine agar) (oatmeal agar 17,5 g, agar 2,5 g, dodine 0,45 g, crystal violet 2,5 mg, pénicilline G 0,2 g, streptomycine 0,5 g) (Difco Laboratories,

Mannheim, Allemagne), puis maintenus à 4°C. Pour obtenir du matériel frais, ils ont été réensemencés sur milieu nutritif SDA et placés en chambre de croissance pendant 7 jours à 25°C, 70 % HR et à la noirceur. Les isolats ont ensuite été ensemencés à nouveau dans un milieu liquide SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (neopeptone 1 %, dextrose 2 %). Ils ont été incubés à 25°C pendant 7 jours à 160 rpm. Les spores ainsi produites ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN génomique de *B. bassiana* en se basant sur la technique décrite par Pfeifer et Khachatourians (1993).

Un volume de 2 ml a été prélevé de la culture de spores puis centrifugé à 13200 rpm pendant 1 minute. Le surnageant a été retiré et chacun des culots de spores a été lavé avec une solution tampon (dithiothréitol 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). La lyse de la paroi cellulosique des spores a été réalisée durant une incubation de 3 heures à 37°C dans du tampon PBS (sulfate d'ammonium 0,6 M, phosphate de potassium 0,02 M, pH 7,4) auquel 50 mg de cellulase de *Trichoderma harzianum* et 100 mg de cellulase d'*Aspergillus niger* ont été ajoutés. Après l'incubation, la suspension a été centrifugée à 13200 rpm pendant 5 minutes. Le culot a été suspendu puis incubé à 55°C pendant 2 heures dans une solution de lyse (Tris-HCl 0,1 M, SDS 2 %, M EDTA 0,15, pH 7,4) auquel 0,5 mg de la protéinase K a été ajouté pour digérer les membranes cellulaires des spores. Le culot a ensuite été resuspendu dans 500 µl du tampon TNE (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). L'ADN génomique a été extrait deux fois avec un volume de phénol saturé de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) et une fois avec un volume identique de chloroforme : isoamyl (24 : 1). La séparation des deux phases a été faite par centrifugation à 13200 rpm pendant 5 minutes. L'ADN génomique, contenu dans la phase aqueuse, a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) pendant 18 heures à -20°C. Après une centrifugation à 13200 rpm pendant 15 minutes, le culot d'ADN purifié a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70 %. Suite à une seconde centrifugation à 13200 rpm pendant 10 minutes, l'ADN génomique a été resuspendu dans un volume de 50 µl de tampon

TE (pH 7,4) puis conservé à -20°C.

La quantification de l'ADN génomique a été réalisée par spectrophotométrie ultraviolette sur un densitomètre DU-8 de Beckmann. L'absorption des rayons UV à 280 nm et à 260 nm a été mesurée. La concentration de l'ADN a été calculée selon la formule $A_{260} \times \text{le facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g/ml}$, où A_{260} est la densité optique à 260 nm. La pureté de l'ADN, quant à elle, a été évaluée à l'aide du rapport A_{260}/A_{280} .

La visualisation de l'ADN total a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % (Boehringer Ingelheim, Burlington, ON) dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Les échantillons d'ADN à analyser ainsi que les marqueurs de masse moléculaire de 1 Kb (Invitrogen, Burlington, ON) ont été mélangés avec du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène-cyanol 0,25 % (p/v), glycérol 30 % (p/v)) avant leur application dans les puits du gel. Suite à la migration électrophorétique, le gel a été coloré dans le tampon TAE 1X contenant 20 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium et les bandes d'ADN ont été révélées sous les rayons UV d'un transilluminateur. Les photos de gel ont été capturées numériquement et traitées par le logiciel "*Quantity One*" (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, ON).

1.5.2. Amplification par PCR de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal

L'objectif était d'identifier et de différencier les isolats de *B. bassiana* à l'aide d'un outil moléculaire. Les profils génétiques de six isolats ont été comparés par la technique de PCR-RFLP. Différentes amorces spécifiques ont été utilisées (tableau 2). Ces amorces ont été conçues de façon à permettre l'amplification des régions 18S-ITS, 5'-28S (28S B) et 3'-28S (28S C) de l'ADNr en utilisant la méthode de "*Primer walking*". La synthèse des amorces a été effectuée par le service de synthèse d'oligonucléotides d'Alpha DNA Inc. (Montréal, QC). Les réactions de PCR ont eu

Tableau 2. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de *Beauveria bassiana*.

Amorce	Séquence (5'→3')	Références
18S-ITS A FW1	GTAGTCATATGCTTGCTCTC	White et al. 1990
18S-ITS A FW2	GCTCGTAGTTGAACCTTGGGCC	*
18S-ITS A FW3	CGAGAAATCAAAGTGCTTGGGCTC	*
18S-ITS A FW4	GCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATC	*
18S-ITS A RV1	GCATATCAATAAGCGGAGGA	White et al. 1990
18S-ITS A RV2	TTCAATCGGTAGTAGCGACGGG	*
18S-ITS A RV3	GTGTTGAGTCAAATTAAGCCGC	*
18S-ITS A RV4	GCGGTCCTAGAAACCAACAAAATAG	*
28S B FW1	CGGAGGAAAGAAACCAACAGGAT	*
28S B RV1	CTCGAGTCATAGTTACTCCC	*
28S C FW1	CTGCCCCAGTGCTCTGAATGTC	Neueglise et Brygoo, 1994
28S C FW2	ATGGGCTTGGCAGAATCAGCG	*
28S C RV1	CCTCTCCGCAATGGTAATTCAGC	Neueglise et Brygoo, 1994
28S C RV2	CAGCCAAACTCCCCACCTGAC	*

* : Ces amorces ont été conçues à partir des premières séquences générées des amplicons clonés.

lieu dans le thermocycleur programmable “*Gene Amp*[®] *PCR System 9700*” (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le mélange réactionnel (50 μ l : volume final) était composé de 40 pmol/ μ l de chaque amorce, 200 μ mol/L de chaque déoxynucléoside triphosphate, 2,5 unités de l’ADN polymérase Taq (Sigma Aldrich, Oakville, ON) dans un tampon 10X (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM) et 100 ng de l’ADN total. Les conditions d’amplification par PCR ont été : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes ; suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C (30 secondes), hybridation à 50°C (1 minute) et élongation à 72°C (40 secondes). Une élongation supplémentaire à 72°C (10 minutes) a été réalisée. Cette étape d’extension permet ainsi d’achever l’élongation des amplicons. Les produits d’amplification par PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d’agarose 0,8 % dans du tampon TAE. Les migrations ont été effectuées dans un générateur de courant électrique à une tension de 90 V. Les gels ont ensuite été colorés au bromure d’éthidium et les bandes d’ADN ont été visualisées sous lumière UV. Les photos de gel ont été capturées numériquement et traitées par le logiciel *Quantity One*. Les amplicons ont été conservés à -20°C pour usage ultérieur.

1.5.3. Clonage et séquençage de la petite et grande sous-unité de l’ADN ribosomal

Afin de s’assurer de son identité et de permettre son séquençage, chaque amplicon a été cloné dans le vecteur de clonage pCR[®]2.1 à l’aide de la trousse “*TA cloning*[®]” (Invitrogen, Burlington, ON) en suivant la recommandation du fabricant. Cette trousse de clonage prend avantage de la capacité de l’ADN polymérase Taq à incorporer, durant la réaction de PCR, une désoxyadénosine (A) à chacune des deux extrémités des amplicons doubles brins. Cette construction facilite la ligation dans le vecteur linéarisé qui possède une désoxythymidine (T) de part et d’autre du site d’insertion du produit de PCR. Préalablement à la réaction de ligation, le produit de PCR a été purifié en utilisant un filtre “*microcon*[®] *PCR*” (Millipore, Bedford, MA). Les amplicons ont été filtrés suite à une centrifugation à 13200 rpm

pendant 5 minutes. Le produit de PCR purifié a été par la suite récupéré en plaçant 20 μl d'eau stérile sur le filtre et en le centrifugeant à 13200 rpm pendant 2 minutes en position inversée dans le tube collecteur. La ligation du produit de PCR purifié dans le vecteur de clonage pCR[®]2.1 a été réalisée grâce à l'enzyme T4 ADN ligase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' hydroxy et l'extrémité 5' monophosphate de deux nucléotides. Ainsi, la réaction de ligation a été réalisée à partir de 50 ng de l'amplicon purifié et de 25 ng du plasmide pCR[®]2.1 dans un volume final de 10 μl contenant 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase et du tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM (pH 7,5), MgCl₂ 6 mM, NaCl 5 mM, BSA 1mg/ml, β -mercaptoéthanol 7 mM, ATP 0,1 mM, DDT 2 mM, spermidine 1 mM). Le mélange réactionnel a été par la suite incubé pendant 18 heures dans un bain à 14°C pour permettre l'insertion du produit de PCR dans le vecteur pCR[®]2.1.

Suite à la réaction de ligation, les bactéries d'*Escherichia coli* INV α F' compétentes "One Shot[™]" (Invitrogen, Burlington, ON) ont été transformées par les plasmides recombinants. Dans la réaction de transformation, 2 μl du produit de ligation ont été incubés en présence de 50 μl de bactéries d'*E. coli* INV α F' compétentes pendant 30 minutes sur glace. Le mélange a ensuite été soumis à un choc thermique pendant 30 secondes à 42°C, permettant la pénétration de l'ADN plasmidique dans les bactéries, puis transféré sur glace. Les parois bactériennes ont été régénérées durant une incubation d'une heure à 37°C sous agitation (220 rpm) en présence de 250 μl du milieu de culture SOC (bacto-tryptone 2 % (p/v), extrait de levure 0,5 % (p/v), NaCl 10 mM, KCL 2,5 mM, glucose 20 mM). Après l'étape de régénération, des volumes de 25, 50, et 150 μl de la suspension de bactéries transformées ont été étalés sur une gélose 2x YT (agar 1,5 (p/v), bacto-tryptone 1,6 % (p/v), extrait de levure 1 % (p/v), NaCl 0,5 % (p/v), pH 7,2) contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline et 40 mg/ml du bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, substrat de sélection (X-Gal) (Invitrogen, Burlington, ON). Les gélouses ont ensuite

été incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C à la noirceur avant de procéder à la sélection des colonies recombinantes.

Les colonies bactériennes transformées ont été sélectionnées en se basant sur leur résistance à l'ampicilline et leur réaction en présence du substrat chromogène X-Gal. Le vecteur pCR[®]2.1 possède le gène codant pour la β -lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules les bactéries transformées par le vecteur pCR[®]2.1 peuvent croître sur milieu contenant l'ampicilline. Le vecteur pCR[®]2.1 contient le gène *LacZ α* codant pour la sous-unité α de la β -galactosidase. Une fois exprimée, la sous-unité α rétablit l'activité de la β -galactosidase par α -complémentation. Ainsi, les bactéries ayant incorporées le plasmide pCR[®]2.1 peuvent cliver le substrat X-Gal grâce à l'activité de la β -galactosidase rétablie et former des colonies bleues. Toutefois, l'insertion d'un fragment d'ADN dans le plasmide pCR[®]2.1 interrompt le cadre de lecture du gène qui code la sous-unité α de la β -galactosidase, empêchant l' α -complémentation et donc la dégradation du substrat X-Gal. De ce fait, seules les bactéries contenant le vecteur recombinant peuvent former des colonies blanches.

Les plasmides recombinants pCR2.1/ 18S-ITS-A, pCR2.1/ 28S-B et pCR2.1/ 28S-C ont été extraits des bactéries par la méthode de la lyse alcaline en utilisant la trousse "QIAprep Spin Miniprep" (Qiagen, Mississauga, ON). Dix colonies recombinantes ont été prélevées des géloses, séparément ensemencées dans 3 ml de milieu de culture 2x YT contenant 100 μ g/ml d'ampicilline et incubées pendant 16 heures à 37°C sous agitation à 225 rpm. Un volume de 2 ml de chaque culture bactérienne a été prélevé pour extraire l'ADN plasmidique puis centrifugé à 13200 rpm pendant 1 minute. Les culots bactériens ont été suspendus dans 250 μ l de tampon de suspension (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) en présence de 100 μ g/ml ribonucléase A. Les parois des bactéries ont ensuite été digérées avec 250 μ l de tampon de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v)) durant 5 minutes. Les lysats bactériens ont été neutralisés avec 350 μ l de tampon de neutralisation (acétate de potassium 3 M, pH 5,5), puis ont été centrifugés à 13200 rpm pendant 10 minutes.

Les surnageants ont été récupérés puis transférés sur des filtres composés d'une membrane de gel-silice (Qiagen, Mississauga, ON). Les filtres ont ensuite été placés dans des tubes collecteurs, centrifugés à 13200 rpm pendant 1 minute, puis lavés 2 fois avec 750 μ l d'éthanol 75 %. Dans chaque filtre, 50 μ l d'eau distillée ont été ajoutés pour récupérer l'ADN plasmidique par centrifugation à 13200 rpm pendant 2 minutes.

Afin de confirmer la présence des fragments correspondant aux régions 18S-ITS-A, 28S-B et 28S-C, les plasmides recombinants ont été digérés avec l'enzyme de restriction *EcoR* I. Cette digestion entraîne la libération de ces fragments. Une quantité de 0,5 μ g d'ADN plasmidique purifié a été incubée en présence de 5 unités de l'enzyme *EcoR* I et du tampon de digestion 1X (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM) (NewEngland Biolabs Inc., Mississauga, ON). Les produits de la digestion ont ensuite été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %.

Les deux brins des fragments correspondant aux régions 18S-ITS-A, 28S-B et 28S-C des plasmides recombinants ont été séquencés au Centre d'innovation génome Québec de l'Université McGill (Montréal, Québec). Les chromatogrammes générés ont été visualisés grâce au logiciel "*Chromas 1.45*" (Technelysium Pty Ltd., Australie). Les séquences nucléotidiques générées ont été comparées avec celles d'autres isolats d'hyphomycètes présents dans la banque de données "*Genebank*". Elles ont ensuite été enregistrées dans la même base de données. L'alignement et l'analyse des séquences ont été effectués à l'aide du programme bioinformatique "*BioEdit*" version 7.0.9 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA).

1.5.4. Différenciation des isolats par la technique de PCR-RFLP

La technique de PCR-RFLP a été utilisée au niveau de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADNr. Afin de comparer les profils génétiques des amplicons 28S-C des isolats de *B. bassiana*, un échantillon de chacun des amplicons a été digéré par dix endonucléases de restriction : *Acc* I, *Afl* II, *Afl* III, *Ava* I, *Bgl* I, *Bst* XI, *Cla* I, *EcoR* I, *Sal* I et *Sma* I (NewEngland Biolabs Inc., Mississauga, ON). La spécificité des

enzymes de restriction est telle qu'une simple mutation dans la séquence, au niveau de leur site de restriction, suffit pour empêcher la coupure des molécules d'ADN double brin par l'enzyme utilisée. C'est donc cette spécificité qui est mise à profit pour mettre en évidence les polymorphismes de longueur des fragments d'ADN entre les isolats de *B. bassiana*. Pour les digestions, les enzymes sélectionnées digèrent l'ADN total à une fréquence relativement faible ont été utilisées. De plus, ces enzymes reconnaissant des sites de 4 à 8 paires de bases, arrangées en général en palindrome. Le mélange réactionnel a été composé de 0,5 μg d'ADN, 5 unités de l'enzyme de restriction dans du tampon de digestion 1X et de l'eau distillée stérile pour un volume total de 20 μl . Les mélanges préparés ont été incubés à 37°C pendant 1 heure. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % dans du tampon TAE. Les migrations ont été effectuées dans un générateur de courant électrique à une tension de 90 V. Les gels ont ensuite été colorés au bromure d'éthidium, puis les profils de restriction ont été visualisés sous lumière UV. Les photos de gel ont été capturées numériquement et traitées par le logiciel "*Quantity One*".

II. Volet 2 : Essais sur le terrain

Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, indigènes du Québec, ont démontré leur potentiel insecticide contre *L. lineolaris*, *A. signatus* et *O. ovatus*, et leur innocuité sur *C. maculata* au laboratoire. Sur la base des résultats obtenus, des expériences en fraiseraies ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces deux isolats contre les populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier en conditions de terrain. Les essais sur le terrain ont été réalisés dans une fraisière expérimentale du Centre de Recherche Agroalimentaire de Mirabel (CRAM), Mirabel, Québec.

2.1. Cultivar et condition de production

Le cultivar Seascape, fraisier à jours neutres, a été utilisé lors des expériences sur le terrain. Ce cultivar offre une production continue, débutant au printemps et se poursuivant jusqu'aux gelées automnales. Cette caractéristique a permis de suivre la persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana* sur les feuilles de plants traités dès le début et jusqu'à la fin de la floraison. Des jeunes plants du fraisier ont été plantés au début de mai 2004. Les rangées de fraisier ont été séparées par une zone tampon de 10 mètres. La plantation est faite sur des buttes avec un système d'irrigation goutte-à-goutte et l'utilisation d'un paillis de plastique noir. Les buttes et le plastique noir assurent le réchauffement du système racinaire au printemps tandis que le système d'irrigation goutte-à-goutte assure l'approvisionnement continu en eau et en éléments nutritifs. Cette méthode réduit également l'évaporation et diminue de ce fait la quantité d'eau nécessaire. Elle aide à éliminer par ailleurs la compétition exercée par les mauvaises herbes. Aucun fongicide ou herbicide n'a été appliqué pendant les expériences. Les parcelles traitées avec le champignon ont été détruites à la fin des expériences, en accord avec la réglementation fédérale.

2.2. Conditions météorologiques

Les données de l'humidité relative et de la température ont été prises chaque heure durant les expériences. Les radiations solaires (UV), les précipitations et la vitesse du vent ont aussi été notées chaque jour. Les données ont été prises par la station météorologique située à l'aéroport de Mirabel (Mirabel, QC) à moins d'un kilomètre du champ expérimental.

2.3. Formulation à base de *B. bassiana*

Pour chaque isolat de *B. bassiana* utilisé sur le terrain, une formulation a été employée afin de protéger les conidies contre les rayons UV et d'assurer un bon contact entre la spore et la cuticule de l'insecte. Cette formulation a été préparée en utilisant des adjuvants qui n'ont aucun effet nuisible sur l'environnement. La composition de la formulation est basée sur plusieurs revues de littérature (Poprawski et Wraight, 2000 ; Burgues, 1998 ; Jenkins et al. 1998 ; Goettel et Inglis, 1997 ; Jenkins et Goettel, 1997 ; Kerwin et Petersen, 1997 ; Moore et Caudwell, 1997 ; Papierok et Hajek, 1997). Ainsi, elle était composée de 1 % de lait écrémé, 2 % de glycérol, 4 % d'huile de canola et 5 % d'argile. L'huile a été utilisée comme adhésif, favorisant le contact entre les conidies et la cuticule lipophile de l'insecte tout en augmentant l'adhésion des conidies sur le feuillage des plants traités pendant les précipitations (Burgues, 1998). L'argile a été ajoutée à la formulation pour protéger les conidies contre les rayons UV (Butt, 2002). Le glycérol a été également additionné à la formulation à titre d'humectant, de nutriment et d'adhésif, alors que l'ajout du lait écrémé a servi en tant que nutriment et humectant (Burgues, 1998). Les conidies de *B. bassiana* provenaient d'une production réalisée au laboratoire quelques jours avant les applications sur le terrain. Les préparations fongiques ont été mélangées avec la formulation finale sur le terrain juste avant leurs applications.

2.4. Effet de *B. bassiana* sur les populations de la punaise terne en cages

L'efficacité insecticide des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* contre les adultes de la punaise terne a été évaluée sur le terrain en cages en mousseline (1m de hauteur, 0,8 m de largeur et 1,2 m de longueur). L'objectif de l'expérience était de comparer le pourcentage de mortalité des insectes, d'une part, entre les isolats et d'autre part, entre les types d'applications. Pour réaliser cette expérience, un dispositif à 5 blocs aléatoires a été établi sur une superficie de 0,5 ha. Les produits ont été assignés de façon aléatoire aux différentes parcelles d'un bloc. Des traitements avec les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* ont été appliqués à un taux de 1×10^{13} conidies/ha. Un traitement avec la formulation seule a été appliqué dans les parcelles témoins. Deux types d'application ont été réalisés. Le traitement indirect qui consiste à l'application fongique sur le feuillage avant d'introduire les insectes et le traitement direct qui consiste à l'application fongique après leur introduction. Pour chaque cage, soixante-dix adultes de la punaise terne ont été introduits sur les plants de fraisier (figure 13).

Les traitements ont été effectués à l'aide d'un pulvérisateur à dos, modèle SRS 600 (SHURflo, Cypress, CA). Au septième jour suivant l'application, les plants du fraisier ont été secoués et les insectes se trouvant sur le feuillage et sur le paillis de plastique ont été dépistés et analysés au laboratoire. La mortalité des insectes a été notée. Les insectes morts ramassés ont été gardés séparément sur un papier filtre humide dans des boîtes de Pétri à 25°C, 70 % HR et à l'obscurité pendant 14 jours pour favoriser la croissance fongique.

Les expériences ont été réalisées en juillet 2004 et juillet 2005. Tous les traitements ont été appliqués le matin. Aucune précipitation n'a été enregistrée durant les jours d'application et la vitesse du vent était faible (< 3 m/s). Pour la durée de l'expérience réalisée en juillet 2004, la température moyenne et l'humidité relative ont été respectivement de $20,7^{\circ}\text{C} \pm 3,8$ et de $72,1 \% \pm 18,0$. Les précipitations ont été



Figure 13. Design expérimental et disposition des cages dans les rangées du fraisier.

Un dispositif à blocs aléatoires a été établi en champ de fraisier. Des cages (1m de hauteur, 0,8 m de largeur et 1,2 m de longueur) en moustiquaire ont été installées. Soixante-dix adultes de la punaise terre ont été introduits dans chaque cage.

de 98 mm et le rayonnement solaire a été de $22,8 \pm 7,8$ MJ/m²/j. Alors que durant l'expérience réalisée en juillet 2005, la température moyenne et l'humidité relative ont été respectivement de $22,2^{\circ}\text{C} \pm 4,6$ et de $68,4 \% \pm 16,8$. Les précipitations ont été de 19 mm et le rayonnement solaire a été de $25,5 \pm 9,0$ MJ/m²/j.

Les données de mortalité des insectes ont été exprimées en moyennes avec les écarts-types. Le pourcentage de mortalité des insectes a été corrigé en fonction des témoins en appliquant la formule d'Abbott (1925). Les données de mortalité des insectes ont été assujetties à des comparaisons par le test *t* de Student ($\alpha = 0,05$) (SAS Institute, 2002) afin de déterminer s'il y avait des différences significatives, d'une part, entre les isolats et d'autre part, entre les traitements.

2.5. Expériences en parcelles

L'objectif des expériences en parcelles était d'évaluer la viabilité des conidies de *B. bassiana* appliquées sur le feuillage du fraisier en fonction du temps et de démontrer la persistance de l'activité insecticide de celles-ci contre les populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier. De plus, des applications multiples, sur une base hebdomadaire, ont été effectuées afin de contrôler l'abondance des populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* permettant ainsi une réduction des dommages et de pertes de rendement en fruits causés par ces ravageurs.

2.5.1. Design expérimental et applications fongiques

L'efficacité insecticide des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* contre les populations de la punaise terne a été évaluée sur le terrain en juillet et août 2005. Un dispositif à blocs aléatoires comportant quatre réplicats a été utilisé. Chaque bloc était composé de 5 parcelles associées aux traitements suivants : 1) isolat *INRS-IP* à un taux de 1×10^{11} conidies/ha ; 2) isolat *INRS-IP* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha ; 3) isolat *INRS-CFL* à un taux de 1×10^{11} conidies/ha ; 4) isolat *INRS-CFL* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha ; et 5) témoin, qui consistait à recevoir la formulation sans *B.*

bassiana. Chaque parcelle mesurait 10 mètres de long et a été séparée par une zone tampon de 10 mètres. Environ 90 plants du fraisier ont été dénombrés par parcelle. Chaque traitement a été pulvérisé quatre fois à un intervalle de 7 jours à l'aide d'un pulvérisateur à dos.

Le même protocole expérimental a été utilisé pour évaluer l'efficacité insecticide de *B. bassiana* contre les populations de l'anthonome de la fleur du fraisier en juin 2006. Cependant, seuls les traitements à un taux de 1×10^{13} conidies/ha ont été appliqués. Lors des expériences, les traitements ont été pulvérisés 3 fois sur une base hebdomadaire.

Toutes les applications ont été réalisées le matin. Aucune précipitation n'a eu lieu durant les jours d'application et la vitesse du vent était faible (< 4 m/s). En juillet et août 2005, la température moyenne et l'humidité relative ont été respectivement de $21,8^{\circ}\text{C} \pm 4,4$ et de $71,1 \% \pm 18,5$. Les précipitations totales ont été de 121 mm et le rayonnement solaire a été de $17,92 \pm 5,7$ MJ/m²/j. Alors qu'en juin 2006, la température moyenne et l'humidité relative ont été respectivement de $21,2^{\circ}\text{C} \pm 4,3$ et de $70,3 \% \pm 14,6$. Les précipitations ont été de 136 mm et le rayonnement solaire a été de $14,0 \pm 10,7$ MJ/m²/j.

2.5.2. Viabilité des conidies de *B. bassiana*

La viabilité des conidies de *B. bassiana* a été déterminée en effectuant le décompte des colonies formées à partir de conidies appliquées sur le feuillage. Les feuilles ont été prélevées des plants de fraisier le jour de la pulvérisation et ensuite à deux reprises à un intervalle de 3 jours. Les échantillons étaient gardés à 4°C avant leur utilisation au laboratoire. Des tubes cylindriques en cuivre ont été utilisés pour découper un disque de 3 cm de diamètre par feuille échantillonnée. Les conidies de *B. bassiana* ont été détachées du disque foliaire en utilisant une technique de lavage tels que décrit par Inglis et al. (1993). Pour chaque suspension obtenue suite au lavage, la densité de conidies par unité de surface foliaire a été quantifiée en utilisant la

méthode d'étalement sur milieu gélosé (Goettel et al. 2000 ; Goettel et Inglis, 1997). Pour chaque suspension, des dilutions en série ont été réalisées, et 500 µl de chaque dilution ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant 25 ml du milieu sélectif ODA. Le nombre de colonies formées ("*colony forming units*", CFU) a été compté sur chaque boîte de Pétri permettant de déterminer la densité de conidies par unité de surface foliaire.

Les données du nombre de colonies formées ont été exprimées en moyennes avec les écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du progiciel "*JMP IN*" version 5.0 (SAS Institute, 2002). La normalité et l'homoscédasticité des données expérimentales ont été vérifiées par le test de Shapiro-Wilk. La viabilité des colonies formées de *B. bassiana* a été analysée en utilisant une analyse de variance (Anova, $\alpha = 0,05$) avec quatre critères de classification (bloc, jour d'application, jour d'échantillonnage et traitement). La comparaison du nombre de colonies formées entre les traitements a été effectuée par le test de Tukey-Kramer.

2.5.3. Persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana*

Suite à l'évaluation de la viabilité des conidies de *B. bassiana*, un des paramètres à évaluer était la détermination de la persistance de l'activité insecticide des conidies appliquées sur le feuillage en fonction du temps. Des expériences ont été réalisées au laboratoire pour déterminer la persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana* contre les populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier. Ces expériences ont consisté à exposer des adultes au feuillage collecté dans les parcelles expérimentées. Des feuilles traitées à un taux de 1×10^{13} conidies/ha et des feuilles non traitées (témoins) ont été récoltées aléatoirement de plants du fraisier le jour de la pulvérisation et ensuite à deux reprises à un intervalle de 3 jours. Toutes les feuilles collectées ont été déposées individuellement dans des sacs en plastique et placées à 4°C jusqu'à leur utilisation pour les épreuves biologiques. Pour chaque espèce, 20 adultes ont été transférés dans des boîtes de Pétri

(150 x 15 mm) contenant une des feuilles récoltées, puis placés dans une chambre de croissance à 25°C, 70% d'humidité relative et une photopériode de 16 : 08 heures (clarté : noirceur). Des fleurs du fraisier ont été ajoutées dans les boîtes de Pétri comme source de nourriture. Les expériences ont été répétées trois fois. La mortalité des adultes a été enregistrée quotidiennement pendant 7 jours pour *L. lineolaris* et 14 jours pour *A. signatus*. Les insectes morts ont été retirés et maintenus dans une chambre humide à 25°C, 70% HR et à l'obscurité pendant 14 jours pour favoriser la croissance fongique et observer l'apparition de muscardine.

Les données de mortalité des insectes ont été exprimées en moyennes avec les écarts-types. Le pourcentage de mortalité des insectes a été corrigé en fonction des témoins en appliquant la formule d'Abbott (1925). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du progiciel "JMP IN" version 5.0 (SAS Institute, 2002). La persistance de l'activité insecticide a été analysée en utilisant une analyse de variance (Anova, $\alpha = 0,05$) avec quatre critères de classification (bloc, jour d'application, jour d'échantillonnage et traitement). La normalité et l'homoscédasticité des données expérimentales ont été vérifiées par le test de Shapiro-Wilk. La comparaison de la mortalité des insectes entre les traitements a été effectuée par le test de Tukey-Kramer.

L'outil moléculaire développé lors de cette recherche a été utilisé afin d'identifier les champignons retrouvés chez les insectes morts. Premièrement, le champignon a été prélevé sur les cadavres d'insectes à l'aide des bâtonnets stériles et étalé sur milieu sélectif ODA. Par la suite, dès l'apparition de la première colonie, elle a été isolée et inoculée dans le milieu liquide SDB et incubée à 25°C pendant 7 jours à 160 rpm afin de produire massivement les spores. Ces dernières ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN génomique selon la technique décrite à la section 1.5.1. La technique de PCR-RFLP a ensuite été utilisée pour comparer les profils de restriction des isolats récoltés à celui de l'isolat appliqué comme décrit à la section 1.5.4 de matériel et méthodes.

2.5.4. Survie des populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*

L'effet des différents traitements à base de *B. bassiana* sur la survie et l'abondance des populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* a été évalué sur le terrain. Due à l'activité de vol de l'adulte de la punaise terne, seules les nymphes ont été considérées lors du dénombrement de cet insecte. Le décompte de nymphes a été réalisé le jour avant la première application, puis à un intervalle de 3 jours jusqu'à la fin de l'expérience. Les dénombrements ont été réalisés sur cinq hampes florales de fraisier choisies aléatoirement. Les hampes florales utilisées étaient identifiées afin d'éviter les doubles comptes sur une même grappe. Chaque grappe a été secouée trois fois au-dessus d'une boîte blanche en plastique (2 L). Le même protocole expérimental a été utilisé pour le dénombrement des adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier.

Les données du dénombrement d'insectes ont été exprimées en moyennes avec les écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du progiciel "JMP IN" version 5.0 (SAS Institute, 2002). La normalité et l'homoscédasticité des données expérimentales ont été vérifiées par le test de Shapiro-Wilk. Les effets des traitements et des interactions de temps (jour de dénombrement) sur l'abondance des populations de *L. lineolaris* et *A. signatus* ont été analysés en utilisant des analyses de variance à mesures répétées (Anova) (SAS Institute, 2002).

2.5.5. Dommages et pertes associés aux attaques de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*.

Le rendement des cultures est primordial pour les producteurs. La punaise terne cause des dépressions en forme d'entonnoir et de cicatrices liégeuses affectant la qualité du fruit (Chagnon et al. 1990). Le pourcentage des dommages aux fruits associé au comportement alimentaire de cet insecte a été évalué dans toutes les parcelles. À la fin de l'expérience, 40 hampes florales ont été choisies au hasard dans chaque parcelle pour évaluer le pourcentage de fruits endommagés par *L. lineolaris*.

L'anthonome de la fleur du fraisier engendre de pertes de rendement de nature quantitative. Cet insecte pond ses œufs à l'intérieur de la fleur et coupe par la suite le pédoncule floral causant ainsi la chute du bouton floral. Le décompte des boutons floraux et le dénombrement des adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier ont été réalisés simultanément. Les hampes florales ont été secouées vigoureusement trois fois au-dessus d'une boîte blanche en plastique (2 L). Les boutons coupés ont été ramassés puis dénombrés. Les pertes de rendement causées par les attaques de l'anthonome de la fleur ont été exprimées en pourcentage de boutons floraux coupés par plant.

Les données du nombre de fruits endommagés et du nombre de boutons floraux coupés ont été exprimées en pourcentages avec les écarts-types. Les dommages et les pertes de rendement en fruits causés par les populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* ont été comparés entre les parcelles traitées et les parcelles témoins en utilisant une analyse de variance (Anova, $\alpha = 0,05$) à deux critères de classification (bloc et traitement) (SAS Institute, 2002).

Résultats

I. Volet 1 : Expériences au laboratoire

1.1. Criblage des isolats de *B. bassiana* sur les insectes

Des épreuves biologiques ont été réalisées afin de déterminer la pathogénicité de plusieurs isolats de *B. bassiana* contre les principaux insectes ravageurs du fraisier. Chaque isolat avait des effets différents sur les trois ravageurs étudiés. Il n'y avait aucune relation entre le niveau de la pathogénicité et l'origine des isolats. Tous les isolats de *B. bassiana* se sont avérés pathogènes contre les trois insectes ravageurs étudiés.

Les résultats ont montré que tous les isolats de *B. bassiana* ont été pathogènes aux adultes de la punaise terne après sept jours suivant leur inoculation avec une concentration de 1×10^7 conidies/ml (figure 14). Cependant, une variabilité de la susceptibilité de cet insecte en fonction des isolats a été observée. Pour tous les isolats, la mortalité cumulative augmente en fonction du temps, mais à des taux différents. La moitié des isolats a provoqué une mortalité supérieure à 83 % chez les populations d'adultes de *L. lineolaris* et seulement trois isolats ont montré une mortalité inférieure à 55 %. Des mortalités supérieures à 86 % ont été observées chez les populations d'adultes de cet insecte en utilisant les isolats *INRS-CFL*, *ARSEF2988* et *LRS49*. L'isolat *INRS-CFL* a été le plus pathogène avec 90 % de mortalité et l'isolat *ARSEF1516* le moins pathogène avec 38 % de mortalité chez les populations d'adultes de *L. lineolaris* ($F = 48,19$; $df = 16, 50$ et $p < 0,01$) (figure 14).

Le criblage des isolats de *B. bassiana* contre les adultes d'*A. signatus* a provoqué des mortalités supérieures à 70 % quatorze jours suivant leur inoculation avec une concentration de 1×10^7 conidies/ml (figure 15). L'isolat *INRS-CFL* a été le plus pathogène avec 88 % de mortalité et l'isolat *LRS33* le moins pathogène avec 18 % de mortalité chez les populations d'adultes d'*A. signatus* ($F = 26,83$; $df = 16, 50$ et $p < 0,01$) (figure 15).

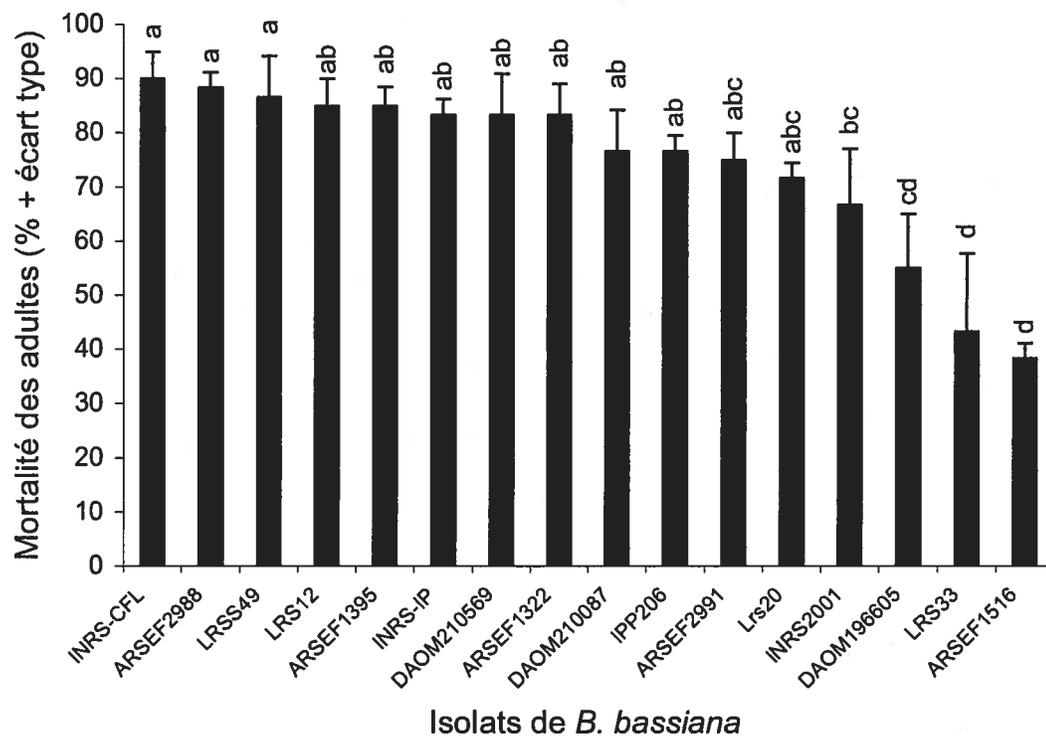


Figure 14. Mortalité des adultes de *Lygus lineolaris* traités avec plusieurs isolats de *Beauveria bassiana* après 7 jours suivant l'inoculation.

Les rectangles avec des lettres différentes sont significativement différents (test de Tukey HSD ; $p < 0,05$).

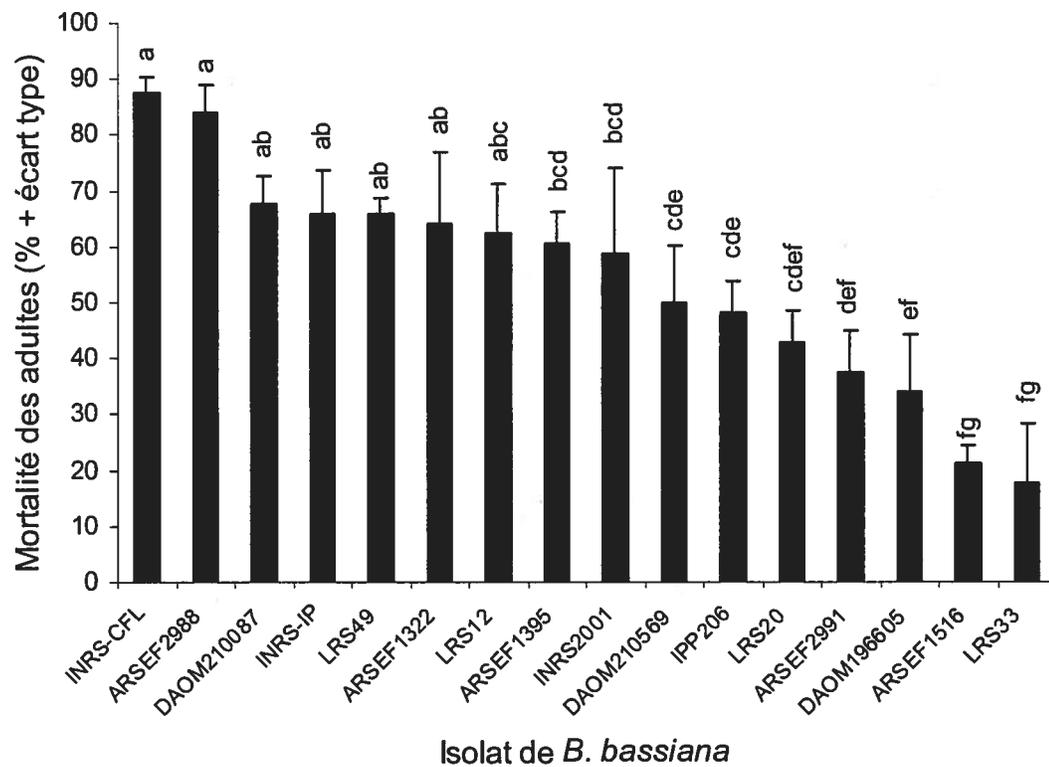


Figure 15. Mortalité des adultes d'*Anthonomus signatus* traités avec plusieurs isolats de *Beauveria bassiana* après 14 jours suivant l'inoculation.

Les rectangles avec des lettres différentes sont significativement différents (test de Tukey HSD ; $p < 0,05$).

Les résultats ont démontré que la majorité des isolats de *B. bassiana* testés a causé des mortalités élevées chez les populations d'adultes d'*O. ovatus* après quatorze jours suivant leur inoculation avec une concentration de 1×10^7 conidies/ml ($F = 44,51$; $df = 16, 50$ et $p < 0,01$) (figure 16). Les populations d'adultes d'*O. ovatus* semblaient être plus susceptibles à l'isolat *ARSEF2988*, suivi des isolats *INRS-CFL* et *ARSEF1395*. Ces isolats ont causé des mortalités supérieures à 90 %. Les insectes morts avaient une croissance fongique sur leur cuticule. Aucune mortalité attribuable à l'infection par *B. bassiana* ne s'est produite chez les insectes témoins.

Trois isolats, *ARSEF2991*, *ARSEF2988* et *ARSEF1395*, se sont avérés hautement pathogènes chez les adultes de *C. maculata* après quatorze jours suivant leur inoculation avec une concentration de 1×10^7 conidies/ml, causant des mortalités supérieures à 45 %. Une différence significative de la mortalité a été observée chez ces trois isolats par rapport aux autres isolats (Tukey HSD ; $p < 0,05$) (figure 17). Treize isolats ont démontré un faible impact sur les adultes de la coccinelle maculée et ils ont causé des mortalités inférieures à 10 %. Les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* entraînaient de faibles mortalités des populations de la coccinelle maculée. En effet, ces deux isolats ont causé respectivement des mortalités de 3 et de 6 % chez les populations d'adultes de *C. maculata* après quatorze jours suivant leur inoculation avec une concentration de 1×10^7 conidies/ml.

1.2. Potentiel insecticide et virulence de *B. bassiana* contre *L. lineolaris*, *A. signatus* et *O. ovatus*

Le potentiel insecticide et la virulence des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* contre les adultes et les nymphes de la punaise terne, les adultes d'anthonomes et de charançons des racines du fraisier ont été évalués en déterminant les valeurs de CL_{50} et de temps moyen de survie (tableau 3). Ces deux isolats ont démontré un potentiel insecticide intéressant contre les ravageurs étudiés. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux isolats concernant leur virulence sur chaque insecte

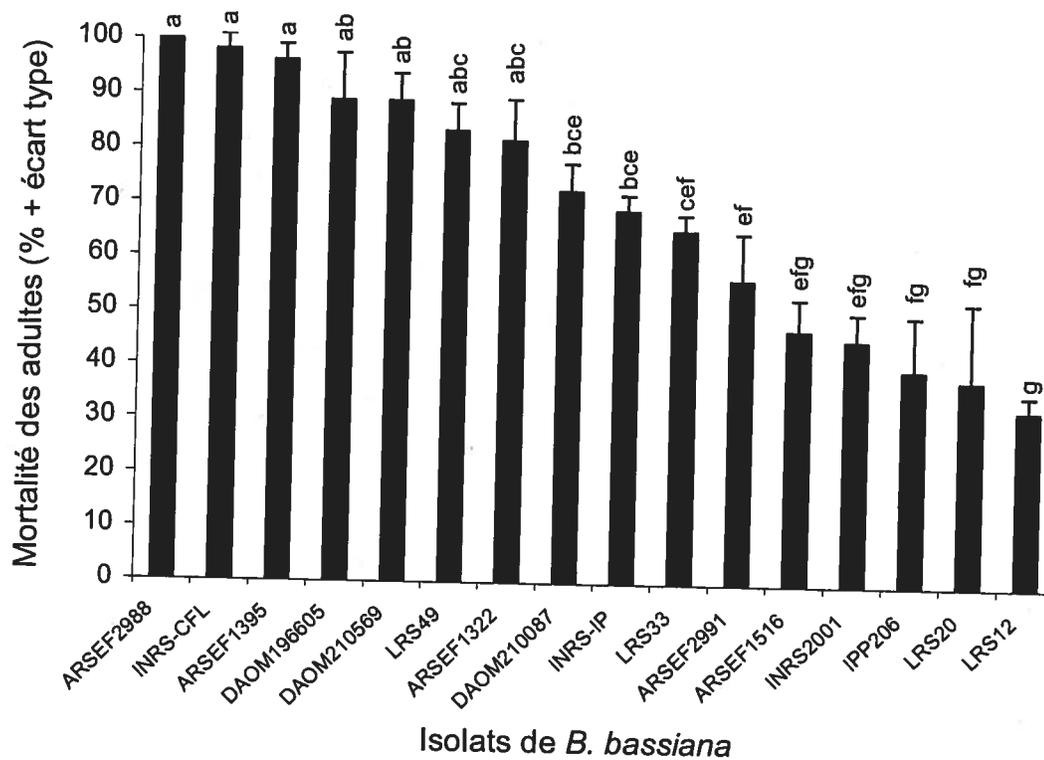


Figure 16. Mortalité des adultes d'*Otiorhynchus ovatus* traités avec plusieurs isolats de *Beauveria bassiana* après 14 jours suivant l'inoculation.

Les rectangles avec des lettres différentes sont significativement différents (test de Tukey HSD ; $p < 0,05$).

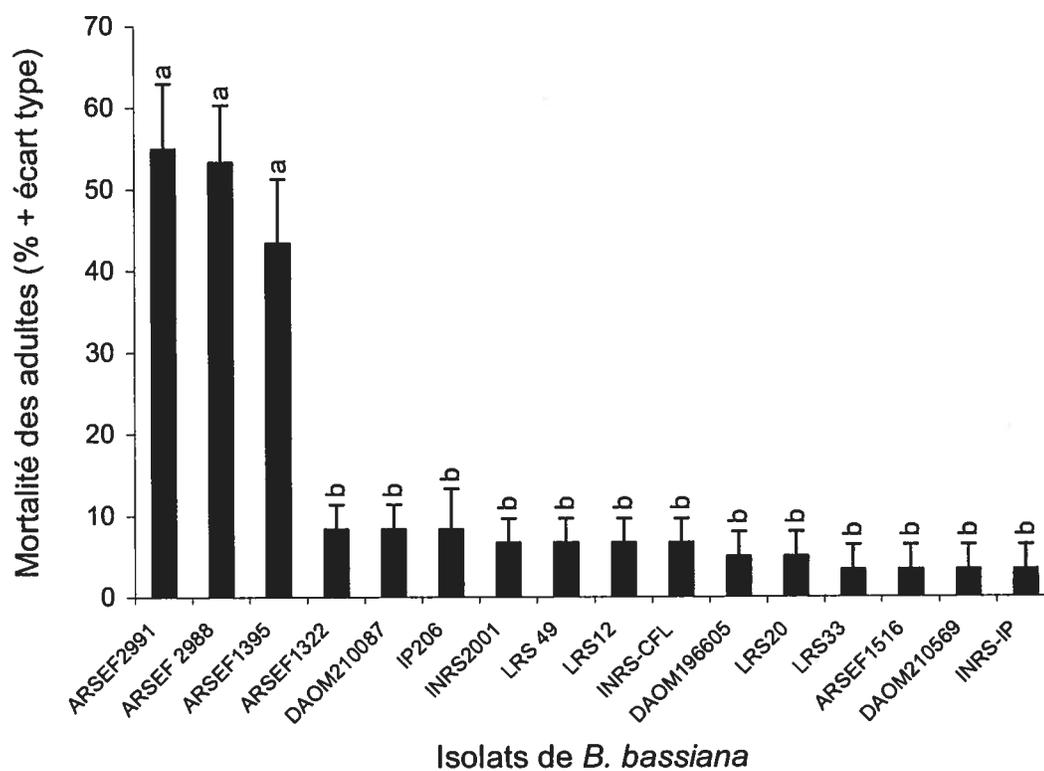


Figure 17. Mortalité des adultes de *Coleomegilla maculata* traités avec plusieurs isolats de *Beauveria bassiana* après 14 jours suivant l'inoculation.

Les rectangles avec des lettres différentes sont significativement différents (test de Tukey HSD ; $p < 0,05$).

Tableau 3. Potentiel insecticide et virulence des isolats INRS-CFL et INRS-IP de *Beauveria bassiana* contre *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* et *Otiorhynchus ovatus*.

Isolat	Insecte	Stade de l'insecte	CL ₅₀ (Conidies/ml)	95% IC		TMS ± SE (Jours)
				Inférieur	Supérieur	
INRS-CFL	<i>L. lineolaris</i>	5 ^{ème} stade nymphe	2,2 x 10 ⁵	6,1 x 10 ⁴	5,8 x 10 ⁵	4,41 ± 0,37
		Adulte	5,3 x 10 ⁵	9,4 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁶	4,37 ± 0,36
INRS-IP	<i>L. lineolaris</i>	5 ^{ème} stade nymphe	5,7 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁶	3,98 ± 0,34
		Adulte	7,8 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁴	5,1 x 10 ⁶	4,46 ± 0,33
INRS-CFL	<i>A. signatus</i>	Adulte	1,8 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁷	7,56 ± 0,60
INRS-IP		Adulte	1,0 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁷	7,66 ± 0,51
INRS-CFL	<i>O. ovatus</i>	Adulte	9,9 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁷	8,1 x 10 ⁸	8,29 ± 0,62
INRS-IP		Adulte	4,7 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	5,3 x 10 ⁸	7,72 ± 0,44

Les valeurs de LC₅₀ ont été estimées après 7 jours suivant l'inoculation et les valeurs de TMS ont été déterminées à une concentration de 1x10⁸ conidies/ml.

étudié. Cependant, la susceptibilité au *B. bassiana* est différente selon l'espèce de l'insecte. Les résultats démontrent que les nymphes (cinquième stade) et les adultes de *L. lineolaris* ont été plus susceptibles au *B. bassiana* que les adultes d'*A. signatus* et d'*O. ovatus* (tableau 3).

Pour tous les traitements fongiques, une augmentation proportionnelle de la mortalité d'insectes a été observée en fonction du temps et des concentrations d'inoculum appliquées. Les valeurs de LC_{50} des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* ont été respectivement de $7,8 \times 10^5$ et de $5,3 \times 10^5$ conidies/ml contre les populations d'adultes de *L. lineolaris* après sept jours suivant l'inoculation. D'autre part, les valeurs du TMS ont été respectivement de 4,46 et de 4,37 jours chez les populations d'adultes de *L. lineolaris* soumises aux mêmes isolats à une concentration de 1×10^8 conidies/ml (tableau 3). Les résultats ont également démontré que les nymphes de cet insecte sont aussi susceptibles à ces deux isolats. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la susceptibilité des nymphes et des adultes de *L. lineolaris* au *B. bassiana*.

Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* ont démontré un potentiel insecticide intéressant contre les populations d'adultes d'*A. signatus* et d'*O. ovatus* avec des valeurs de LC_{50} de $1,0 \times 10^7$ à $9,9 \times 10^7$ conidies/ml après sept jours suivant l'inoculation. Les temps moyens de survie ont démontré que ces deux isolats sont virulents contre les populations d'adultes d'*A. signatus* et d'*O. ovatus*. Les valeurs de TMS ont été de 7,56 à 8,29 jours à une concentration de 1×10^8 conidies/ml (tableau 3). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la susceptibilité des deux insectes au même isolat de *B. bassiana*.

1.3. Caractérisation moléculaire des isolats de *B. bassiana*

Parallèlement aux épreuves biologiques en laboratoire et aux expériences en champ, une caractérisation moléculaire des isolats de *B. bassiana* a été réalisée. À partir de l'ADN ribosomal de six isolats de *B. bassiana*, les variations au niveau des

séquences nucléotidiques des gènes 18S, 5,8 et 28S et des régions ITS1 et ITS2 ont été étudiées. Les travaux ont permis d'amplifier (tableau 4), de séquencer et d'identifier, pour la première fois, les séquences nucléotidiques complètes de l'ADNr de six isolats de *B. bassiana*. Les séquences générées de chaque isolat ont été enregistrées dans la base de données "Genebank". Dans un premier temps, il a été démontré que l'ADNr contient des régions variables et d'autres conservées. La région 18S de l'ADN ribosomal a été la sous-unité la plus conservée avec une homologie de 99,5 % entre les six isolats étudiés. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène 18S a révélé quelques substitutions et / ou insertions chez les isolats et la présence d'un intron de 387 pb uniquement chez l'isolat *DAOM210087* (tableau 5). De plus, l'analyse des séquences du gène 5,8S et des espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 a permis de distinguer *B. bassiana* des autres espèces fongiques du genre *Tolypocladium*, *Metarhizium* et *Verticillium*.

L'extrémité 5' du gène 28S de l'ADNr a été 100 % homologue entre les isolats étudiés. Cependant, l'extrémité 3' du gène 28S a accumulé beaucoup de variabilité et elle peut être utilisée pour différencier les espèces ou même les isolats de la même espèce. Par exemple, des variations au niveau des séquences nucléotidiques du gène 28S ont révélé une distinction entre les isolats étudiés de *B. bassiana*. Trois introns de groupe I ont été identifiés (tableau 6). Ceci explique la variation de la taille des fragments amplifiés (822 à 1754 pb) (figure 18) de l'extrémité 3' de ce gène par la présence ou l'absence des introns chez les isolats. Cette variation a permis d'établir une approche basée sur la comparaison des profils de restriction suite à une digestion par des endonucléases qui vont couper à des sites spécifiques dans l'extrémité 3' du gène 28S.

Tableau 4. Amplification par PCR (pb) de la petite et grande sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de *Beauveria bassiana*.

Isolat	18S-ITS	5'-28S	28S-3'
INRS-IP	2315	2178	1652
INRS-CFL	2315	2178	1265
ARSEF2991	2315	2178	1623
DAOM216540	2315	2178	1623
DAOM195005	2315	2178	822
DAOM210087	2703	2178	1754

Petite sous-unité : gène 18S, région ITS1, gène 5,8S et région ITS2 (18S-ITS) ;
 Grande sous-unité : gène 28S (extrémités 5'-28S et 28S-3').

Tableau 5. Analyse génomique de la petite sous-unité de l'ADN ribosomal des isolats de *Beauveria bassiana*.

Petite sous-unité	Position	INRS-IP	INRS-CFL	ARSEF 2991	DAOM 216540	DAOM 195005	DAOM 210087
18S	409	G	G	G	G	G	A
	732	A	G	A	A	A	A
	970	G	A	A	A	A	A
	1028	A	G	G	G	G	G
Intron	1145...1532	----	----	----	----	----	387 bp
	1735	G	G	A	A	G	G
ITS 1	2181	T	T	T	T	T	C
	2204	T	T	T	C	T	T
	2275	T	T	T	T	T	C
	2379	C	C	T	T	C	T
5,8S	2453	C	T	C	C	C	C
	2495	C	C	T	T	C	T
ITS 2	2501	T	T	G	G	T	T

Les lettres indiquent des substitutions et / ou des insertions ; ---- : Absence de l'intron.

Tableau 6. Distribution des introns de groupe I présents dans le gène 28S de l'ADN ribosomal des isolats de *Beauveria bassiana*.

Isolat	Type et position d'introns du Groupe I		
	Type 1 (388 pb)	Type 2 (505 pb)	Type 3 (358 pb)
INRS-IP	73-461 1183-1571		
INRS-CFL	73-461		
ARSEF2991	73-461		661-1019
DAOM216540	73-461		661-1019
DAOM195005			
DAOM210087	73-461	1050-1555	

Trois types d'introns de groupe I ont été identifiés. Les numéros indiquent les positions (5'-3') des introns présents dans le gène 28S de l'ADNr des isolats de *B. bassiana*.

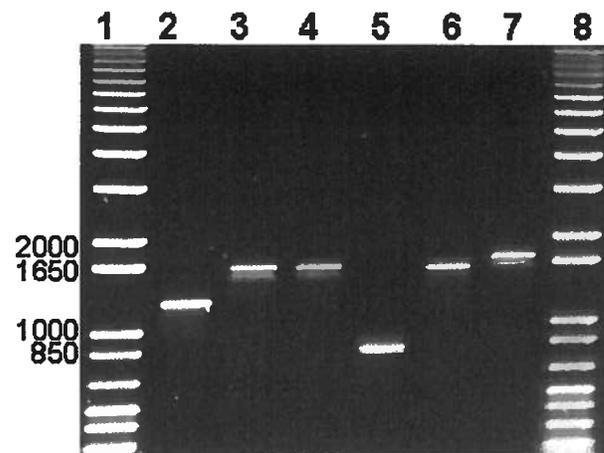


Figure 18. Produits de l'amplification par PCR de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal de *Beauveria bassiana*.

Les amorces spécifiques 28S-C FW1 et 28S-C RV1 ont été utilisées pour amplifier l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADNr. Les produits de PCR ont été visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose de 0,8 %. Les numéros indiquent les amplicons des isolats : *INRS-CFL* (2), *ARSEF2991* (3), *DAOM216540* (4), *DAOM195005* (5), *INRS-IP* (6) et *DAOM210087* (7). Marqueur de masse moléculaire de 1 kb (1 et 8).

La moitié des endonucléases utilisés a été capable de digérer les produits de PCR et d'exhiber un polymorphisme entre les six isolats. Les profils de restrictions produits par les endonucléases *Sal* I, *Acc* I, et *Afl* II ont été peu discriminatoires entre les isolats tandis que ceux produits par les enzymes *Cla* I (figure 19), *Sma* I et *EcoR* I ont été fortement discriminatoires (tableau 7). Cependant, Il est à noter que des profils de restriction similaires ont été notés chez les isolats *ARSEF2991* et *DAOM216540* (tableau 6 et 7 ; figure 19). D'ailleurs, ces deux isolats avaient des séquences nucléotidiques 100 % homologues.

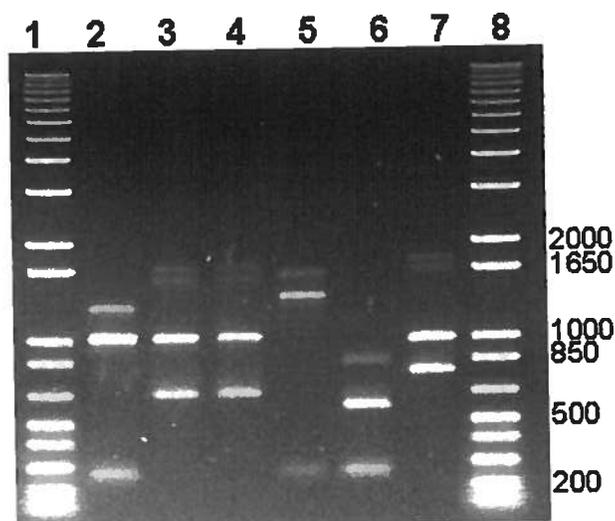


Figure 19. Profils de restriction de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal de *Beauveria bassiana* par l'enzyme *Cla* I.

Les produits de PCR de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADNr ont été soumis à une digestion enzymatique par l'endonucléase *Cla* I. Les fragments d'ADN obtenus ont été visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose de 1,2 %. Les numéros indiquent les profils de restriction des isolats : *INRS-CFL* (2), *ARSEF2991* (3), *DAOM216540* (4), *INRS-IP* (5), *DAOM195005* (6) et *DAOM210087* (7). Marqueur de masse moléculaire de 1 kb (1 et 8).

Tableau 7. Les tailles (bp) des fragments d'ADN obtenues après digestion de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal des isolats de *Beauveria bassiana* par les endonucléases de restriction.

Isolat	Taille des fragments avec chaque enzyme									
	<i>Acc</i> I	<i>Afl</i> II	<i>Afl</i> III	<i>Ava</i> I	<i>Bgl</i> I	<i>Bst</i> XI	<i>Cla</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Sma</i> I
INRS-IP	705	916	1333	759	1260	1027	1366	1152	1262	834
	486	474	321	515	377	627	257	502	392	820
	284	216		307	17					
	107	48		73						
	72									
INRS-CFL	781	745	944	757	873	640	1008	1150		832
	484	473	321	435	392	625	257	115		433
		48		73						
ARSEF2991	668	745	1302	1115	1231	998	1010	1508	929	1190
	484	473	321	435	392	625	627	115	668	433
	231	48		73					25	
	215									
	25									
DAOM216540	668	745	1302	1115	1231	998	1010	1508	929	1190
	484	473	321	435	392	625	627	115	668	433
	231	48		73					25	
	215									
	25									
DAOM195005		745		435		640	565	707		433
		77		387		182	257	115		389
DAOM210087	1022		1325	658	1290	1146	991	1638		939
	467		320	376	464	608	763	116		450
	265		109	365						365
				253						
			72							

II. Volet 2 : Essais sur le terrain

2.1. Effet de *B. bassiana* sur les populations de la punaise terne en cages

L'étude en laboratoire de 16 isolats de *B. bassiana*, isolés de divers hôtes et d'origines géographiques différentes, a permis de sélectionner les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* pour la réalisation des expériences sur le terrain. Les résultats ont démontré le potentiel insecticide de *B. bassiana* contre les populations d'adultes de la punaise terne en conditions de cages. Pour chaque isolat, les deux traitements directs et indirects causent des mortalités élevées chez les populations d'adultes de *L. lineolaris* (figure 20). Cependant, il n'y avait aucune différence significative de la mortalité des insectes entre le type d'application (directe versus indirecte) pour chaque isolat (test Student, $\alpha = 0,05$) et entre les isolats pour chaque type d'application (test Student, $\alpha = 0,05$).

En 2004, les applications directes des préparations fongiques à base des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* sur les cages en présence de punaises ternes ont causé respectivement des mortalités élevées chez les populations d'adultes de 86 et de 83 %. Alors qu'en 2005, les mêmes traitements ont provoqué respectivement des mortalités de 88 et de 87 %. D'autre part, en 2004, les applications indirectes des préparations fongiques à base des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* sur les cages en absence de punaises ternes ont aussi causé respectivement des mortalités de 78 et de 75 % chez les populations d'adultes de *L. lineolaris*. Alors qu'en 2005, les mêmes traitements ont provoqué respectivement des mortalités élevées de 86 et de 83 %. Les insectes morts par *B. bassiana* ont montré une croissance de mycélium sur la surface de leurs corps.

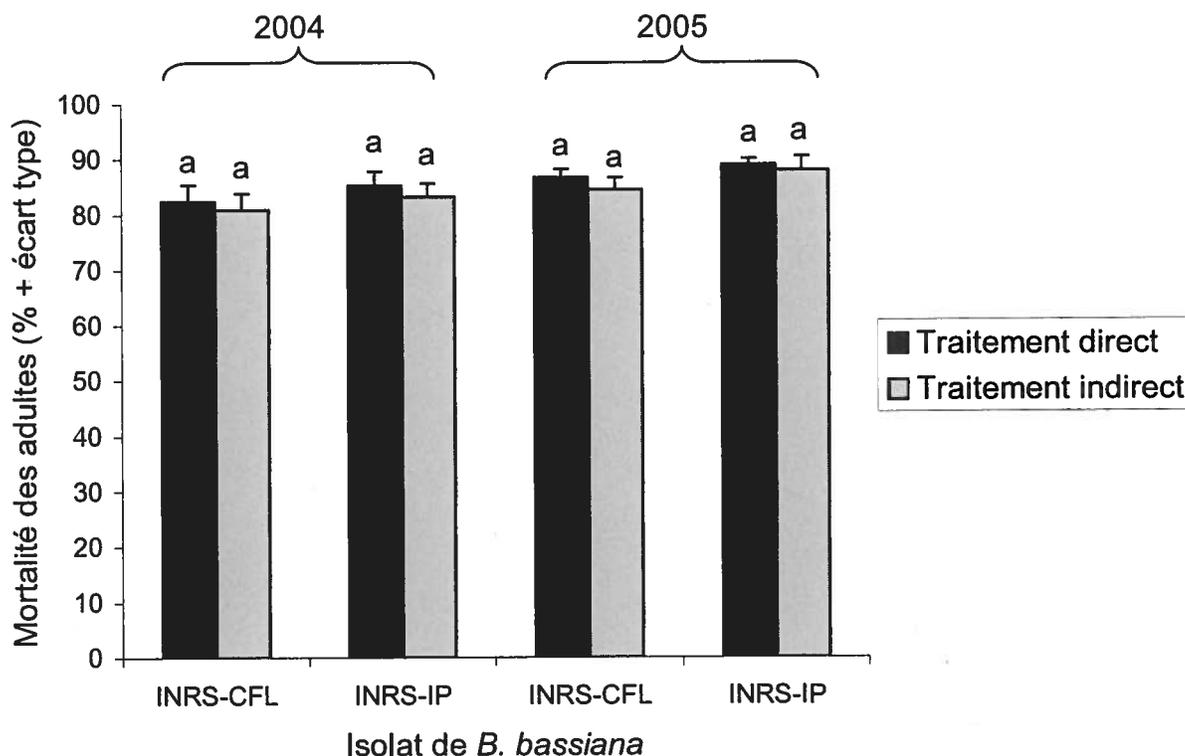


Figure 20. Mortalité, sous cage, des adultes de *Lygus lineolaris* infectés par les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *Beauveria bassiana*, 7 jours suivant l'application à un taux de 1×10^{13} conidies/ha en fraisières.

Traitement indirect : application des conidies de *B. bassiana* sur le feuillage avant l'introduction des insectes ; Traitement direct : application de conidies après l'introduction des insectes. L'expérience a été réalisée en 2004 et 2005. Pour chaque année d'expérimentation, il n'y avait aucune différence significative de la mortalité des insectes entre les isolats et entre les traitements (test *t* de Student, $\alpha = 0,05$).

2.2. Expériences en parcelles

2.2.1. Viabilité des conidies de *B. bassiana*

La viabilité des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* en fonction du temps a été évaluée après leur application sur le feuillage du fraisier. Après les applications, les populations des colonies formées (CFU) des deux isolats ont diminué graduellement avec le temps (Anova, $df = 9, 287$; $F = 494,91$; $p < 0,0001$) (figure 21). Après trois jours suivant l'application, on observait des réductions significatives des populations des colonies formées de 60 % chez l'isolat *INRS-IP* et de 71 % chez l'isolat *INRS-CFL*. Après six jours, les réductions ont atteint 90 et 94 %, respectivement, chez les deux isolats. Cependant, pour les mêmes périodes d'échantillonnage, il n'y avait aucune différence significative entre les populations des colonies formées des deux isolats (Tukey HSD, $p > 0,05$).

Les conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* persistent et infectent les populations de l'anthonome de la fleur du fraisier jusqu'à 6 jours après leurs applications sur le feuillage du fraisier (figure 22). Les populations des colonies formées des isolats de *B. bassiana* ont été à leur maximum au jour de l'application. Après trois jours suivant l'application, on a remarqué des diminutions des populations des colonies formées de 56 % chez l'isolat *INRS-IP* et de 70 % chez l'isolat *INRS-CFL*. Après six jours, les pourcentages de diminution ont été de 90 et de 94 %, respectivement, chez les deux isolats (Anova, $df = 7, 71$; $F = 90,12$; $p < 0,0001$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les populations des colonies formées des deux isolats pour les mêmes périodes d'échantillonnage (Tukey HSD, $p > 0,05$).

2.2.2. Persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana*

L'incubation d'insectes sains en laboratoire avec des feuilles échantillonnées à partir des plants de fraisier dans les parcelles traitées par *B. bassiana* peut fournir des

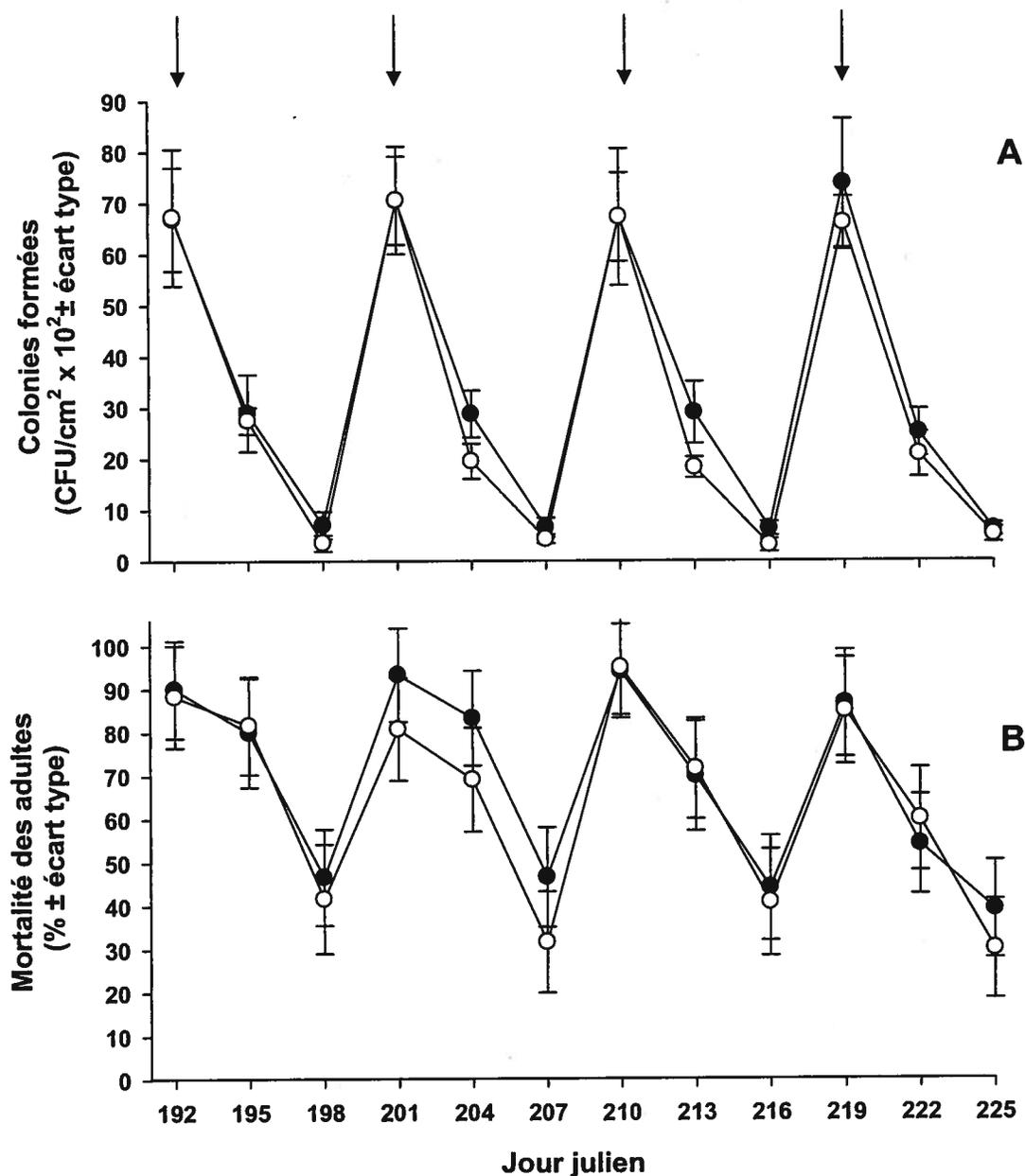


Figure 21. Viabilité et persistance de l'activité insecticide des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les populations d'adultes de *Lygus lineolaris* en fraiseraies.

A : Viabilité (colonies formées) des conidies de *B. bassiana* ; **B** : Persistance de l'activité insecticide (mortalité des adultes) de *B. bassiana*. L'expérience a été réalisée en 2005. Les flèches indiquent les jours d'application (—●— : *INRS-IP* et —○— : *INRS-CFL*, à un taux de 1×10^{13} conidies/ha).

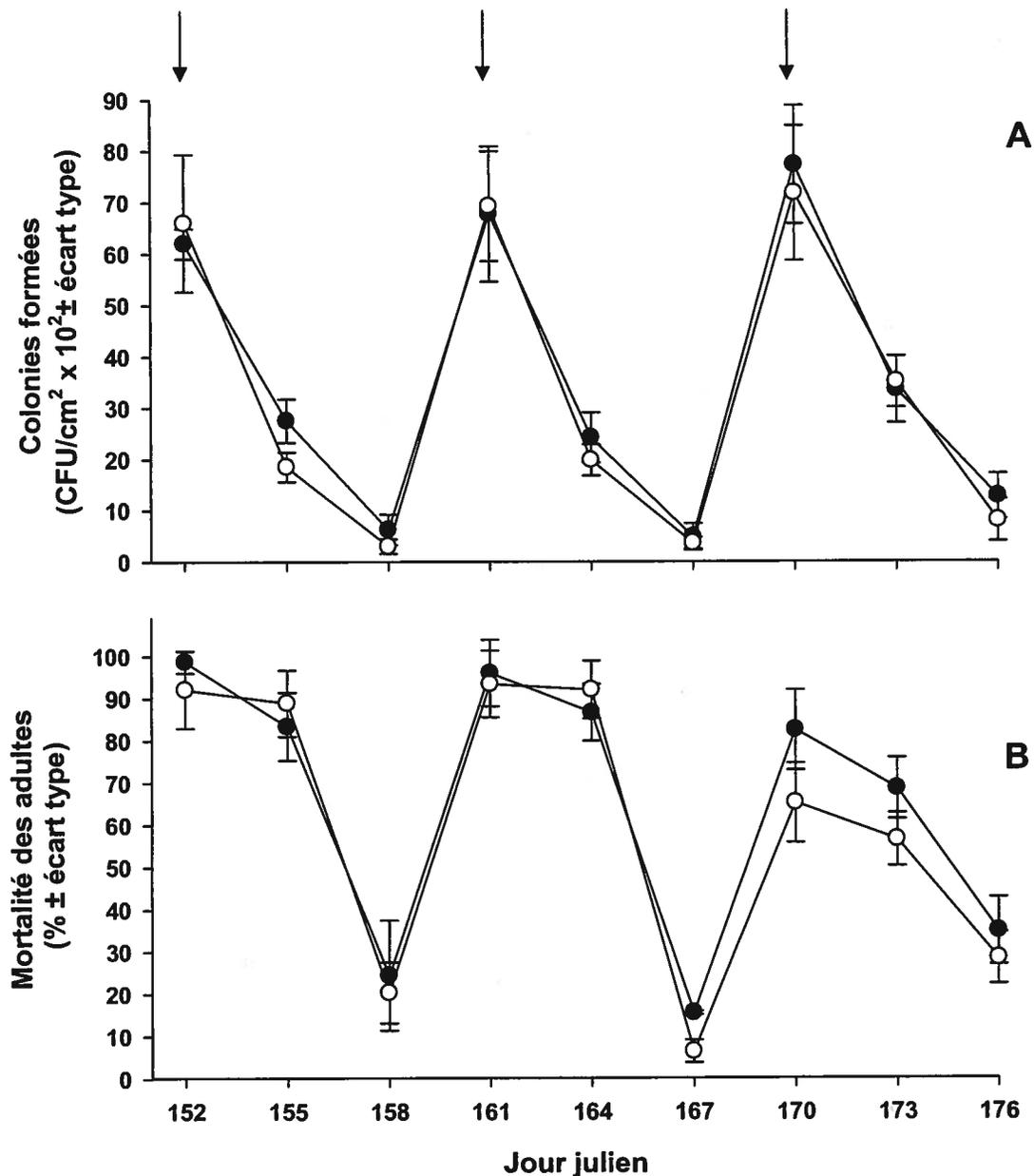


Figure 22. Viabilité et persistance de l'activité insecticide des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* contre les populations d'*Anthonomus signatus* en fraisières.

A : Viabilité (colonies formées) des conidies de *B. bassiana* ; **B** : Persistance de l'activité insecticide (mortalité des adultes) de *B. bassiana*. L'expérience a été réalisée en 2006. Les flèches indiquent les jours d'application (—●— : *INRS-IP* et —○— : *INRS-CFL*, à un taux de 1×10^{13} conidies/ha).

informations au sujet de la persistance de l'activité insecticide des conidies sur le terrain (Butt et Goettel, 2000). Les résultats ont démontré que les conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* appliquées sur le feuillage à un taux de 1×10^{13} conidies/ml peuvent persister et infecter les populations d'adultes de *L. lineolaris* jusqu'à 6 jours suivant l'application. La mortalité des adultes de *L. lineolaris* a été maximale au premier jour d'application et a diminué de manière significative avec le temps (Anova, $df = 9, 191$; $F = 58,74$; $p < 0,0001$) (figure 21). Après trois jours, on observait toujours l'activité insecticide des conidies. Cependant, cette activité était réduite de 18 % pour l'isolat *INRS-IP* et de 17 % pour l'isolat *INRS-CFL*. Après six jours, les réductions ont été de 45 et de 51 %, respectivement, pour les deux isolats. Cependant, il n'y avait aucune différence significative entre l'activité insecticide des conidies des deux isolats pour les mêmes périodes d'échantillonnage (Tukey HSD, $p > 0,05$).

Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* ont provoqué des mortalités élevées chez les populations de l'anthonome de la fleur du fraisier (figure 22). Les insectes infectés par *B. bassiana* ont montré une croissance mycélienne sur la surface de leurs corps. La mortalité des insectes par *B. bassiana* a été à son maximum lors des premiers jours suivant l'application et elle a diminué en fonction du temps. Au jour de l'application, les traitements à base des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* ont causé respectivement des mortalités élevées de 92 et de 83 % des adultes d'*A. signatus*. Après trois jours suivant l'application, on a constaté le maintien de l'efficacité insecticide des conidies de *B. bassiana*. Cependant, des diminutions des pourcentages de mortalité des adultes ont été observées. Ces diminutions ont été de 11 et de 10 %, respectivement, pour les deux isolats. Après six jours, les pourcentages de diminution de mortalité d'adultes ont été de 74 % pour l'isolat *INRS-IP* et de 78 % pour l'isolat *INRS-CFL*. Cependant, on n'a pas constaté de différence significative statistiquement des pourcentages de mortalité d'insectes entre les deux isolats pour

les mêmes périodes d'échantillonnage (Anova, $df = 7, 71$; $F = 26,15$; $p < 0,0001$; Tukey HSD, $p > 0,05$).

La diminution de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana* semble être liée à la réduction des populations de conidies viables sur le feuillage du fraisier. Ceci a été confirmé par une corrélation positive significative entre le pourcentage de mortalité des insectes et le nombre des colonies formées de *B. bassiana* ($r = 0,89$; $df = 1, 23$; $F = 191,97$; $p < 0,0001$).

Parmi les insectes récoltés sur le terrain, on a pu répondre au postulat de Kock, notamment en ce qui concerne l'identification des agents infectieux. Par l'identification génétique des isolats, il était possible de confirmer l'identité des isolats prélevés sur les insectes morts ciblés assurant ainsi un suivi environnemental des isolats après leurs applications au champ. Ainsi, les variations des séquences nucléotidiques du gène 28S chez les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* ont permis d'établir une discrimination définitive entre ceux-ci. D'ailleurs, on a observé la présence d'un intron de type 1 chez l'isolat *INRS-IP* qui est totalement absent chez l'isolat *INRS-CFL* comme décrit à la section 1.3 des résultats.

2.2.3. Survie des populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*

Dans les parcelles traitées, les applications multiples de *B. bassiana* sur une période de 28 jours ont provoqué une réduction significative des populations de nymphes de *L. lineolaris* comparées à celles des parcelles témoins (mesures-répétées Anova, $df = 4, 19$; $F = 10,05$; $p < 0,0008$) (figure 23). Durant cette période expérimentale, les populations de nymphes sont restées constantes dans les parcelles témoins. Après 28 jours, le nombre moyen de nymphes observées a été de 4 insectes par 5 plants dans les parcelles témoins alors qu'il a été de moins d'un insecte par 5 plants dans les parcelles traitées par *B. bassiana*. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements à base de *B. bassiana*.

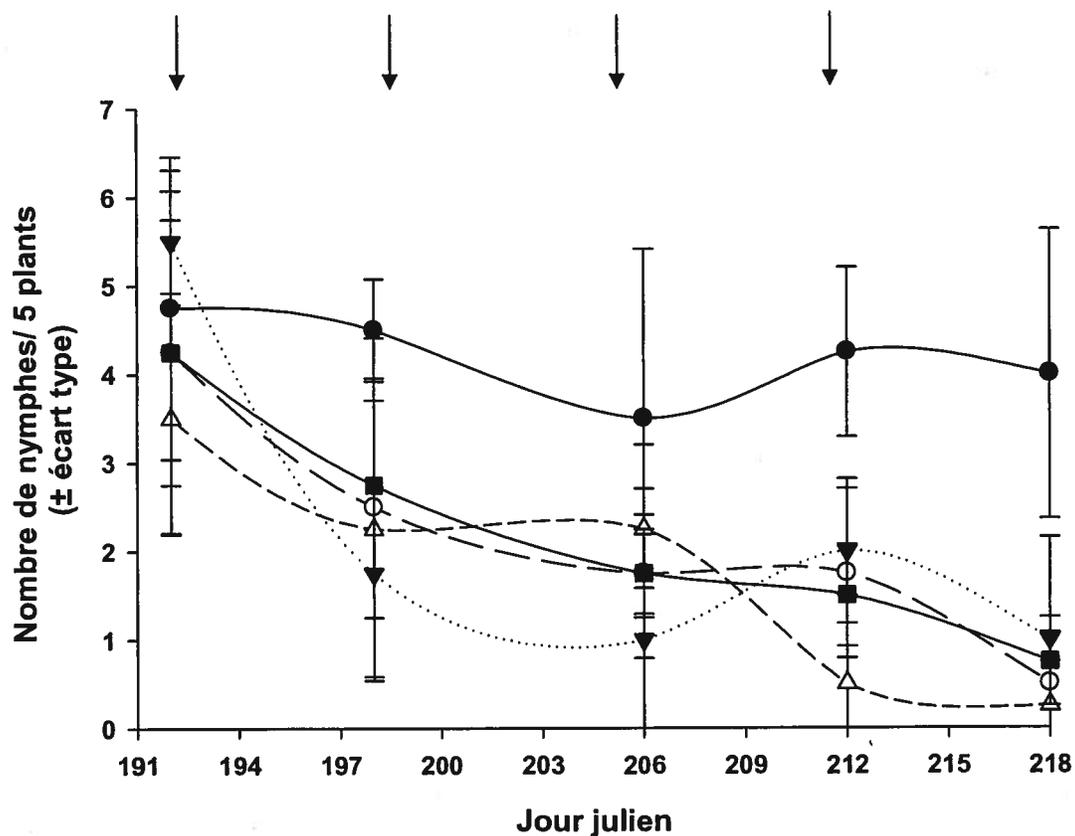


Figure 23. Effet des applications multiples des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* sur l'abondance des nymphes de *Lygus lineolaris* en fraisières.

L'expérience a été réalisée en 2005. Les flèches indiquent les jours d'application (—●— : témoin ; --- Δ --- : *INRS-IP* et ---○--- : *INRS-CFL* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha ; —■— : *INRS-IP* et ...▼... : *INRS-CFL*, à un taux de 1×10^{11} conidies/ha).

Une diminution significative du nombre d'adultes vivants de l'anthonome de la fleur du fraisier en fonction du temps a été observée dans les parcelles traitées par *B. bassiana* (mesures-répétées Anova, $df = 2, 6$; $F = 19,10$; $p < 0,0025$) (figure 24). Cette diminution a démontré l'efficacité insecticide des conidies de *B. bassiana* appliquées sur le feuillage du fraisier pour le contrôle des populations d'*A. signatus* dans les conditions de champ. Avant l'application et durant la première semaine d'application fongique sur le feuillage du fraisier, le décompte de l'anthonome de la fleur du fraisier a indiqué un nombre moyen de 3 adultes par 5 plants. Après la deuxième application, on a constaté des diminutions importantes du nombre d'adultes d'*A. signatus* dans les parcelles traitées par les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*. Alors que le seuil des populations adultes est resté stable en fonction du temps dans les parcelles témoins (figure 24).

2.2.4. Dommages et pertes associés aux attaques de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*

Les applications multiples des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* ont permis une protection des plants du fraisier contre les attaques de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* réduisant ainsi les dommages aux fraises et les pertes de rendement en fruits en fraiseraies.

Une différence significative a été observée au niveau du pourcentage de fraises endommagées par les attaques de la punaise terne dans les parcelles traitées et celles du témoin, 28 jours suivant la première application (Anova, $df = 5, 235$; $F = 4,46$; $p = 0,0007$; Tukey HSD, $p < 0,05$) (figure 25). D'ailleurs, comparativement aux parcelles du témoin, les dommages, associés au comportement alimentaire de *L. lineolaris*, ont été réduits de 26 % dans les parcelles traitées par des formulations à base des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha.

Lors de la première semaine d'application, aucune différence significative du pourcentage de boutons floraux coupés par *A. signatus* n'a été observée entre les

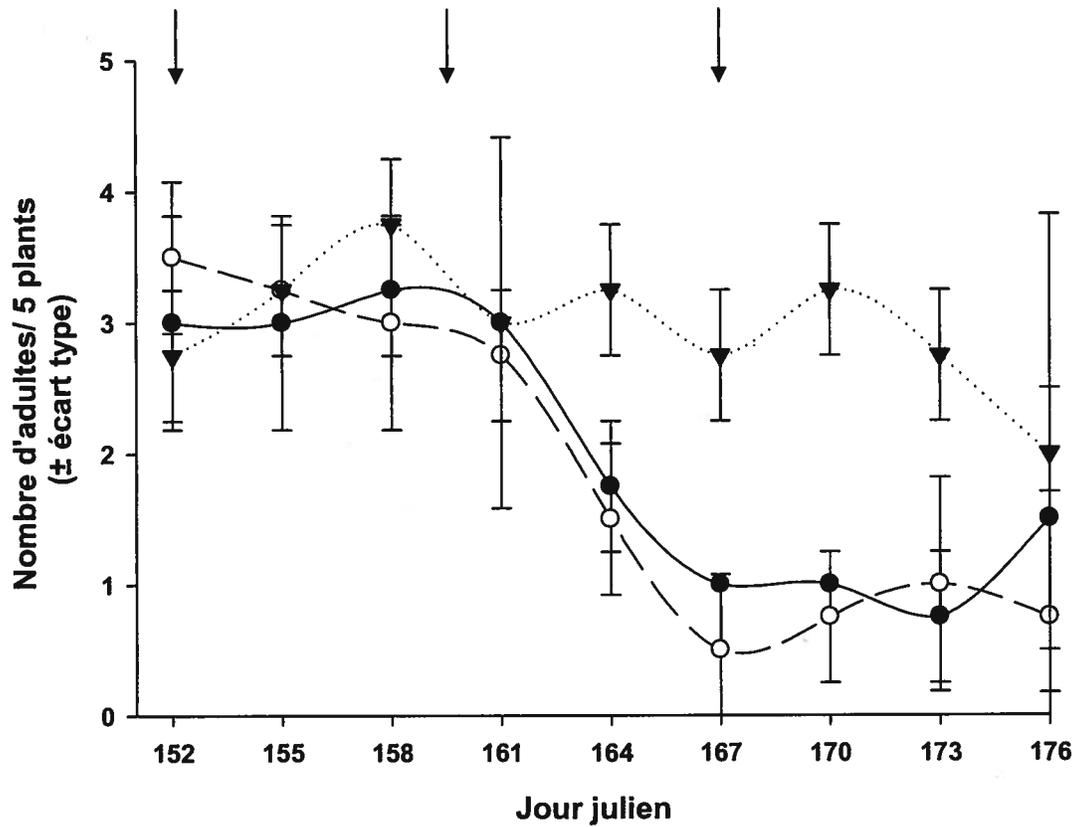


Figure 24. Effet des applications multiples des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *Beauveria bassiana* sur l'abondance des adultes d'*Anthonomus signatus* en fraiseraias.

L'expérience a été réalisée en 2006. Les flèches indiquent les jours d'application (... ▼ ... : témoin ; —●— : *INRS-IP* et -○- - : *INRS-CFL*, à un taux de 1×10^{13} conidies/ha).

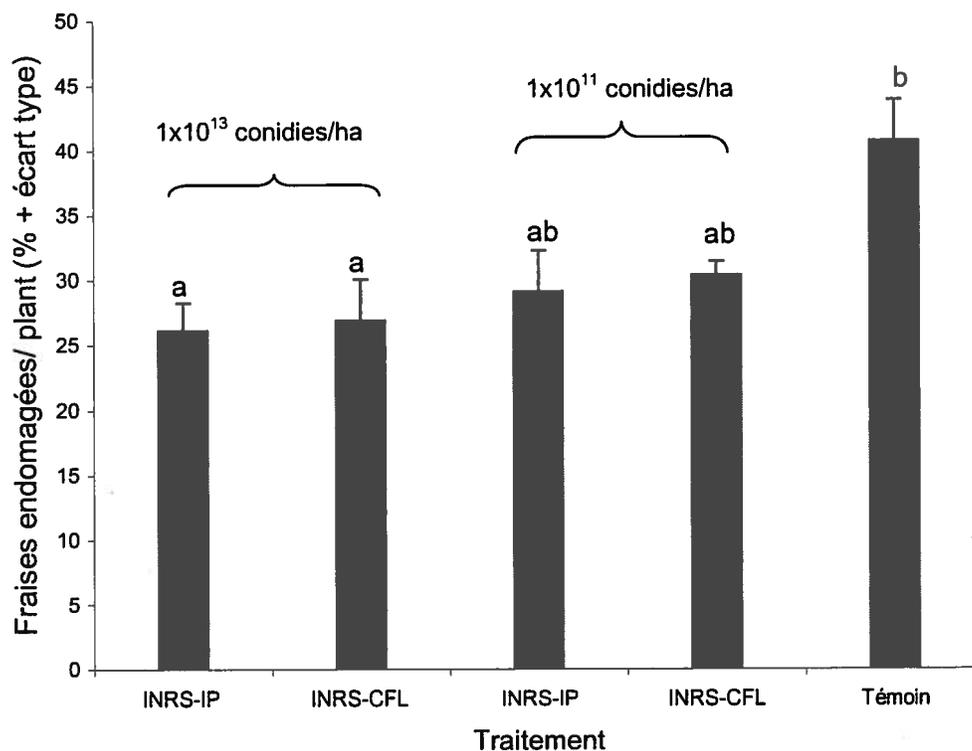


Figure 25. Évaluation des dommages aux fraises associés aux attaques de *Lygus lineolaris* après applications multiples de *Beauveria bassiana* en fraiseriaies.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey HSD, $p < 0,05$). Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* ont été appliqués à des taux de 1×10^{11} et 1×10^{13} conidies/ha.

parcelles traitées et celles du témoin (figure 26). Cependant, trois jours après la deuxième application, on a noté une réduction de 33 % de boutons coupés/ 5 plants dans les parcelles traitées avec *B. bassiana* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha comparativement à celles du témoin (Anova, df = 13, 107 ; F = 3,35 ; p = 0,0003 ; Tukey HSD, p < 0,05) (figure 26).

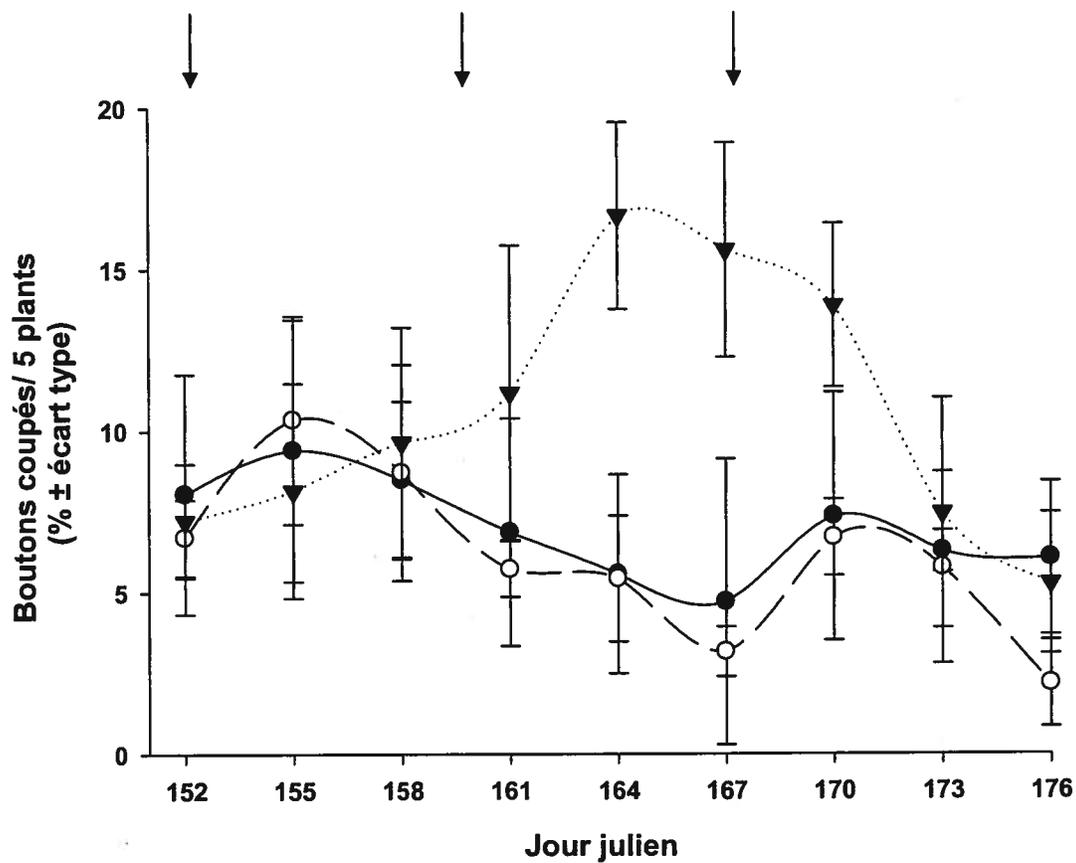


Figure 26. Évaluation des pertes de rendement en fraises associées aux attaques d'*Anthonomus signatus* après applications multiples de *Beauveria bassiana* en fraiseraies.

Les flèches indiquent les jours d'application (... ▼ ... : témoin ;
 —●— : INRS-IP et --○-- : INRS-CFL, à un taux de 1×10^{13} conidies/ha).

Discussion

I. Volet 1 : Expériences au laboratoire

1.1. Criblage des isolats de *B. bassiana* sur les insectes

Le champignon *B. bassiana* est un excellent candidat pour le développement d'insecticides microbiens (Faria et Wraight, 2001 ; Todorova 1998 ; McCoy, 1990). La pathogénicité de ce champignon contre la punaise terne a été démontrée (Leland et McGuire, 2006 ; Kouassi, 2004 ; Steinkraus et Tugwell, 1997 ; Snodgrass et Elzen, 1994). Des études ont aussi démontré sa pathogénicité contre certaines espèces appartenant à la famille des curculionidés tels que le charançon de la jacinthe d'eau, *Neochetina bruchi* Hustache (Chikwenhere et Vestergaard, 2001), le charançon du maïs, *Sitophilus zeamais* Mots. (Adane et al. 1996) et le charançon de la racine d'oranger, *Diaprepes abbreviatus* L. (Quintela et McCoy, 1998). Cependant, il n'existe aucune étude, à ma connaissance, qui démontre l'efficacité insecticide de champignons entomopathogènes contre l'anthonome de la fleur du fraisier. De plus, peu d'études ont été réalisées concernant la susceptibilité du charançon de la racine du fraisier aux champignons entomopathogènes.

Les résultats de laboratoire ont démontré la pathogénicité de *B. bassiana* contre la punaise terne. Ils ont démontré également pour la première fois la susceptibilité de l'anthonome de la fleur du fraisier et du charançon de la racine du fraisier au *B. bassiana*. Le choix de l'isolat fongique dépend essentiellement de sa pathogénicité, de sa virulence et de sa spécificité à l'hôte (Tanada et Kaya, 1993 ; Prior, 1990). Les seize isolats de *B. bassiana* testés ont démontré une variation considérable de la pathogénicité contre les trois ravageurs étudiés. De telles variations ont été observées par Butt et al. (1992) avec six isolats de *M. anisopliae* contre les coléoptères chrysomélidés *Psylliodes chrysocephala* L. et *Phaedon cochleariae* F, et par Kassa et al. (2002) avec plusieurs isolats de *B. bassiana* d'Éthiopie contre les insectes ravageurs, *Sitophilus zeamais* (Motsch) et *Prostephanus truncates* (Horn).

Les variations de la pathogénicité induite par les isolats de *B. bassiana* pourraient être attribuables aux mycotoxines et enzymes physiologiques produites par chaque isolat (Leland et al. 2005 ; Varela et Morales, 1996 ; Butt et al. 1992 ; Bidochka et Khachatourians, 1990 ; Feng et Johnson, 1990).

Le champignon *B. bassiana* a un large spectre d'action contre plusieurs insectes appartenant à différents ordres (Willoughby et al. 1998). Les isolats de *B. bassiana* ne sont pas obligatoirement pathogènes à une espèce d'insecte-hôte. D'ailleurs, le potentiel insecticide des isolats de ce mycète envers les insectes-hôtes est variable (Willoughby et al. 1998). Le criblage des isolats de *B. bassiana* a permis l'identification de certains isolats hautement pathogènes contre les populations de *L. lineolaris*, *A. signatus* et *O. ovatus*. L'effet d'un champignon entomopathogène sur l'insecte-hôte dépend aussi de la quantité de matériel infectieux, de la susceptibilité de l'hôte et de l'immunité de l'insecte-hôte (Ferron et al. 1993). L'activité de différents isolats de *B. bassiana* sur les insectes étudiés montre une sélectivité du champignon qui varie avec l'isolat. Souvent, un isolat ne présente aucune activité sur un hôte, alors qu'il provoque une forte mortalité sur d'autres insectes de la même famille (Tanada et Kaya, 1993). D'autre part, un même hôte peut être résistant à d'autres isolats du même pathogène. La défense immunitaire est certainement un autre facteur à considérer dans l'explication de la spécificité des infections par *B. bassiana*. Lorsqu'un isolat de *B. bassiana* n'est pas spécifique pour l'hôte, les hémocytes dans l'hémolymphe de l'insecte peuvent arrêter le processus infectieux en enveloppant les spores du champignon (Destefano et al. 2004).

L'absence de lien entre l'espèce-hôte d'origine et le spectre d'hôte d'un isolat fongique ne signifie pas que cet isolat soit incapable de présenter une pathogénicité plus étroite pour certaines espèces d'insectes. En fait, dans la plupart des cas, il est vraisemblable que les relations entre les hyphomycètes et leurs hôtes soient d'origine polygénique. Riba et al. (1982) ont démontré ce phénomène avec des isolats de *B. bassiana* et de *P. fumosoroseus* sur les larves de deux populations du ver à soie,

Bombyx mori L., d'origines géographiques distinctes. De nombreux facteurs sont impliqués dans l'activité pathogène des champignons, ce qui se traduit par des différences de pathogénicité entre les isolats d'une même espèce à l'égard de diverses populations d'une même espèce-hôte ou vis-à-vis de diverses espèces-hôtes proches ou éloignées phylogénétiquement les unes des autres (Riba et Marcandier, 1984). Par exemple, les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* sont parmi les isolats de *B. bassiana* les plus pathogènes à l'égard des trois insectes ravageurs étudiés. Ces deux isolats ont été isolés respectivement à partir d'espèces-hôtes appartenant à l'ordre des coléoptères et des hétéroptères. Cette étude a démontré que les isolats de *B. bassiana* ne sont pas inféodés étroitement à une espèce, un genre ou un groupe d'hôtes taxonomiquement homogène.

Le développement de programmes de lutte biologique efficaces dans lesquels les prédateurs sont intégrés avec d'autres ennemis naturels comme les parasitoïdes et les champignons entomopathogènes exige une compréhension de leurs interactions. L'emploi de *B. bassiana* contre les principaux insectes ravageurs en fraiseraies exige au préalable la sélection des isolats dont le spectre de pathogénicité est plus restreint. Par exemple, des études sur plusieurs isolats de *B. bassiana* ont permis d'identifier des isolats pathogènes contre le doryphore de la pomme de terre, les pucerons et la tordeuse à bandes obliques, sans être nocifs pour la coccinelle maculée, la coccinelle asiatique et la punaise masquée (Todorova, 1998 ; Todorova, 1994 ; Groden et Lockwood, 1991). Pingel et Lewis (1996) ont indiqué que la coccinelle maculée n'était pas susceptible à un isolat de *B. bassiana* en laboratoire et en champ de coton. Cependant, Todorova et al. (1994) ont montré des variations de la pathogénicité entre les isolats de *B. bassiana* sur *C. maculata*. Un isolat peut montrer une pathogénicité restreinte contre certaines espèces-hôtes (Inglis et al. 2001). Autrement, il est supposé que les isolats sélectionnés de l'insecte ciblé et des insectes étroitement proches phylogénétiquement de cet insecte soient généralement plus pathogènes que les isolats sélectionnés à partir des espèces éloignées. En conclusion, suite aux criblages,

la majorité des isolats de *B. bassiana* testés ont été fortement pathogènes contre les trois principaux ravageurs du fraisier tout en ayant une faible activité insecticide contre le prédateur naturel, la coccinelle maculée.

1.2. Potentiel insecticide et virulence de *B. bassiana* contre *L. lineolaris*, *A. signatus* et *O. ovatus*

Les aspects cliniques de l'intoxication des insectes par des insecticides organiques de synthèse peuvent être schématisés en quatre phases successives. Une période d'hyperactivité, une période d'incoordination des mouvements et une période de prostration qui précède la mort apparente (Moriarty, 1969). Ces différentes phases peuvent se dérouler pendant 6 à 8 heures. Après cette période d'intoxication, la mortalité des insectes est atteinte rapidement (24 à 48 heures). En revanche, les observations faites lors des épreuves biologiques montraient que le temps d'incubation des infections fongiques est beaucoup plus lent (au minimum 3 à 7 jours) dans le cas de *B. bassiana* sans qu'il soit possible de distinguer une phase d'hyperactivité avant la phase de la mort.

Les épreuves biologiques ont permis de déterminer les valeurs de la concentration létale (CL_{50}) et du temps moyen de survie (TMS) des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* chez les populations des insectes étudiés. Ces valeurs donnent une indication du potentiel insecticide et de la virulence des isolats sélectionnés et fournissent des informations importantes permettant de préparer les essais sur le terrain. Il est important de considérer la virulence des conidies autant que leur potentiel insecticide. Le nombre de spores n'est pas une indication de l'efficacité d'une préparation fongique. Ainsi, un nombre élevé de conidies pourrait être inefficace si les conidies sont peu virulentes. Suite à la réalisation des épreuves biologiques avec différentes concentrations, les valeurs de CL_{50} étaient de $7,8 \times 10^5$ conidies/ml pour l'isolat *INRS-IP* et de $5,3 \times 10^7$ conidies/ml pour l'isolat *INRS-CFL* chez les populations d'adultes de la punaise terne. Des expériences impliquant

d'autres isolats de *B. bassiana* montraient des valeurs de CL_{50} de $1,9 \times 10^6$ conidies/ml chez les populations de *L. hesperus* et de $2,2 \times 10^6$ conidies/ml chez les populations de *L. lineolaris* (Noma et Strickler, 1999 ; Steinkraus et Tugwell, 1997). D'autre part, le traitement des populations de *L. lineolaris* par *B. bassiana* a causé des valeurs de TMS de 4,4 jours avec l'isolat *INRS-IP* et de 4,3 jours avec l'isolat *INRS-CFL* à une concentration de 1×10^8 conidies/ml. Cependant, Kouassi (2004) a rapporté une valeur de TL_{50} de 3,0 jours chez les populations d'adultes de *L. lineolaris* et Bidochka et al. (1993) ont indiqué une valeur de TL_{50} de 4,9 jours chez les populations d'adultes de *L. borealis* à une concentration de 1×10^8 conidies/ml. Ainsi, les variations des valeurs de CL_{50} et de TMS peuvent être expliquées par les variations de virulence de différents isolats à une espèce d'insecte-hôte, ou les variations de virulence d'un même isolat aux espèces proches phylogénétiquement de l'insecte-hôte (Khachatourians, 1992).

Les stades de l'insecte ne sont pas tous susceptibles de la même façon à l'infection par les hyphomycètes entomopathogènes. Souvent, les insectes immatures sont plus susceptibles à l'infection que les insectes adultes (Inglis et al. 2001). En revanche, les adultes des thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), sont plus susceptibles au *V. lecanii* que les larves (Vestergaard et al. 1995). Cependant, les expériences en laboratoire ont démontré que les nymphes et les adultes de la punaise terre avaient le même niveau de susceptibilité aux deux isolats de *B. bassiana* étudiés. D'ailleurs, Liu et al. (2002) ont obtenu des résultats semblables avec une valeur de CL_{50} de $5,0 \times 10^5$ conidies/ml et une valeur de TL_{50} de 4,0 jours chez les populations de nymphes de *L. lineolaris* à une concentration de 2×10^7 conidies/ml.

Il y a peu d'études dans la littérature sur la susceptibilité des espèces *A. signatus* et *O. ovatus* au *B. bassiana*. L'infection par *B. bassiana* des adultes du charançon du coton, *A. grandis* (Boheman), a provoqué une valeur plus basse de la CL_{50} de $7,94 \times 10^5$ conidies/ml (Wright et Chandler, 1991) comparativement aux résultats obtenus lors de cette étude sur les adultes d'*A. signatus*. Alors qu'avec

l'utilisation de deux isolats de *M. anisopliae* contre les larves du charançon de la vigne, *O. sulcatus*, Moorhouse et al. (1993) ont indiqué des valeurs de TL_{50} , semblables aux résultats obtenus lors de cette étude chez les adultes d'*O. ovatus*, de 6,09 et de 8,72 jours à une concentration de 1×10^7 conidies/ml. En outre, les champignons *M. anisopliae* et *B. bassiana* ont été utilisés contre les populations du charançon de maïs, *S. zeamais*. Ces champignons induisaient, respectivement, 92 et de 100 % de mortalité chez les populations d'adultes et des valeurs de TL_{50} de 3,58 et de 6,28 jours à une concentration de 1×10^8 conidies/ml (Kassa et al. 2002). Dans une autre étude, Butt et al. (1992) ont démontré que la virulence de *M. anisopliae* contre deux espèces de chrysomèles, *P. chrysocephala* et *P. cochleariae*, a changé considérablement d'un isolat à l'autre.

Les résultats de laboratoire ont démontré, pour la première fois, que les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana* étaient plus efficaces contre les populations de *L. lineolaris* qu'à celles d'*A. signatus* et d'*O. ovatus*. Butt et al. (1995) ont observé que les insectes ayant une cuticule moins rigide ont une résistance plus faible au champignon *M. anisopliae* que ceux ayant une cuticule sclérotique coriace (Butt et al. 1995). Ceci démontre que la cuticule jouerait un rôle important dans le processus de l'infection. Les résultats de la présente étude supportent cette hypothèse. Cependant, d'autres recherches doivent être réalisées pour documenter ce phénomène en utilisant cette fois-ci plusieurs espèces appartenant à différents ordres afin de vérifier si *B. bassiana* est plus efficace contre les espèces d'hétéroptères que celles de coléoptères.

Un bon bioinsecticide doit être capable de tuer rapidement une proportion importante d'individus dans une épidémie de l'insecte-hôte. Les résultats ont démontré que la virulence des isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana* contre les principaux insectes ravageurs du fraisier a été similaire. En d'autres termes, ils ont indiqué que la rapidité, avec laquelle les individus de chaque espèce infectés par l'un ou l'autre des isolats meurent, demeure identique. En regard des résultats obtenus et de l'origine géographique, ces deux isolats, indigènes au Québec, peuvent être

appliqués en fraiseraies pour lutter contre les populations des principaux insectes ravageurs réduisant ainsi au minimum les risques environnementaux liés à l'application des isolats non-indigènes sur le terrain.

Les résultats de laboratoire ont permis de conclure qu'il y a de nombreux facteurs affectant l'efficacité insecticide de *B. bassiana*. Son potentiel comme agent de lutte biologique résulte des propriétés des populations de l'insecte-hôte et du pathogène. Certains facteurs sont liés au pathogène : virulence et spécificité à l'hôte (qui sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte microbiologique), potentiel épizootique et polymorphisme génétique des populations fongiques. D'autres dépendent de l'hôte : variabilité de la sensibilité des populations d'insectes-hôtes et facteurs internes affectant la sensibilité de l'hôte (influence du stade de développement de l'insecte).

1.3. Caractérisation moléculaire des isolats de *B. bassiana*

Les résultats de laboratoire ont indiqué que *B. bassiana* offre de possibilités pour la gestion des principaux ravageurs du fraisier en condition de terrain. Il est admis que l'expression d'une maladie dépend non seulement du génotype (sensible ou résistant) de l'hôte, mais aussi de celui de son pathogène. Toute méthode de lutte se voulant efficace devrait donc prendre en compte, entre autres, les connaissances sur la biologie et la génétique du pathogène. Étant donné que les fréquences des génotypes d'un pathogène dans une population donnée peuvent varier selon sa localisation géographique et dans le temps, il est indispensable, par exemple, pour les mesures de contrôle des ravageurs, de connaître la variabilité et la diversité génétique des isolats de *B. bassiana*.

Actuellement, les isolats de *B. bassiana* sont enregistrés selon leurs origines géographiques et leurs hôtes spécifiques, mais ils ne sont pas encore caractérisés génétiquement. L'identification des isolats de champignon est essentielle pour vérifier si les effets au champ sont réellement dus à l'isolat appliqué. La taxonomie classique

du champignon est basée sur la taille et la forme de la spore. Cependant, cette approche n'est pas conviviale et sa précision provoque la confusion lors de l'identification. Les méthodes moléculaires sont de plus en plus utilisées pour caractériser les micro-organismes pathogènes.

Le champignon *B. bassiana* est reconnu comme formant un complexe d'isolats comprenant des lignages différents sur le plan génétique. Ayant une reproduction principalement asexuée, il est impossible d'utiliser des croisements pour délimiter les espèces au sein de ce complexe. Les tests génétiques offrent un moyen indirect pour identifier les isolats d'une espèce. C'est dans ce contexte qu'une analyse génétique des séquences nucléotidiques de l'ADN ribosomal au complet et un établissement des marqueurs génétiques PCR-RFLP chez les isolats de *B. bassiana* ont été réalisés.

La PCR et l'analyse des séquences d'ADN sont utilisés intensivement comme des outils de détection, d'identification et d'analyse phylogénétique de plusieurs espèces fongiques (Destefano et al. 2004). Ces analyses sont basées sur l'étude d'un gène (locus) (Rakotonirainy et al. 1991), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.) (Nikoh et Fukatsu, 2001), de plusieurs gènes (multiloci) (Viaud et al. 1996) ou encore de l'ADN total (Castrillo et al. 2003). Dans ce sens, le développement d'outils moléculaires pour la caractérisation des champignons devient intéressant pour mesurer le niveau de variabilité génétique du pathogène et permettre une analyse de la structure génétique des populations.

Dans le cadre de la présente recherche, l'ADN ribosomal a été considéré puisqu'il s'agit d'un marqueur moléculaire important qui est largement utilisé pour l'identification et la différenciation de plusieurs espèces microbiennes (Destefano et al. 2004). Les résultats ont démontré que l'ADN ribosomal contient des régions variables et d'autres conservées. Précisément, les gènes 5,8S et 18S de l'ADN ribosomal sont les plus conservés, tandis que le gène 28S (extrémité 3') a accumulé beaucoup de variabilité et il peut être utilisé pour différencier les espèces ou même

les isolats de la même espèce. Par exemple, des variations au niveau des séquences nucléotidiques du gène 28S révèlent une distinction définitive entre les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

La caractérisation moléculaire des isolats de *B. bassiana* d'origine biologique et géographique variées a été réalisée. Le séquençage de l'ADNr au niveau de l'extrémité 3' du gène 28S de l'ADN ribosomal a révélé une variabilité importante au niveau des séquences nucléotidiques. Une étude approfondie du gène 28S a permis de déceler trois introns de groupe I situés dans l'extrémité 3' de ce gène. Cette étude a montré que certains introns étaient caractéristiques pour chacun des isolats de *B. bassiana*. La spécificité et la répartition variable des introns de groupe I selon les isolats permettaient de différencier ces derniers. La méthode PCR-RFLP a été utilisée comme outil de détection des isolats. Elle est basée sur la sensibilité de la technique d'amplification génique et sur les profils de restriction applicables au niveau de l'extrémité 3' du gène 28S. Le polymorphisme observé a permis de discriminer les isolats étudiés. La méthode PCR-RFLP a aussi été utilisée pour confirmer l'identité des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* après leur application sur le terrain.

Il est à noter que des profils de restriction similaires ont été observés chez les isolats *ARSEF2991* et *DAOM216540* de *B. bassiana*. D'ailleurs, ces deux isolats avaient des séquences nucléotidiques 100 % homologues. Malgré que ces deux isolats ont été enregistrés dans deux banques différentes et sélectionnés des cadavres de deux espèces d'insectes au Québec et en Ontario, ne garantit pas qu'ils sont deux isolats différents mais probablement de clones. Il est reconnu que les isolats sélectionnés auprès du même ou de différents endroits peuvent être de clones, et donc, par inattention peuvent être enregistrés sous différents noms. Cela souligne que les isolats exotiques et indigènes ne sont pas supposés avoir automatiquement des profils génétiques différents.

Sur le plan génétique, la technique de PCR-RFLP fournit des marqueurs moléculaires et peut également permettre de détecter les variations dues aux délétions

et / ou insertions de courtes séquences nucléotidiques (Dirlewanger et al. 1994). Les marqueurs de type PCR-RFLP sont très exploités chez les plantes, notamment pour la construction des cartes génétiques (Devey et al. 1994) ou encore pour la localisation des QTLs (*Quantitative Trait loci*) liés aux gènes de résistance (Kicherer et al. 2000 ; Lubberstedt et al. 1999). Chez les hyphomycètes, la technique de PCR-RFLP a permis de différencier, par exemple, certains isolats de *M. anisopliae* (Destefano et al. 2004), *B. brongniatii* (Wada et al. 2003), *Paecilomyces farinosus* (Chew et al. 1997) et *Entomophaga maimaiga* (Hajek et al. 1990).

Avant d'autoriser un nouvel organisme comme agent de lutte biologique, il est nécessaire d'évaluer les conséquences éventuelles du relâchement d'un isolat sur une grande région géographique. La possibilité existe qu'un gène ou un allèle de virulence peu fréquent puisse être introduit dans une population locale de l'agent pathogène à la suite d'un relâchement. Des facteurs tels que l'isolement des populations par la distance ou par des barrières naturelles qui gênent la dispersion peuvent permettre aux forces de l'évolution telles que la sélection, la mutation et la dérive génétique d'affecter la fréquence des gènes dans les populations locales. L'analyse de la structure génétique d'une espèce peut informer sur la structure de sa population et permettre l'analyse du risque. D'autres marqueurs moléculaires doivent être développés afin d'évaluer l'impact de la dissémination d'isolats sélectionnés de *B. bassiana*. Ces marqueurs seront utilisés pour analyser le flux de gènes entre les populations et pour évaluer le risque du relâchement de *B. bassiana* comme agent de lutte biologique contre les populations d'insectes ravageurs dans les écosystèmes agricoles au Canada.

II. Essais sur le terrain

2.1. Effet de *B. bassiana* sur les populations de la punaise terne en cages

Il existe de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques quant aux capacités des champignons d'infecter leurs hôtes dans les conditions de terrain. Parmi celles-ci se retrouvent des antagonistes microbiens, notamment le comportement, l'âge, la condition physiologique de l'hôte, la lumière du soleil, la dessiccation, la température et l'humidité (Inglis et al. 2001). L'utilisation avec succès des champignons entomopathogènes comme agents de contrôle microbien dépendra de l'utilisation de l'inoculum approprié, formulé de manière optimale et appliqué au bon moment à un hôte susceptible (Burgues, 1998). Les résultats ont démontré une forte mortalité des adultes de la punaise terne en condition de cages et aucune résurgence (présence de nymphes) n'a été observée dans les cages traitées avec les formulations à base de *B. bassiana* après sept jours suivant l'application. Ceci montre l'efficacité de ce champignon à contrôler tous les stades de la punaise terne (œufs, nymphes et adultes). De plus, les résultats ont démontré que le contact des gouttelettes de la solution fongique sur la cuticule pendant la pulvérisation n'est pas un pré-requis pour amorcer l'infection. L'insecte peut aussi être contaminé en se nourrissant sur les feuilles. Wright et Chandler (1992) ont aussi démontré que les populations du charançon du coton, *A. grandis*, peuvent être infectées par *B. bassiana*, soit par contact direct suite à un arrosage, ou bien soit par contact indirect avec du feuillage traité.

2.2. Viabilité des conidies de *B. bassiana*

L'élucidation du devenir des conidies de *B. bassiana* suite aux applications sur le terrain pose un défi et une variété d'approches et de protocoles ont été développés. Ceux-ci incluent les lavages des feuilles, les épreuves biologiques avec de feuillage collecté sur le terrain et le suivi des populations des insectes sur le terrain.

Un des facteurs qui limite l'introduction de nombreux microorganismes entomopathogènes prometteurs sur le terrain est la relative méconnaissance de l'écologie, du devenir et des effets de ces organismes dans l'environnement (Inglis et al. 2001). Avant d'envisager un lâcher dans l'environnement, il est essentiel de choisir un mode d'application approprié et de bien connaître la persistance du microorganisme sélectionné dans l'environnement, son potentiel de dispersion hors des sites d'application (dissémination) et ses effets sur l'équilibre et le fonctionnement des écosystèmes exposés (sécurité, avantages et dommages) (Burgues, 1998).

Le problème majeur d'utilisation des champignons entomopathogènes est leur faible persistance sur le feuillage (Ignoffo, 1992). Par exemple, les conidies de *B. bassiana* diminuent de plus de 75 % après 4 jours sur les feuilles de luzerne et de blé (Inglis et al. 1993). De plus, il a déjà été démontré que la demi-vie des conidies de *B. bassiana* est de 2 à 5 jours en conditions naturelles (Gardner et al. 1977). Inglis et al. (1993) ont démontré que les populations des conidies de *B. bassiana* ont été réduites de 85 % sur la luzerne après 4 jours. Étonnamment, Kouassi et al. (2003a) ont indiqué la persistance des conidies viables de *B. bassiana* jusqu'à 26 jours après application dans la culture de céleri. Les résultats des expériences sur le terrain ont démontré que les conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* persistent jusqu'à six jours suivant l'application. La variation de la viabilité des conidies sur le feuillage est probablement due à plusieurs facteurs.

L'utilisation de *B. bassiana* sur le terrain exige la résistance des conidies à la lumière UV, à la basse humidité relative et à la capacité de persister sur le feuillage traité (Leland et Behle, 2005). Il semble que les rayons UV sont le facteur le plus nuisible affectant la viabilité de conidies (Johnson et al. 1992 ; Inglis et al. 1993 ; Smits et al. 1996). Cependant, d'autres variables telles que les précipitations, l'humidité relative, et la température peuvent également avoir un impact significatif sur la persistance des conidies viables (Goettel et al. 2000). Le micro-habitat dont

lequel les champignons sont déployés est un autre facteur important influençant leur persistance. La survie des conidies exposées aux radiations solaires est relativement réduite quand ces dernières se trouvent dans des sites protégés à l'intérieur des inflorescences de plants (Inglis et al. 1993).

2.3. Persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana*

Les recherches jusqu'à présent se sont basées sur l'étude de la survie des conidies sur les surfaces foliaires du plant alors qu'on connaît peu de choses sur la persistance de l'activité insecticide des conidies de *B. bassiana* en conditions naturelles. Dans un champ de coton, les conidies de *B. bassiana* ont été capables d'infecter les populations d'adultes de *L. lineolaris* jusqu'à 4 jours suivant l'application (Steinkraus et Tugwell, 1997). Or, la stratégie d'applications multiples, à intervalles de 7 jours, a permis la présence des conidies viables de *B. bassiana* sur le feuillage tout au long de la période de floraison du fraisier. Cette approche a été confirmée en mesurant la viabilité des conidies de *B. bassiana* sur le feuillage et en déterminant la persistance de l'activité insecticide de celles-ci contre les adultes de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* nourris de feuillage traité immédiatement, 3 jours et 6 jours après l'application. Il existe une étroite corrélation entre la baisse de viabilité de l'inoculum et l'évolution de son activité insecticide dans les parcelles traitées avec *B. bassiana*. Précisément, les résultats ont démontré que les formulations à base de *B. bassiana* conservent leur potentiel pendant plusieurs jours. Ainsi, après six jours, on a observé la présence de conidies viables sur le feuillage et une activité insecticide de celles-ci.

Les facteurs environnementaux régulent la physiologie d'un champignon, sa capacité à infecter l'hôte, la sensibilité ou la résistance de l'hôte à l'infection, la progression de l'infection au sein des hôtes vivants et des hôtes morts, la sporulation sur le cadavre et la capacité de survie des conidies infectieuses (Tanada et Kaya, 1993). L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de populations

hôtes, augmentant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte de même qu'entre les hôtes infectés et les hôtes non-infectés (Ownley et al. 2004). Le champignon *B. bassiana* peut ainsi jouer le rôle de facteur densité-dépendant dans la régulation des populations des principaux insectes ravageurs en fraiseraies. D'ailleurs, le comportement de la population-hôte et la répartition dans l'espace et dans le temps peuvent affecter la dissémination de *B. bassiana* (Bruck, 2004).

Le développement des processus épizootiologiques de *B. bassiana* est fortement régulé par les conditions hygrométriques (Leland et Behle, 2005). Cependant, la sporulation fongique a été observée sur la cuticule des cadavres de chaque insecte ravageur au laboratoire. Notons que le germe peut survivre au moins 3 mois dans l'insecte, même dans des conditions sèches (Riba et Marcandier, 1984). L'autodéssimination peut être considérée, au futur, comme nouvelle stratégie de contrôle phytosanitaire visant à attirer les insectes ravageurs aux pièges contaminés par *B. bassiana* et donc un transfert subséquent aux insectes sains en fraiseraies.

2.4. Survie des populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*

Les insectes ravageurs susceptibles de se développer et de causer des dégâts sur la culture de fraises ont avec leur milieu environnant, et sous l'influence des pratiques mises en œuvre, des relations complexes qui vont conditionner leur dynamique et la structure de leurs populations. La connaissance de ces relations, de leurs hiérarchies et de leurs interactions constitue une étape nécessaire pour proposer des méthodes de gestion des agrosystèmes.

Les résultats ont démontré que l'application des formulations à base de *B. bassiana* entraîne une diminution des populations nymphales de la punaise terne et d'adultes de l'anthonome de la fleur du fraisier, qui se traduit par une différence significative par rapport au témoin. Poprawski et al. (1997) ont observé que les applications des conidies de *B. bassiana* à des intervalles de 4 jours au début de la saison réduisaient efficacement les densités des larves du doryphore de la pomme de

terre et fournissaient une protection foliaire substantielle contre les attaques de ce ravageur dans les cultures de pomme de terre. L'application inondative hebdomadaire des conidies de *P. fumosoroseus* à des intervalles de 7 jours a été utilisée avec succès pour le contrôle des populations de la mouche blanche, *Bemisia tabaci* (Gennadius) et elle a causé 90 % de mortalité des larves dans les cultures de concombre et de melons cantaloups (Wraight et al. 2000).

L'approche écologique mise en place dans le cadre de la présente étude a permis de démontrer l'impact d'une formulation à base de *B. bassiana* sur les populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier. L'incidence naturelle de *B. bassiana* est très infime. Ainsi, en appliquant de grandes quantités de conidies de *B. bassiana* sur le terrain, on modifie artificiellement et temporairement l'équilibre en faveur du champignon pour réduire les populations de *L. lineolaris* et *A. signatus* en fraiseraies.

L'utilisation de Naturalis-L (Troy Biosciences, Phoenix, AZ), formulation à base de *B. bassiana* commercialisée aux États Unis, à un taux de 1×10^{14} conidies/ha a provoqué une diminution des populations de nymphes et d'adultes de *L. lineolaris* dans un champ de coton après 21 jours suivant l'application (Snodgrass et Elzen, 1994). Alors que, Steinkraus et Tugwell (1997) n'ont observé aucune réduction significative des populations de *L. lineolaris* dans un champ de canola suite à une seule application de Mycotrol™ WP (Mycotech Corp., Butte, MT), autre formulation de *B. bassiana* homologuée aux États Unis. D'autre part, l'application de la souche GHA de *B. bassiana* à un taux de 1×10^{14} conidies/ha dans un champ de luzerne n'a pas engendré une réduction significative des populations de nymphes et d'adultes de *L. hesperus* (Noma et Strickler, 1999). Ces deux chercheurs ont suggéré qu'une faible pénétration du champignon à certains endroits sur les plants de luzerne où les punaises s'alimentent peut être l'une des raisons de l'efficacité limitée du traitement fongique. On a démontré que les applications multiples des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha, sur une base hebdomadaire,

assurent la présence d'un inoculum adéquat sur le feuillage du fraisier et permettent le contrôle des populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier en fraiseraies.

Le développement des champignons comme agents de lutte nécessite une meilleure compréhension, d'une part, de la dynamique insecte-pathogène et d'autre part, de leur écologie. La dynamique des populations d'insectes maintient la densité de chaque espèce d'insecte à un niveau particulier dans son habitat. Les maladies apparaissent le plus souvent suite à une grande densité des populations d'insectes-hôtes. Ces maladies sont provoquées par différents agents entomopathogènes tels que les microchampignons causant par la suite une épidémie parmi les insectes (Ferron et al. 1993). L'identification des facteurs-clés qui ont un rôle dans la dynamique des interactions insecte-pathogène peut être difficile. Des études épizootiologiques doivent avoir lieu à l'avenir afin de programmer les applications de *B. bassiana*, déterminer les doses nécessaires et estimer l'impact des facteurs abiotiques sur la survie et l'efficacité des spores etc. De plus, l'identification et l'implémentation de stratégies de gestion phytosanitaire doivent être réalisées pour dévier les contraintes environnementales touchant l'efficacité de cet entomopathogène prometteur.

2.5. Dommages et pertes associés aux attaques de *L. lineolaris* et d'*A. signatus*

Le but ultime des stratégies de gestion phytosanitaire est de minimiser la perte économique occasionnée par des insectes ravageurs. Butt et Goettel (2000) suggèrent qu'une évaluation des dommages de plants dans les parcelles traitées et témoins puisse être une approche intéressante pour mesurer l'impact d'un agent entomopathogène. Malgré que la mortalité prenne plus de temps en conditions de champ, le comportement alimentaire de l'insecte ravageur peut être affecté durant la période entre l'infection et la mort. La réduction de l'alimentation suite à l'application des hyphomycètes entomopathogènes peut avoir un impact significatif sur la protection des cultures. En culture de pomme de terre, Fargues et al. (1994) ont

signalé une réduction substantielle de 57 % de la consommation du feuillage par les larves du doryphore de la pomme de terre, 2 jours suivant l'application de *B. bassiana*.

Il est généralement admis que les adultes et les nymphes de la punaise terne sont responsables d'un grand pourcentage des dommages aux fraises (Bostanian et Mailoux, 1994). L'alimentation de cet insecte sur les achènes diminue la production d'auxine causant ainsi des fruits déformés (Vincent et al. 1990). Alors que l'adulte de l'anthonome de la fleur du fraisier cause des pertes de rendement en fraises en coupant les tiges des fruits. Pour lutter contre les populations d'insectes ravageurs en fraiseraies, il est essentiel de choisir des isolats fortement virulents pour limiter les dommages, puisque les critères esthétiques exigés lors des récoltes de fraises sont très élevés. Les résultats ont démontré que les applications multiples des conidies de *B. bassiana* fournissent un contrôle significatif des populations de nymphes de *L. lineolaris* et d'adultes d'*A. signatus* dans les parcelles traitées comparativement à celles des témoins. En plus, on a également démontré que les applications multiples des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha permettent une réduction des dommages et des pertes en fruits causés par les attaques de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier dans les parcelles traitées comparativement à celles du témoin. Ainsi, les pourcentages de fraises malformées associés au comportement alimentaire de *L. lineolaris* ont été réduits de 26 % et les pertes de rendement en fruits associées au comportement de ponte d'*A. signatus* ont été diminuées de 36 %.

Conclusion

Les progrès accomplis dans l'efficacité de la protection des cultures contre les insectes ravageurs ont largement contribué à l'amélioration quantitative et qualitative de la production agricole. Afin de développer une méthode de lutte biologique utilisant *B. bassiana* contre les principaux insectes ravageurs du fraisier, cette recherche s'est basée sur cinq étapes : 1) étudier la biologie de ces ravageurs ; 2) étudier la biologie de leur ennemi naturel, *B. bassiana* ; 3) sélectionner des isolats virulents contre ces ravageurs ; 4) mettre au point un outil moléculaire permettant d'identifier et de différencier les isolats de *B. bassiana* et 5) valider les expériences réalisées au laboratoire par des essais sur le terrain.

Lutter contre les insectes ravageurs du fraisier en utilisant leurs ennemis naturels devient envisageable à grande échelle dans un délai raisonnable grâce aux progrès de la recherche, alliant des travaux de laboratoire et de terrain dans une optique opérationnelle. L'agent pathogène de lutte biologique le plus prometteur est actuellement *B. bassiana*. Les qualités d'efficacité insecticide, de relative spécificité, de biodégradabilité font en sorte que cet agent peut être considéré comme une alternative intéressante aux pesticides chimiques classiques. Cette recherche est, à ma connaissance, la première étude exhaustive du genre menée sur plusieurs isolats de *B. bassiana* à partir des épreuves biologiques au laboratoire jusqu'à la validation des résultats au champ. Elle démontre le potentiel insecticide de *B. bassiana* pour lutter efficacement contre les populations des principaux insectes ravageurs d'importance économique en fraiseraies au Québec. La demande sans cesse croissante pour des alternatives à risques réduits pour l'environnement constituait la prémisse au projet.

Il a été également pris en compte lors de cette recherche les effets qu'aurait *B. bassiana* sur un représentant de l'entomofaune utile. Une attention particulière a été portée aux isolats de *B. bassiana* qu'on a choisi pour lutter contre les ravageurs ciblés. Le criblage des isolats de *B. bassiana* a démontré que la majorité des isolats étudiés n'ont pas d'effet nocif sur la coccinelle maculée.

L'emploi de *B. bassiana* dans l'environnement doit nécessairement être assujéti à une connaissance approfondie des isolats permettant une identification précise et un suivi environnemental. L'outil moléculaire applicable au niveau de l'ADN génomique a permis d'établir l'identification et la caractérisation de certains isolats de *B. bassiana*. Par l'identification génétique des isolats, il était possible de confirmer l'identité des isolats prélevés sur les insectes traités assurant ainsi un suivi environnemental des isolats après leurs applications au champ. L'outil moléculaire développé pourrait être utilisé dans d'autres projets de recherche pour l'identification de nouveaux isolats. Les empreintes génétiques sont requises par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) lors de l'homologation des produits biologiques au Canada.

De nombreux facteurs affectent l'efficacité des champignons entomopathogènes. Leur potentiel comme agents de lutte biologique résulte des propriétés des populations de l'hôte et du pathogène et des conditions du milieu. Ces facteurs interagissent. Certains sont liés au pathogène : virulence et spécificité de l'hôte (qui sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte microbiologique), potentiel épizootique, capacité de survie et polymorphisme génétique des populations fongiques. D'autres dépendent de l'hôte : variabilité de la sensibilité des populations hôtes, facteurs internes affectant la sensibilité de l'hôte (influence du stade de développement), facteurs des populations d'hôtes (densité de populations), comportement et nutrition. Enfin, la sensibilité extrême aux conditions environnementales (rayonnement solaire, température, humidité) est le principal inconvénient des champignons entomopathogènes. Ces facteurs influencent la persistance de l'activité insecticide du champignon, la viabilité des conidies sur le feuillage traité et la sporulation sur le cadavre de l'insecte.

La viabilité et la persistance de l'activité insecticide des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* sur le feuillage ont été évaluées en fraiseraiies. Alors que dans la littérature, il est reporté que les conidies de *B. bassiana* ont un

temps de survie sur les feuilles ne dépassant pas 3 à 4 jours, les résultats ont démontré pour la première fois que les conidies peuvent demeurer vivantes jusqu'à 6 jours sur le feuillage du fraisier et plus intéressant, conserver leur potentiel insecticide. Durant la période de floraison, les applications multiples de *B. bassiana*, sur une base hebdomadaire, ont permis le contrôle des populations de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier favorisant ainsi une protection des plants du fraisier contre les attaques de ces deux ravageurs.

Cette recherche a démontré pour la première fois qu'il est possible d'utiliser le même isolat pour lutter contre différents ravageurs dans une régie de culture. L'idée d'appliquer un seul isolat est importante dans une stratégie de contrôle phytosanitaire ciblant les principaux insectes ravageurs en fraiseraies. Il ressort que les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, indigènes au Québec, sont bien adaptés aux conditions abiotiques en fraiseraies. Les applications foliaires de *B. bassiana* à un taux de 1×10^{13} conidies/ha ont provoqué des mortalités élevées des insectes ravageurs. Ceci est très intéressant pour l'implémentation en champ de programmes de lutte biologique ou de lutte intégrée, car ce taux est relativement faible et économiquement acceptable. De plus, les résultats ont démontré que le contact des gouttelettes de la solution fongique sur la cuticule pendant l'application n'est pas un pré-requis pour amorcer l'infection. L'insecte peut efficacement être contaminé en se nourrissant sur les feuilles.

L'utilisation de *B. bassiana* semble être un outil intéressant pour contrôler les populations de *L. lineolaris* et d'*A. signatus* en fraiseraies. Cependant, plus de travaux doivent être réalisés pour optimiser l'utilisation de cet agent entomopathogène, particulièrement au niveau des concentrations fongiques devant être appliquées sur le terrain et le développement d'une formulation assurant une plus grande persistance de l'activité insecticide de conidies.

L'un des objectifs lors de cette recherche était de réduire la dépendance aux pesticides chimiques. Si on en arrivait à diminuer cette dépendance, les producteurs seraient en mesure de réduire leurs frais d'exploitation ainsi que l'impact sur l'environnement. L'industrie des fraises du Québec y gagnerait en durabilité et en compétitivité. Les résultats de ce projet proposent aux producteurs de fraises une approche viable, rentable et apportant une valeur ajoutée à leur production. De plus, les résultats obtenus dans cette culture pourraient être appliqués à d'autres cultures au Québec.

L'une des voies les plus prometteuses de l'utilisation raisonnée des champignons entomopathogènes se situe au niveau de la lutte préventive, c'est-à-dire avant les explosions démographiques de ravageurs. Dans le cas de la punaise terne et de l'anthonome de la fleur du fraisier, l'utilisation judicieuse de biopesticides pourrait permettre le maintien des populations à un niveau inférieur au seuil d'abondance. Il est essentiel de continuer à acquérir une bonne connaissance de la bio-écologie des espèces-cibles et de maintenir les moyens classiques (prospections) et modernes (biomodélisation, télédétection) d'investigation pour établir une veille permanente des ravageurs du fraisier dans les zones à haut risque. À cette condition, la lutte biologique, alliée ou non à la lutte chimique, pourrait devenir l'un des éléments importants d'une stratégie de contrôle intégré des populations de ravageurs susceptibles de provoquer des dégâts aux cultures de fraises.

Références

- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Adane K, Moore D, Archer SA, 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *J. Stor. Prod. Res.* 32, 105-113.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2005. Profil de la culture de la fraise au Canada. Programme de réduction des risques liés aux pesticides. Centre sur la lutte antiparasitaire.
http://www4.agr.gc.ca/resources/prod/doc/prog/prrp/pdf/strawberry_f.pdf.
- Ahmed SI, Leather SR, 1994. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management - some points for consideration. *Int. J. Pest Manag.* 40, 287-292.
- Althouse CM, Petersen BE, McEwen LC, 1997. Effects of young American kestrels (*Falco sparvericus*) exposed to *Beauveria bassiana* bioinsecticide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 507-512.
- Alves RT, Bateman RP, Prior C, Leather SR, 1998 Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Prot.* 17, 675-679.
- Andersen SO, 1979. Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 34, 29-61.
- Bajan C, Bilewicz-Pawinska T, 1971. Preliminary studies on the role of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in reduction of *Lygus rugulipennis* Popp. *Ekol. Pol.* 19, 35-46.
- Barbercheck ME, Kaya HK, 1990. Interaction between *Beauveria bassiana* and the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 225-234.
- Barbercheck ME, Kaya HK, 1991. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 20, 707-712.
- Barranco-Flrido JE, Alatorre-Rosas R, Gutierrez-Rojas M, Viniestra-Gonzalez G, Saucedo-Casteneda G, 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enz. Microb. Technol.* 30, 910-915.

- Bateman RP, 1994. Physical properties and atomisation of ULV formulations of myco-insecticides. Microbial Control of Pests IOBC wprs Bulletin. 17, 189-192.
- Belshaw R, Bensasson D, 2006. The rise and falls of introns. Heredity, 96, 208-213.
- Berretta MF, Lecuona RE, Zandomeni RO, Grau O, 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. J. Invertebr. Pathol. 71, 145-150.
- Bhattacharya D, Reeb V, Simon DM, Lutzoni F, 2005. Phylogenetic analyses suggest reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal DNA. BMC Evol. Biol. 5, 68-79.
- Bidochka M, Khachatourians GG, 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J. Invertebr. Pathol. 56, 362-370.
- Bidochka MJ, Miranpuri GP, Khachatourians G.G, 1993. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. toward *Lygus* bug (Hemiptera : Miridae). J. Appl. Entomol. 115, 313-317.
- Boivin G, Stewart RK, 1982. Phénologie et comportement biologiques de cinq espèces de Miridés phytophages (Hemiptera: Miridae) dans une pommeraie du sud-ouest du Québec. Ann. Soc. Ent. 27, 148-157.
- Bomford MK, Vernon RS, 2005. Root weevil (Coleoptera: Curculionidae) and ground beetle (Coleoptera: Carabidae) immigration into strawberry plots protected by fence or portable trench barriers. Environ. Entomol. 34, 844-849.
- Booth SR, Tanigoshi LK, Shanks CH Jr, 2002. Evaluation of entomopathogenic nematodes to manage root weevil larvae in Washington state cranberry, strawberry, and red raspberry. Environ. Entomol. 31, 895-902.
- Bostanian NJ, Mailoux G, 1994. La punaise terne et la production de fraise. Direction de la Recherche, Bulletin technique 1994-1F.
- Bostanian NJ, Mailloux G, Binns MR, Thibodeau PO, 1990. Seasonal fluctuation of *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae) nymphal populations in strawberry fields. Agric. Ecos. Environ. 30, 327-336.
- Boucias DG, Pendland JC, 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publ., Boston, 548 p.

- Boucias DG, Pendland JC, Latge JP, 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycosis in arthropod host. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Cole GT, Hoch HC (eds.), Plenum, New York, pp. 101-128.
- Boucias DG, Pendland JC, Latge JP, 1998. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1795-1805.
- Boulanger N, Ehret-Sabatier L, Brun R, Zachary D, Bulet P, Imler JL, 2001. Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite *Crithidia* spp. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 129-137.
- Bruck DJ, 2004. Natural occurrence of entomopathogens in Pacific Northwest nursery soils and their virulence to the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 33, 1335-1343.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329-344.
- Burgues DH, 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Burges HD (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 31-185.
- Butt TM, 1990. Fungal infection processes. A Mini-Review 5th Int. Colloquium of Invertebrate Pathology. Adelaide. Soc. Invertebr. Pathol. pp. 121-124.
- Butt TM, 2002. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: The mycota XI agricultural applications. Kempken F (ed.), Springer, Berlin, Allemagne, pp. 111-134.
- Butt TM, Becket, 1994. Structural studies on the infection processes of entomogenous fungi. International Colloquium for Invertebr. Pathol. 28th Sept. 2nd. Montpellier, France. Proceedings, pp. 311-314.
- Butt TM, Goettel MS, 2000. Bioassays of entomogenous fungi. In: Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Navon A, Ascher KRS (eds.), CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 141-196.
- Butt TM, Ibrahim L, Ball V, Clark SJ, 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr. Sci. Techn.* 4, 207-214.
- Butt TM, Ibrahim L, Clark SJ, Beckett A, 1995. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol. Res.* 99, 945-950.

- Butt TM, Barrisever M, Drummond J, Schuler TH, Tillemans FT, Wilding N, 1992. Pathogenicity of the entomogenous hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae* against the chrysomelid beetles *Psylliodes chrysocephala* and *Phaedon cochleariae*. *Biocontr. Sci. Techn.* 2, 327-334.
- Caltagirone LE, Doult RL, 1989. The history of the vedalia beetle importation to California and its impact on the development of biological control. *Ann. Rev. Entomol.* 34, 1-16.
- Campos RA, Arruda W, Boldo JT, da Silva MV, de Barros NM, de Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH, 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Cur. Genet.* 50, 257-261.
- Casida JE, Quinstad GB, 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Ann. Rev. Entomol.* 43, 1-16.
- Castrillo LA, Brooks WM, 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 190-196.
- Castrillo LA, Vandenberg JD, Wraight SP, 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J. Invertebr. Pathol.* 82, 75-83.
- Cermak P, Walker GM, 1992. Tarnished plant bug: a major pest of strawberry. Fact Sheet No. 92-108, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Canada, p. 4.
- Chagnon M, Gingras J, de Oliveira D, 1989. Impact of honey bee visits on the pollination rate of strawberries. *J. Econ. Entomol.* 82, 1350-1353.
- Chagnon M, Payette A, Jean C, Cadieux C, 1990. Modes alternatifs de répression des insectes dans les agro-écosystèmes québécois, tome 2: Identification des insectes ravageurs et état de l'agriculture biologique au Québec. Ministère de l'Environnement et Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse, Québec, 85 p.
- Charnley AK, 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In: *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Whipps JM, Lumsden RD (eds.), Cambridge Univ. Press, UK, pp. 85-123.
- Charnley AK, St. Leger RJ, 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Publishing Co., New York, pp. 267-286.

- Chew JSK, Strongman DB, MacKay RM, 1997. RFLP analysis of rRNA intergenic spacer regions of 23 isolates of the entomopathogen *Paecilomyces farinosus*. *Can. J. Bot.* 75, 2038-2044.
- Chikwenhere GP, Vestergaard S, 2001. Potential effects of *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin on *Neochetina bruchi* Hustache (Coleoptera: Curculionidae), a biological control agent of water hyacinth. *Biol. Contr.* 21, 105-110.
- Clark TB, Kellen WR, Fukuda T, Lindegren JE, 1968. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to the three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 11, 1-7.
- Clarkson JM, Charnley AK, 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.* 4, 197-204
- Cleveland TC, 1985. Toxicity of several insecticides applied to tarnished plant bugs. *J. Entomol. Sci.* 20, 95-97.
- Cleveland TC, Furr RE, 1979. Toxicity of methyl parathion applied topically to tarnished plant bugs. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15, 304-307.
- Cloutier C, Cloutier C, 1992. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In: la lutte biologique. Vincent C, Coderre D (eds.). Gaétan Morin éditeur ltée. Chicoutimi, Québec, Canada, pp. 19-88.
- Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC, 2002. Allelic variation a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome.* 45, 125-132.
- Colbert S, 1989. Influence de la variété de pollen sur la production du fraisier et du framboisier. Mémoire, UQÀM. Montréal, Québec, Canada, 45 p.
- Copping LG, 2001. *The Biopesticide Manual* (2e éd.). British Crop Protection Council, UK, 528 p.
- Day WH, 1995. Biological observation of *Phasia robertsonii* (Townsend) (Diptera: Tachinidae), a native parasite of adult plant bugs (Hemiptera: Miridae) feeding on alfalfa and grasses. *J. New York Entomol. Soc.* 103, 100-106.
- Day WH, Hedlund RC, Saunders LB, Coutinot D, 1990. Establishment of *Peristenus digoneuti* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of the tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae), in the United States. *Environ. Entomol.* 19, 1528-1533.

- Destefano R, Destefano S, Messias C, 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) using specific primers. *Gen. Mol. Biol.* 27, 245-252.
- Devey ME, Fiddler TA, Liu BH, Knapp SJ, Neale DB, 1994. An RFLP linkage map for loblolly pine based on a three-generation outbred pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 88, 273-278.
- Devi KU, Sridevi V, Mohan CM, Padmavathi J, 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, J. *Invertebr. Pathol.* 88, 181-189.
- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J, 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers.* 47, 465-477.
- Dirlewanger E, Isaac PG, Ranade S, Belajouza M, Cousin R, de Vienne D, 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theor. Appl. Genet.* 88, 17-27.
- Edelstein JD, Lecuona RE, Trumper EV, 2004. Selection of culture media and *In Vitro* assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*, *Biol. Contr.* 33, 737-742.
- Enkerli J, Widmer F, Gessler C, Keller S, 2001. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycol. Res.* 105, 1079-1087.
- Fargues J, Luz C, 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 202-211.
- Fargues J, Delmas J C, LeBrun RA, 1994. Leaf consumption by larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *J. Econ. Entomol.* 87, 67-71.
- Fargues J, Ouedraogo A, Goettel MS, Lomer CJ, 1997b. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontr. Sci. Technol.* 7, 345-356.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Rougier M, 1997a. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia.* 89, 383-392.

- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ, Rougier M, 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*. 135, 171-181.
- Faria M, Wraight SP, 2001. Biological control of *Bemisia* with fungi. *Crop Protect.* 20, 767-778.
- Feng M, Johnson JB, 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 19, 785-790.
- Feng M, Poprawski TG, Khachatourians GG, 1994. Production, formulation, and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontr. Sci. Technol.* 4, 3-34.
- Ferron P, 2000. La lutte biologique : définition, concept et stratégie. *Dossiers de l'environnement de l'INRA*, pp. 19, 7-18.
- Ferron P, Fargues J, Riba G, 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In: *Handbook of applied mycology*. Arora DK, Ajelio L, Mukerji KG (eds.). Marcel Dekker, New York, USA, pp. 665-706.
- Ferron P, Fargues J, Riba G, 1993. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (*Handbook of applied mycology*, vol. 2, Humans, Animals and Insects, 1991) (Traduit de l'anglais par Christine Silvy).
- Floate KD, Berube J, Boiteau G, Dossdall LM, Van Frankenhuyzen K, Gillespie DR, Moyer J, Philip HG, Shamoun S, 2001. Pesticides and biological control. In: *Biological control programmes in Canada, 1981-2000*. Mason PG, Huber JT (eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 4-14.
- Fouly H, Wilkinson HT, Chen W, 1997. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycologia*. 89, 590-597.
- Fugita T, 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* 2, 346-353.
- Gardner WA, Sutton RM, Noblet R, 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi* and *Nosema necatrix* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 5, 616-618.
- Gaugler R, 1997. Alternative paradigms for commercializing biopesticides. *Phytoparasitica*. 25, 197-182.
- Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B, Vilcnskas A, 2000. Fungi as elicitors of insect

- immune responses. Arch. Insect Bioch. Physiol. 44, 49-68.
- Glare TR, Inwood AJ, 1998. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. Mycol. Res. 102, 250-256.
- Goerzen, DW, Erlandson MA, Moore KC, 1990. Effect of two insect viruses and two entomopathogenic fungi on larval and pupal development in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab.) (Hymenoptera: Megachilidae). The Can. Entomol. 122, 1039-1040.
- Goettel MS, Inglis GD, 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey LA (ed.), Academic Press, London, pp. 213-249.
- Goettel MS, Johnson DL, 1994. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. In: Biological control of locusts and grasshoppers. Lomer CJ, Prior C (eds.). CAP International/IITA, Wallingford, UK, pp. 356-361.
- Goettel MS, Inglis GD, Wraight SP, 2000. Fungi. In: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Lacey LA, Kaya HK (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 255-282.
- Goettel MS, Poprawski, TJ, Vandenberg, JD, Li, Z, Roberts, DW, 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Safety of microbial insecticides. Ed. by Laird M, Lacey LA, Davidson EW, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 209-232.
- Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW, 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. Gen. Microbiol. 135, 2233-2239.
- Gordon RD, 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north Mexico. J. N. Y. Entomol. Soc. 93, 1-912.
- Gorinstein S, Paccola-Meirelles D, Belo VA, Azevedo JL, 1996. Characterization of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* through electrophoretic patterns of their protein fractions. J. Ferment. Bioeng. 82, 89-92.
- Griffith JM, Davis AJ, Grant BR, 1992. Target sites of fungicides to control Oomycetes. In: target sites of fungicide action. Kaller W (ed.), CRC, Boca Raton, FL. pp. 69-100.
- Groden E, Lockwood JL, 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island. J. Invertebr. Pathol. 57, 7-16.

- Grossman J, 1989. Update: strawberry IPM features. Biological and mechanical controls. The IPM Practitioner. Monitoring the Field of Pest Management. 6, 1-4.
- Gruła EA, Woods SP, Russell H, 1984. Studies utilizing *Beauveria bassiana* as an entomopathogen. In: Infection processes of fungi- Conference Report. Robert DW, Aist JR (eds.). Rockefeller Foundation, New York, USA, pp. 147-152.
- Hajek AE, St-Leger RJ, 1994. Interaction between fungal pathogens and insect host. Ann. Rev. Entomol. 39, 293-322.
- Hajek AE, Humber RA, Elkinton JS, May B, Walsh SRA, Silver J, 1990. Allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses confirm *Entomophaga maimaiga* responsible for 1989 epizootics in North American gypsy moth populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 6979-6982.
- Handley DT, Pollard JE, 1993. Microscopy examination of tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) feeding damage to strawberry. J. Econ. Entomol. 86, 505-510.
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D, 2005. The natural history of group I introns. Trends Genet. 21, 111-119.
- Hegedus DD, Bidochka MJ, Khachatourians GG, 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexoamines or glucose, Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 641-647.
- Hodek I, Honek A, 1996. Ecology of Coccinellidae. Kluwer Academic Publishers, Boston, 464 p.
- Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. Nature Immunol. 3, 121-126.
- Hollingsworth RG, Steinkraus DC, Tugwell NP, 1997. Responses of Arkansas populations of tarnished plant bugs (Hemiptera: Miridae) to insecticides and tolerance differences between nymphs and adults. J. Econ. Entomol. 90, 2-26.
- Hou RF, Chang JK, 1985. Cellular defense response to *Beauveria bassiana* in the silkworm, *Bombyx mori*. App. Entomol. Zool. 20, 118-125.
- Humber RA, 1997. Fungi: preservation. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey LA (ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 153-185.

- Hunter-Fujita FR, Entwistle PF, Evans HF, Crook N, 1998. Insect viruses and pest management. Wiley, Chichester, UK, 350 p.
- Ibrahim L, Butt TM, Beckett A, Clark SJ, 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 103, 901-907.
- Ignoffo CM, 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomol. 75, 516-525.
- Inglis GD, Goettel MS, Johnson DL, 1993. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. Biol. Contr. 3, 258-270.
- Inglis, GD, Johnson DL, Goettel MS, 1995. Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* conidia on leaves of alfalfa and wheat. Biocontr. Sci. Technol. 5, 365-369.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H, 2001. Use of Hyphomycete fungi for managing insect pests. In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 23-69.
- Inglis GD, Ivie TJ, Duke GM, Goettel MS, 2000. Influence of formulations on rainfastness of *Beauveria bassiana* conidia on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. Biol. Contr. 18, 55-64.
- Inyang EN, McCartney HA, Oyejola B, Ibrahim L, Pye BJ, Archer SA, Butt TM, 2000. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. Mycol. Res. 104, 653-661.
- James RR, Lighthart B, 1994. Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera : Coccinellidae) to four entomogenous fungi. Envir. Entomol. 23, 190-192.
- Jaronski ST, Lord J, Rosinska J, Bradley C, Hoelmer K, Simmons G, Osterlind R, Brown C, Staten R, Antilla L, 1998. Effect of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide on beneficial insects under field conditions. Proceedings, Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases. 2, 651-656.
- Jaros-Su J, Groden E, Zhang J, 1999. Effects of selected fungicides and timing of fungicide application on *Beauveria bassiana* induced mortality of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Biol. Contr. 15, 259-269.

- Jenkins NE, Goettel MS, 1997. Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. In: Microbial control of grasshoppers and locusts. Goettel MS, Johnson DL (eds.). Memoirs Entomol. Soc. Canada. 171, 37-48.
- Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ, 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontr.* 19, 21-31.
- Johnson DL, Goettel MS, Bradley C, Van der Paauw H, Maiga B, 1992. Field trials with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali, West Africa, July, 1990. In: Biological control of locusts and grasshoppers. Lomer CJ, Prior C (eds.), CAB International, Wallingford, UK, pp. 296-310.
- Joshi L, St. Leger R, Bidochka MJ, 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Lett.* 125, 211-218.
- Jourdheuil P, Grison P, Fraval A, 1992. La lutte biologique : un aperçu historique. La lutte biologique. Dossier de la Cellule environnement de l'INRA. 5, 11-35.
- Kamp AM, Bidochka MJ, 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. App. Microbiol.* 35, 74-77.
- Kassa A, Zimmermann G, Stephan D, Vidal S, 2002. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to Entomopathogenic Fungi from Ethiopia. *Biocontr. Sci. Technol.* 12, 727-736.
- Kerwin JL, Petersen EE, 1997. Fungi: Oomycetes and Chytridiomycetes. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey LA (ed.), Academic Press, New York, USA, pp. 251-268.
- Khachatourians GG, 1991. Physiology and genetic of entomopathogenic fungi. In: Handbook of applied mycology. Mukerji DK, Drouhet E (eds.). Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 613-663.
- Khachatourians GG, 1992. Virulence of five *Beauveria bassiana* strains, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 212-214.
- Khanidazeh S, Lareau M, Lamarre M, Buszard D, 1992. Simulating the effect of spring frost and clipper weevil on yield of strawberry. *Small Fruit Rev.* 1, 25-31.

- Kicherer S, Backes G, Walther U, Jahoor A, 2000. Localizing QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100, 881-888.
- Kouassi M, 2004. Utilisation d'isolats du micro-champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) pour le contrôle efficace de la punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hémiptère: Miridae) en culture de laitue et de céleri. Thèse du doctorat en sciences de l'environnement, UQÀM, QC, Canada, 209 p.
- Kouassi M, Coderre D, Todorova S, 2003b. Compatibility of zineb, dimethoate and *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin against tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae). *J. Entomol. Sci.* 38, 359-367.
- Kouassi M, Coderre D, Todorova S, 2003a. Effect of Plant Type on the Persistence of *Beauveria bassiana*. *Biocontr. Sci. Technol.* 13, 415-427.
- Kouassi M, Coderre D, Todorova S, 2003c. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *J. Appl. Entomol.* 127, 421-426.
- Kovach J, 1996. Using *Beauveria bassiana* to manage tarnished plant bug in strawberries 1995. *Strawberry IPM Update* (IA State Univ.), Ames, Iowa, 3, 7-8.
- Krueger SR, Nechols JR, Ramoska WA, 1991. Infection of Chinch bug, *Blissus leucopterus* (Hemiptera: Lygaeidae) adults from *Beauveria bassiana* conidia in soil under controlled temperature and moisture conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 19-26.
- Labuschagne L, 1999. Black vine weevil-The Millennium bug ? *Antenna. Bull. Royal Entomol. Soc.* 23, 213-220.
- Lacey LA, 1997. *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London, UK, 409 p.
- Lecuona R, Clement JL, Riba G, Joulie C, Juarez P, 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *J. Econ. Entomol.* 90, 119-123.
- Leland JE, Behle RW, 2005. Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris*. *Biocontr. Sci. Technol.* 15, 309-320.
- Leland EJ, McGuire, MR, 2006. Effects of different *Beauveria bassiana* isolates on

- field populations of *Lygus lineolaris* in pigweed (*Amaranthus* spp.). Biol. Contr. 39, 272-281
- Leland EJ, McGuire, MR, Grace GA, Jaronski ST, Ulloa M, Park YH, Plattner RD, 2005. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* sp.) (Heteroptera: Miridae). Biol. Contr. 35, 104-114.
- Lewis LC, Berry EC, Obrycki JJ, Bing LA, 1996. Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana*, in suppressing larval populations of the European corn borer. Agric. Ecosys. Environ. 57, 27-34.
- Li, DP, Holdom DG, 1994. Effect of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J. Invertebr. Pathol. 63, 209-211.
- Lipa JJ, 1975. White muscardines (*Beauveria* sp.). In: An outline of insect pathology. Foreign Sciences Publications. Dept NCSTEI, Warsaw, Poland, pp. 139-142.
- Liu BH, 1998. Statistical Genomics: linkage, mapping and QTL Analysis. CRC Press, New York, USA, pp. 273-299.
- 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). J. Invertebr. Pathol. 82, 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). J. Econ. Entomol. 95, 675-681.
- Lopez Lastra CC, Hajek AE, Humber RA, 2002. Comparing methods for preservation of cultures of entomopathogenic fungi. Can. J. Bot. 80, 1126-1130.
- Lubberstedt T, Xia X, Tan G, Liu X, Melchinger A, 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. Theor. Appl. Gen. 99, 593-598.
- Magelhaes BP, Lord JC, Wraight SP, Daoust RA, Roberts DW, 1981. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. J. Invertebr. Pathol. 52, 471-473.

- Mailloux G, Bostanian NJ, 1993. Development of the strawberry bud weevil (Coleoptera: Curculionidae) in strawberry fields. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86, 384-393.
- Majchrowicz I, Poprawski TJ, 1993. Effects *in vitro* of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. *Biocontr. Sci. Technol.* 3, 321-336.
- MAPAQ - ISQ, 2005. Profil sectoriel de l'industrie bioalimentaire au Québec. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Institut de la statistique du Québec, 124 p.
http://www.stat.gouv.qc.ca/publications/economi/prof_bio.html.
- Marcandier S, Khachatourians GG, 1987. Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera: Acrididae), to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Hyphomycete): influence of relative humidity. *Can. Entomol.* 119, 901-907.
- Markova G, 1992. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin as a pathogen of ash weevil, *Stereonychus fraxini* Deg. (Col., Curculionidae), in Bulgaria. *J. Appl. Entomol.* 114, 275-279.
- Maurer P, Couteaudier Y, Girard PA, Bridge PD, Riba G, 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101, 159-164.
- Mazumder D, Puzari KC, Hazarika LK, 1995. Mass production of *Beauveria bassiana* and its potentiality on rice hispa. *Indian Phytopathol.* 48, 275-278.
- McCoy CW, 1990. Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: *New direction in biological control*. Baker RR, Dunn PE, Liss AR (eds.), New York, USA, pp. 139-159.
- McCoy CW, Samson RA, Boucias DG, 1988. Entomogenous fungi. In: *Handbook of natural pesticides, Vol. V: Microbial insecticides, Partie A: Entomogenous protozoa and fungi*. Ignoffo CM, Mandava NB (eds.). CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 151-236.
- Miranpuri GS, Khachatourians GG, 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol.* 16, 215-234.
- Mondal P, Bhattacharya AK, 2004. Assessment of different media for mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Proc. Nat. Acad. Sci. India.* 74, 161-169.

- Moore D, Caudwell RW, 1997. Formulation of entomopathogens for control of grasshoppers and locusts. In: Microbial control of grasshoppers and locusts. Goettel MS, Johnson DL (eds.). Memoirs Entomol. Soc. Canada. 171, 49-67.
- Moore D, Bridge PD, Higgins PM, Bateman RP, Prior C, 1993. Ultra-violet radiation damage *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann. Appl. Biol. 122, 605-616.
- Moorhouse ER, Gillespie AT, Charnley AK, 1993. Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). J. Invertebr. Pathol. 62, 15-21.
- Moriarty F, 1969. The sublethal effects of synthetic insecticides on insects. Biol. Rev. 44, 321-357.
- Moscardi F, 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol. 44, 257-289.
- Napolitano R, Juárez MP, 1997. Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. Arch. Biochem. Biophys. 344, 208-214.
- Navon A, 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. Crop Protect. 19, 669-676.
- Nelson TL, Low A, Glare TR, 1996. Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*, Proc. 49th New Zealand Plant Protection Conf., pp. 257-261.
- Neueglise C, Brygoo Y, 1994. Identification of group-I introns in the 28 s rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. Curr. Genet. 27, 38-45.
- Neueglise C, Brygoo Y, Vercambre B, Riba G, 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. Mycol. Res. 98, 322-328.
- Nikoh N, Fukatsu T, 2001. Evolutionary dynamics of multiple group I introns in nuclear ribosomal RNA genes of endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. Mol. Biol. Evol. 18, 1631-1642.
- Noma T, Strickler K, 1999. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of lygus bug (Hemiptera: Miridae) in alfalfa seed fields. J. Agric. Urban Entomol. 16, 215-233.

- Olmert I, Kenneth RG, 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. Environ. Entomol. 33, 33-38.
- Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ, 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathol. 137, 37-43.
- Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Quigley NB, Leckie BM., 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: Emerging concepts in plant health management. Lartey RT, Caesar AJ (eds.). Research Signpost, T.C., Kerala, India, pp. 255-269.
- Pace KE, Baum LG, 2004. Insect galectins: roles in immunity and development. Glycoconj. J. 19, 607-614.
- Papierok B, Hajek AE, 1997. Fungi: Entomophthorales In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey LA (ed.), Academic Press, New York, USA, pp. 187-212.
- Paradis RO, Simard LG, 1979. Les ravageurs des fraisières du Québec. Station de recherche Agriculture Canada, St-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada. Bull. Techn. 12, 1-12.
- Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE, Steinkraus DS, 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Butt TM, Jackson C, Magan N (eds.). CABI International, Wallingford, UK, pp. 71-154.
- Pfeifer TA, Khachatourians GG, 1993. Electrophoretic karyotype of the entomopathogenic deuteromycete, *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 61, 231-235.
- Pfeifer TA, Hegedus DD, Khachatourians GG, 1993. The mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: analysis of the ribosomal RNA region. Can. J. Microbiol. 39, 25-31.
- Pichette J, 1991. Effet de l'enlèvement des fleurs sur la productivité et les principaux ravageurs à jours neutres. Mémoire, UQAM, Montréal, QC, Canada, 99 p.
- Pingel RL, Lewis LC, 1996. The fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in a corn ecosystem: its effect on the insect predator *Coleomegilla maculata* De Gerer. Biol. Contr. 6, 137-141.
- Poprawski TJ, Wraight SP, 2000. Application and evaluation of entomopathogens in

- vegetable row crops: potato. In: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Lacey LA, Kaya HK (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, pp. 371-388.
- Poprawski TJ, Carruthers RI, Speese J, Vacek DC, Wendel LE, 1997. Early-season applications of the fungus *Beauveria bassiana* and introduction of the hemipteran predator *Perillus bioculatus* for control of Colorado potato beetle. Biol. Contr. 10, 48-57.
- Powell JR, 1983. Measuring genetic variation in natural populations. Where are we? In: Population Biology: Retrospect and prospect. By Charles E, King P, Dawson S, eds. Columbia University Press. New York, pp. 97-115.
- Prior C, 1990. The biological basis for regulating the release of micro-organism, with particular reference to the use of fungi for pest control. Asp. Appl. Biol. 24, 231-238.
- Quintela ED, McCoy CW, 1998. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. J. Invertebr. Pathol. 72, 220-230.
- Rakotonirainy MS, Dutertre M, Brygoo Y, Riba G, 1991. rRNA sequence comparisons of *Beauveria bassiana*, *Tolypocladium cylindrospora* and *Tolypocladium extinguens*. J. Invertebr. Pathol. 57, 17-22.
- Riba G, Katagiri K, Kawakami K, 1982. Preliminary studies on the susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), to some entomogenous hyphomycetes. App. Entomol. Zool. 17, 238-243.
- Riba G, Marcandier, 1984. Influence de l'humidité relative sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Soro-kin, hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübn. Agronomie. 4, 189-194.
- Richard C, Boivin G, 1994. Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada. Soc. Can. Phytopath. Soc. Can. Entomol. Ottawa, 590 p.
- Rombach MC, Aguda RM, Shepard BM, Roberts DW, 1986. Entomopathogenic fungi (Deuteromycotina) in the control of the black bug of rice (Hemiptera: Pentatomidae). J. Invertebr. Pathol. 48, 174-179.
- SAS Institute, 2002. JMP version 5. The statistical Discovery Software. Introduction guide. Statistics and graphics guide. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Schaefers GA, 1981. Pest management systems for strawberry insects. In: Handbook

- of pest management in agriculture. Pimentel D (ed.), vol. 3. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 377-404.
- Schopf A, Nussbaumer C, 1996. Influence of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Hym., Braconidae) on the hemolymph carbohydrate and glycogen content of its host larva, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae). J. Appl. Entomol. 120, 357-362.
- Siebeneicher SR, Vinson SB, Kenerley CM, 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. J. Invertebr. Pathol. 59, 280-285.
- Smits N, Rougier M, Fargues J, Goujet R, Bonhomme R, 1996. Inactivation of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia by diffuse and total solar radiation. FEMS Microbiol. Ecol. 21, 167-173.
- Snodgrass GL, 1996. Insecticide resistance in field population of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) in cotton in the Mississippi Delta. J. Econ. Entomol. 89, 1053-1059.
- Snodgrass GL, Elzen GW, 1994. Efficacy of Naturalis-L for adults and nymphs of the tarnished plant bug in cotton. Proceedings / Beltwide Cotton Conferences, Memphis, USA. 2, 1103-1104.
- Soderhall K, 1981. Fungal cell wall beta 1-3 glucans induce clotting and phenoloxydase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. Dev. Comp. Immunol. 5, 565-573.
- Soderhall K, Ajaxon R, 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. J. Invertebr. Pathol. 39, 105-109.
- Sohati PH, 1989. Studies on the egg parasitoids of *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae) in southwestern Quebec. M.Sc. Thesis.
- Starnes RL, Liu CL, Marrone PG, 1993. History, use, and future of microbial insecticides. Am. Entomol. 39, 83-91.
- Steinkrauss DC, Tugwell NP, 1997. *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Moniliales) effects on *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). J. Entomol. Sci. 32, 79-90.
- Steinkraus DC, Boys GO, Rosenheim JA. 2002. Classical biological control of *Aphis gossypii* with *Neozygites fresenii* in California cotton. Biol. Contr. 25, 297-304.

- St Leger RJ, 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and pathogens of insects (Vol. 2). Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds.). Academic Press Inc., New York, USA, pp. 211-225.
- St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM, 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48, 85-95.
- St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM, 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 295-302.
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK, 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 167-177.
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK, 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitaria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1371-1382.
- St Leger RJ, Lacetti LB, Staples RC, Roberts DW, 1990. Protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1401-1411.
- St Leger RJ, Allee LL, May B, Staples RC, Roberts DW, 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Res.* 96, 1007-1015.
- Tanada Y, Kaya HK, 1993. Insect pathology. Academic Press Inc., San Diego, USA, 666 p.
- Todorova SI, 1994. Effets de *Beauveria bassiana* sur *Coleomegilla maculata* lengi timberlake (Coleoptera: Coccinellidae) Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, 56 p.
- Todorova SI, 1998. Caractérisation et utilisation de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dans les programmes de lutte biologique. Thèse de doctorat, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, 104 p.
- Todorova SI, Coderre D, Duchene RM, Côté JC. 1998. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Environ. Entomol.* 27, 427-433.

- Todorova SI, Côté JC, Martel P, Coderre D, 1994. Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bio-assays on *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga*. 39, 159-169.
- Tzean SS, Hsieh LS, Wu WJ, 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, 215 p.
- Umble JR, Fisher JR, 2000. Temperature-dependent development of *Otiorhynchus ovatus* (Coleoptera: Curculionidae) pupae. *Environ. Entomol.* 29, 758-765.
- Umble JR, Fisher JR, 2002. Influence of temperature and photoperiod on preoviposition duration and oviposition of *Otiorhynchus ovatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95, 231-235.
- Urbain L, Drouin JF, 2003. Recueil statistique de l'industrie canadienne et québécoise de la fraise. Statistiques Canada.
- Urtz BE, Rice WC, 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 405-409.
- Vainio A, Hokkanen HMT, 1993. The potential of entomopathogenic fungi and nematodes against *Otiorhynchus ovatus* L. and *O. dubius* Ström (Coleoptera: Curculionidae) in the field. *J. Appl. Entomol.* 115, 379-387.
- Vandenberg JD, Shelton AM, Wilsey WT, Ramos M, 1998. Assessment of *Beauveria bassiana* sprays for control of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. *J. Econ. Entomol.* 91, 624-630.
- Varela A, Morales E, 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 67, 147-152.
- Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ, 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 363-368.
- Verscheure M, Lognay G, Marlier M, 2002. Revue bibliographique: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biocontr. Agron. Soc. Envir.* 6, 131-142.
- Vestergaard S, Gillespie AT, Butt TM, Schreiter G, Eilenberg J, 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to

- the Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontr. Sci. Technol.* 5, 185-192.
- Viaud M, Couteaudier Y, Levis C, Riba G, 1996. Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and teleomeric fingerprint. *Fungal Genet. Biol.* 20, 175-183.
- Vidal C, Fargues J, Lacey LA, 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 18-26.
- Vincent C, Bostanian NJ, 2005. Major Arthropod pests and pollinators of strawberry in Quebec, In: *Our strawberries*. Khanizadeh S, DeEll J (eds.), Publishing and Depository Services, Ottawa, Ont., pp.118-138.
- Vincent C, Coderre D, (Eds.) 1992. *La lutte biologique*. Gaëtan Morin Editeur (Montréal) et Lavoisier Tech Doc (Paris), 671 p.
- Vincent C, de Oliveira D, Belanger A, 1990. The management of insect pollinators and pests in Quebec strawberry plantations. In: *Monitoring and integrated management of arthropod pests of small fruit crops*. Bostanian NJ, Wilson LT, Dennehy T, (eds.), Intercept Ltd., Andover, UK, pp. 1-26.
- Wada S, Horita M, Hirayae K, Shimazu M, 2003. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. *Appl. Entomol. Zool.* 38, 551-557.
- Walstad JD, Anderson RF, Stambaugh, WJ, 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.* 16, 221-226.
- Wang C, Li Z, Typas MA, Butt TM, 2003. Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. *Mycol. Res.* 107, 1189-1200.
- Weiser J, 1972. *Beauveria* Vuill. In: *Nemoci hmyzu*. Naklad. Ceskoslov. Akademie, Prague, République tchèque, pp. 361-377.
- Wheeler AG Jr, 1999. *Otiorhynchus ovatus*, *O. rugosostriatus*, and *O. sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae): exotic weevils in natural communities, mainly mid-Appalachian shale barrens and outcrops. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 101, 689-692.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to*

- methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), Academic Press, Inc., New York, USA, pp. 315-322.
- Willoughby BE, Glare TR, Kettlewell FJ, Nelson TL, 1998. *Beauveria bassiana* as a potential biocontrol agent against the clover root weevil. Proceeding of the 51st New Zealand Plant Protection Conference, pp. 9-15.
- Wraight RJ, Roberts DW, 1987. Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* 28, 77-87.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S, 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Contr.* 17, 203-217.
- Wraight SP, Jackson MA, de Kock SL. 2001. Production, stabilization, and formulation of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Butt TM, Jackson CW, Magan, N (eds.), CAB International, Wallingford, UK. pp. 253-287.
- Wright JE, Chandler LD, 1991. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 58, 448-449.
- Wright JE, Chandler LD, 1992. Development of a biorational mycoinsecticide: *Beauveria bassiana* conidial formulation and its application against boll weevil populations (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 1130-1135.

Annexes

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Journal of Applied Entomology

Volume 132, Issue 2, pages 151–160, March 2008

Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*,
Anthonomus signatus and *Otiorhynchus ovatus*

R. Sabbahi, A. Merzouki, C. Guertin

Article first published online: 6 FEB 2008

DOI: 10.1111/j.1439-0418.2007.01248.x

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Journal of Applied Entomology

Volume 132, Issue 2, pages 124–134, March 2008

Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries

R. Sabbahi, A. Merzouki, C. Guertin

Article first published online: 14 DEC 2007

DOI: 10.1111/j.1439-0418.2007.01226.x