

Production artisanale et utilisation du micro-champignon *Beauveria bassiana* pour le contrôle biologique des ravageurs de la pomme de terre

Rapport de recherche soumis dans le cadre du
Programme de soutien au développement de l'agriculture biologique
du Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec

Sylvia Todorova, Ph.D. – Anatis Bioprotection Inc.

et

Anne Weill, Ph.D., agr. - Club agro-environnemental Bio-Action

Mars 2006

INTRODUCTION

Ce projet avait pour but la mise au point et l'utilisation de *B. bassiana* à la ferme. Les objectifs étaient les suivants :

- (1) Développer une technique facile et peu coûteuse de production artisanale de *B. bassiana* à la ferme;
- (2) Tester l'efficacité de ces préparations de *B. bassiana* contre les ravageurs ciblés au champ;
- (3) Définir les modes d'application, les temps propices d'application, leur fréquence;
- (4) Vérifier l'effet du pathogène sur les insectes utiles.

Phase I. Production de *B. bassiana* à la ferme et vérification de l'efficacité du champignon

Année 2004

Production en laboratoire :

Deux souches (A et B) ont été identifiées au laboratoire. La souche la moins dommageable (A) (collection DAOM #210087) pour les coccinelles a été retenue. La souche est indigène du Québec, isolée d'un doryphore de la pomme de terre adulte. La souche a été maintenue sur un milieu nutritif '*Sabouraud dextrose agar*'.

Des épreuves biologiques en laboratoire ont été réalisées. Cinq concentrations différentes ont été testées. Les concentrations létales et les temps létaux ont été déterminés. La concentration létale (50% de mortalité des insectes) a été de $6,5 \cdot 10^4$ (souche A) et de $9,9 \cdot 10^5$ (souche B) conidies/ml, respectivement, 7 jours après le traitement. Le temps léthal (50% de mortalité des insectes) était de 4,9 jours pour les deux souches à la concentration 10^9 conidies/ml.

Différents substrats ont été testés pour la production à la ferme : blé, millet, orge, pois, riz. Le meilleur substrat a été retenu pour la production à la ferme (orge et riz).

Production à la ferme :

La souche de *B. Bassiana* retenue a été produite dans des bouteilles de verre contenant soit 100 g d'orge, soit 100 g de riz. Le substrat a été stérilisé dans le four à 250°C pendant une heure. Un filtre microbiologique fermant les bouteilles a été utilisé pour empêcher la contamination du milieu qui avait été stérilisé. Après la stérilisation, les bouteilles furent refroidies et inoculées avec une solution de spores à base d'eau. Le champignon fut incubé pendant 3 semaines.

Deux essais ont dû être réalisés, car le premier n'avait pas fonctionné. Une contamination bactérienne due à mauvaise stérilisation ou à la pénétration des bactéries pendant l'inoculation du champignon a empêché la croissance du champignon. Dans le deuxième essai, la croissance du mycélium a été observée après 4-7 jours d'incubation. Au bout de 15 jours la production était de 2 à $3 \cdot 10^7$ spore/ml. Les bouteilles contenaient 500 ml d'eau soit une quantité de $1 \cdot 10^{10}$ spores/bouteille.

Le *B. Bassiana* produit à la ferme a été testé en laboratoire en 2005.

Année 2005

Production en laboratoire :

Des adultes du doryphore de la pomme de terre ont été régulièrement infectés par *B. bassiana* et la souche a été ensuite re-isolée à partir d'insectes contaminés sur un milieu nutritif sélectif. Cette technique a permis de maintenir la souche de *B. bassiana* toujours agressive.

La souche a été produite en grande quantité sur un substrat à base de riz dans des sacs de plastique stériles.

Production à la ferme :

L'efficacité de *B. bassiana* produite à la ferme a été vérifiée sur des doryphores adultes récoltés sur une ferme de Montérégie et sur une ferme de Lanaudière. L'efficacité de *B. bassiana* produite à la ferme a été égale à celle de la souche produite au laboratoire.

Phase II. Applications foliaires en champ

Cette partie du projet s'est déroulée comme prévu sur une ferme biologique de Montérégie. Les parcelles traitées avec le champignon ont été détruites à la fin de la période expérimentale, en accord avec la réglementation fédérale.

Année 2004 – essais préliminaires

La taille des parcelles et leur nombre ont dû être modifiés par rapport au protocole original afin de s'adapter à la géométrie du champ.

Les parcelles ont donc été de 3 m par 6 m (4 rangées de 12 plants) avec des zones tampons de 3 m. Quatre niveaux de traitements ont été testés. Le plan expérimental était à blocs aléatoires complets avec 3 répétitions.

La culture de *B. bassiana* produite en laboratoire a été utilisée au lieu de celle produite à la ferme. Ceci a été fait car le *B. bassiana* produit à la ferme n'a pas été prêt à temps. Il y a eu plusieurs causes à cela : acceptation tardive du projet, délais d'obtention des permis et difficultés de production à la ferme. La culture produite à la ferme a cependant été testée au champ en 2005.

Les applications foliaires en fin de saison pour un contrôle l'année suivante n'ont pas été réalisées car en agriculture biologique les pommes de terre ne sont pas plantées au même endroit deux années de suite. Cependant, des échantillons de sols des parcelles traitées en 2004 ont été prélevés.

Traitements

Les traitements ont été appliqués à l'aide d'un pulvérisateur manuel; un litre de solution fut appliqué sur chaque parcelle. Les concentrations utilisées ont été de 0X, 1X, 2X, 4X la concentration initiale de conidies. La concentration initiale est définie comme la concentration optimale pour provoquer 90% de mortalité en laboratoire.

Les concentrations furent les suivantes :

1. Témoin.
2. 4X - Formulation de spores de <i>B. bassiana</i> , haute dose (1L suspension d'eau contenant 1×10^{11} conidies, 100 ml huile végétale et 40 g lait en poudre)
3. 2X - Formulation de spores de <i>B. bassiana</i> , demie dose (1L suspension d'eau contenant 0.5×10^{11} conidies, 100 ml huile végétale et 40 g lait en poudre)
4. X - Formulation de spores de <i>B. bassiana</i> , faible dose (1L suspension d'eau contenant 0.25×10^{11} conidies, 100 ml huile végétale et 40 g lait en poudre)

L'huile a été ajoutée pour éviter le dessèchement des conidies et le lait pour une protection contre les rayons UV très nuisible pour le champignon.

Les traitements ont été réalisés les 5, 12 juillet, 4 et 18 août. Tous les traitements ont été faits en fin d'après midi. Les applications ont été réalisées quatre fois au lieu de deux. Nous avons fait plus de traitements parce que nous nous sommes aperçus durant la saison que deux applications ne suffisaient pas d'autant plus que l'été 2004 a été marqué par des pluies fréquentes et abondantes. Nous avons aussi trop retardé le troisième traitement à cause de la faible densité de la population du doryphore et les résultats à ce niveau n'étaient pas clairs. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'appliquer *B. Bassiana* une quatrième fois afin de mieux déterminer les meilleurs moments d'application.

Échantillonnage et analyse statistique

Les comptages d'insectes (doryphores adultes, masses d'œuf, larves au stade L1-L2, larves au stade L3-L4 et coccinelles) ont été faits sur 10 plants de patates par parcelles, choisis au hasard. Les dommages causés par le doryphore ont été visuellement évalués et notés de 0 à 5 (pas de dommage = 0, 100% de défoliation = 5). Les résultats ont été analysés avec le logiciel JMPIN version 3.2.1 de SAS Institut (1997). Une analyse de variance Anova à un critère a été effectuée suivis par un test Tukey LSD pour chercher les différences significatives entre les traitements ($P < 0.05$).

Les rendements de pomme de terre ont été évalués sur les deux rangs du milieu de chaque parcelle.

Des échantillonnages réguliers au sol des parcelles traitées l'été 2004 ont été effectués.

Résultats au champ

Effet du premier traitement

Il n'y a pas eu d'effet significatif car il a plu peu de temps après l'application (table 1).

Table 1. Densité de *L. decemlineata* (12 juillet, 2004)

Traitement	Nombre moyen d'insectes par plant			
	L1-2	L3-4	Adultes	Masse d'oeufs
Témoin	2.8±1.0a	0.7±0.3a	0.0±0.0a	0.0±0.0a
4X	3.8±0.9a	1.6±0.4a	0.6±0.3a	0.0±0.0a
2X	7.3±2.1a	2.4±1.0a	0.03±0.03a	0.0±0.0a
X	4.7±2.0a	2.8±1.0a	0.1±0.07a	0.0±0.0a

Dans la même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas différentes de façon significative au niveau 5% selon le test Tukey's.

Effet du deuxième traitement

Le taux de mortalité (calculé à partir du nombre d'insectes vivants avant et après le traitement) a été de 80 à 100% des larves pour toutes les concentrations; il a été de 90 à 95% des adultes pour les concentrations 2X et 4X; Il y a avait toutefois moins de 10% de mortalité des adultes pour la concentration X. Lorsque comparé au groupe témoin, le nombre de grosses larves dans les parcelles traitées était significativement plus faible (table 2). Le nombre de doryphores adultes était aussi plus faible mais la différence n'était pas significative.

Table 2. Densité de *L. decemlineata* (23 juillet, 2004)

Traitement	Nombre moyen d'insectes par plant			
	L1-2	L3-4	Adultes	Masse d'oeufs
Témoin	0.7±0.3a	3.1±1.2a	0.4±0.2a	0.0±0.0a
4X	1.0±0.7a	1.4±0.6b	0.1±0.1a	0.0±0.0a
2X	0.1±0.1a	1.3±0.4b	0.2±0.1a	0.0±0.0a
X	1.1±0.7a	1.7±0.8b	0.0±0.0a	0.0±0.0a

Dans la même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas différentes de façon significative au niveau 5% selon le test Tukey's.

Effet du troisième traitement

Il n'y a pas eu d'effet significatif; il y avait très peu d'insectes et de larves sur les plants (table 3).

Table 3. Densité de *L. decemlineata* (4 août, 2004)

Traitement	Nombre moyen d'insectes par plant			
	L1-2	L3-4	Adultes	Masse d'oeufs
Témoin	0.0±0.0a	0.1±0.1a	0.7±0.2a	0.0±0.0a
4X	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.6±0.1a	0.0±0.0a
2X	0.2±0.1a	0.1±0.1a	0.7±0.1a	0.0±0.0a
X	0.0±0.0a	0.1±0.1a	0.3±0.1a	0.0±0.0a

Dans la même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas différentes de façon significative au niveau 5% selon le test Tukey's.

Effet du quatrième traitement :

Il y a eu une réduction du nombre d'adultes à tous les niveaux de traitement. Il ne restait aucun adulte pour le traitement 4X. Il n'y avait aucune larve dans les parcelles au moment de l'échantillonnage (table 4).

Table 4. Densité de *L. decemlineata* (18 août, 2004)

Traitement	Nombre moyen d'insectes par plant			
	L1-2	L3-4	Adultes	Masse d'oeufs
Témoin	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.6±0.1a	0.0±0.0a
4X	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0a
2X	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.2±0.1a	0.0±0.0a
X	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.2±0.1a	0.0±0.0a

Dans la même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas différentes de façon significative au niveau 5% selon le test Tukey's.

Défoliation :

Il n'y avait pas de différences entre les parcelles. Une forte infestation de cicadelles a endommagé gravement la masse végétale. De plus nous nous sommes aperçus que le lait dans notre formulation artisanale augmentait la possibilité du développement de maladie fongique causée par *Alternaria*.

Effet sur les insectes bénéfiques

Les applications de *B. bassiana* n'ont pas affecté les coccinelles.

Rendements

Il n'y a pas eu de différence significative

Analyse des résultats de la phase II en 2004

Le champignon *B. bassiana* a eu un effet significatif sur les larves (L3-4) après le deuxième traitement et sur les adultes après le quatrième traitement. La variabilité importante du nombre de doryphores entre les parcelles et la faible population d'insectes permettent d'expliquer pourquoi l'effet du *B. bassiana* n'a pas été plus important.

Année 2005

Le plan expérimental était comme en 2004 à blocs aléatoires complets. Trois blocs expérimentaux furent établis Les parcelles ont été de 5 rangées de 15 plants selon le protocole pré-établi.

Traitements

La concentration utilisée a été de 1×10^9 conidies/ml correspondant à la concentration 4X de nos essais de l'année 2004. Comme nos résultats de 2004 n'ont pas été concluants au niveau des dosages, nous avons décidé d'utiliser cette concentration suite à nos épreuves biologiques effectuées à la station de recherche de l'IRDA à Deschambault (Québec) et à nos observations au laboratoire. Cette concentration correspondait à un dosage équivalent à 1.5×10^{13} conidies/ha. Les conidiospores de *B. bassiana* produites à la ferme et en laboratoire ont été utilisées. La production de la ferme seule n'était pas suffisante pour effectuer tous les traitements. Avec une production artisanale de 1×10^{10} conidies/bouteille, 15 bouteilles étaient nécessaires pour effectuer le traitement sur les trois parcelles. Cependant, nous n'avons que 9 bouteilles de *B. bassiana* produites à la ferme. Nous avons ajouté deux surfactants naturels dans la solution de *B. bassiana* dans le but d'améliorer la distribution des spores.

Les applications ont été réalisées trois fois : le 29 juin, le 7 juillet et le 13 juillet 2005.

Échantillonnage et analyse statistique

Le mode d'échantillonnage fut similaire à 2004. Cinq échantillonnages ont été réalisés. Comme en 2004, le nombre d'adultes, de masses d'œufs, de petites larves et de grosses larves du doryphore a été noté. La présence de coccinelles a été surveillée. La persistance du champignon au sol a aussi été mesurée un an après son application. Des échantillons de sol avaient été prélevés dans ce but durant l'automne 2004. La méthode d'analyse statistique fut similaire à celle de 2004.

Résultats au champ

L'effet du *B. bassiana* sur les doryphores adultes, les larves, les masses d'œufs et les coccinelles est donné ci-dessous.

Effet de *B. bassiana* sur les doryphores adultes

L'effet de *B. bassiana* sur le nombre d'adultes par plant de pomme de terre est donné dans la figure 1. *B. bassiana* a significativement diminué le nombre des doryphores adultes (figure 1) dans les parcelles traitées. Comme le champignon a besoin de 4 à 8 jours pour affecter les insectes, les résultats sont devenus visibles après le deuxième traitement.

Deux semaines après le premier traitement, *B. bassiana* a diminué le nombre d'adultes de 50%. La réduction de la population a été de 71% la troisième semaine (Tukey-Kramer test, $P=0,007$) et de 82% la quatrième semaine ($P<0,0001$) après le début d'expérience.

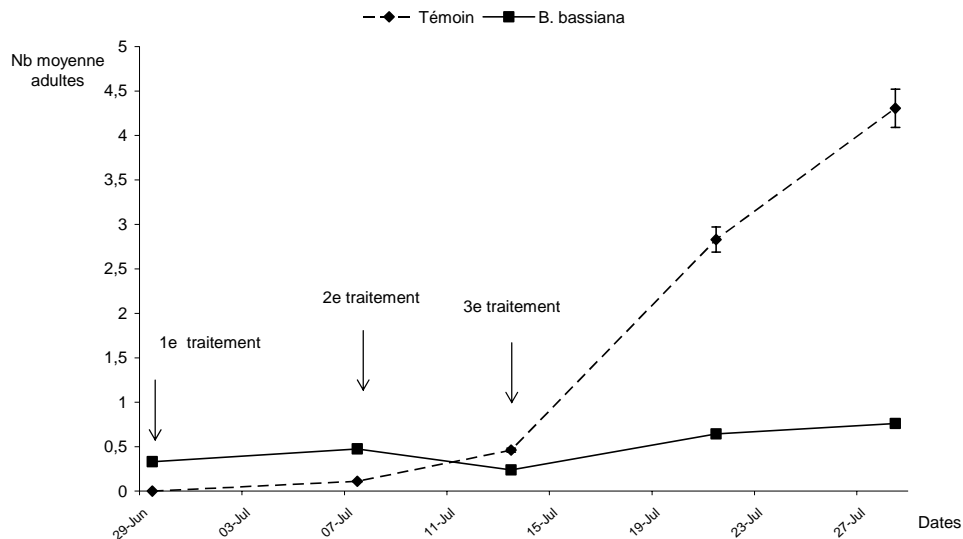


Fig. 1. Effet de *B. bassiana* contre le doryphore de la pomme de terre adultes

Effet de *B. bassiana* sur les masses d'œufs du doryphore

L'effet de *B. bassiana* sur le nombre de masses d'œufs par plant de pomme de terre est donné dans la figure 2. Nous n'avons observé aucune différence significative entre le nombre de masses d'œufs du doryphore dans les parcelles traitées et les parcelles témoins (figure 2) durant toute la période d'expérience ($P>0,0511$).

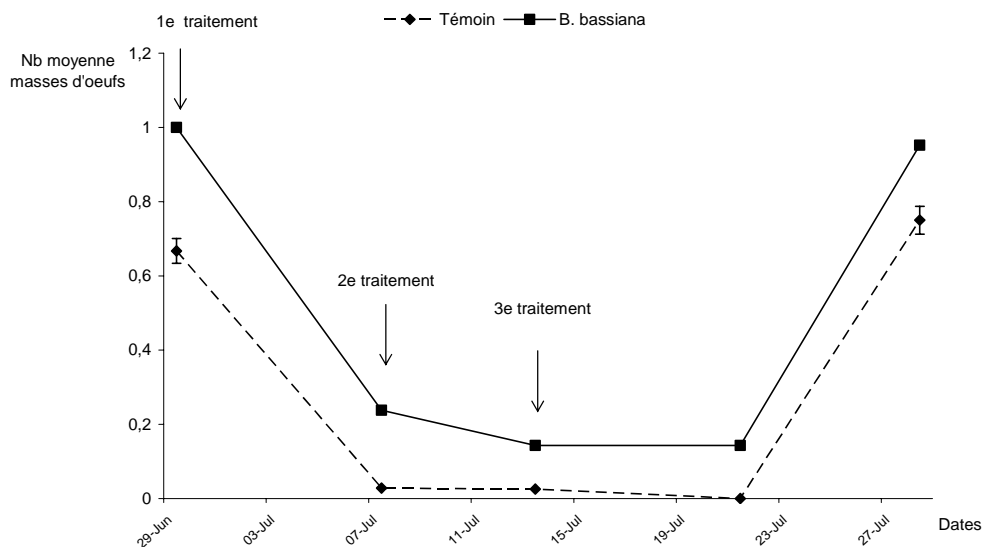


Fig. 2. Effet de *B. bassiana* sur les masses d'œufs du doryphore de la pomme de terre

Effet de *B. bassiana* sur les petites larves (L₁ et L₂) du doryphore

L'effet de *B. bassiana* sur le nombre de petites larves par plant de pomme de terre est donné dans la figure 3. Les traitements de *B. bassiana* semblent avoir diminué le nombre de petites larves du doryphore après le premier traitement (figure 3). Toutefois, par la suite, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les larves traitées et les larves témoins durant toutes les prises de données ($P=0,104$)

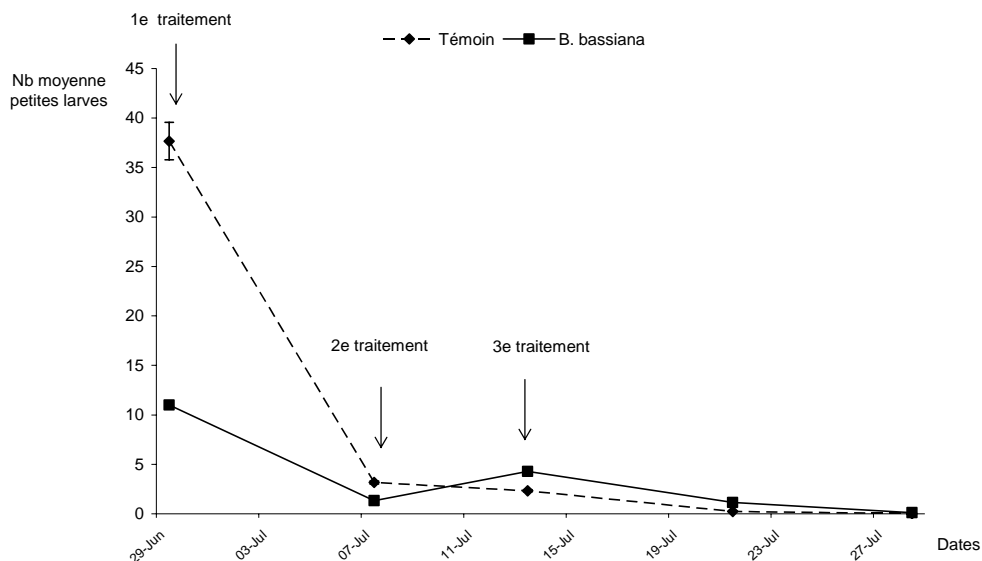


Fig. 3. Effet de *B. bassiana* sur les petites larves du doryphore de la pomme de terre

Effet de *B. bassiana* sur les grosses larves (L₃ et L₄) du doryphore

L'effet de *B. bassiana* sur le nombre de grosses larves par plant de pomme de terre est donné dans la figure 4. Le nombre de grosses larves a diminué de 25% après le premier traitement de *B. bassiana* (Tukey-Kramer test; $P=0,0024$). Cependant, après le 7 juillet, la population des larves a augmenté et elle est devenue égale à celle des parcelles témoins.

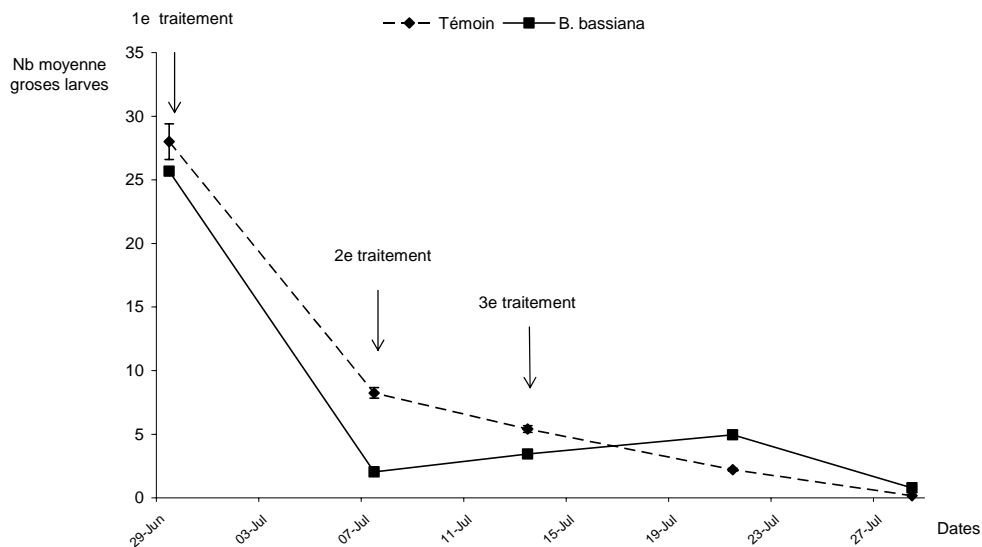


Fig. 4. Effet de *B. bassiana* sur les grosses larves du doryphore de la pomme de terre

Effet de *B. bassiana* sur les coccinelles

L'effet de *B. bassiana* sur le nombre de coccinelles par plant de pomme de terre est donné dans la figure 5. La variabilité du nombre de coccinelles entre les parcelles ne nous a pas permis d'observer un effet néfaste de *B. bassiana* sur ces insectes prédateurs ($P > 0,125$) (figure 5).

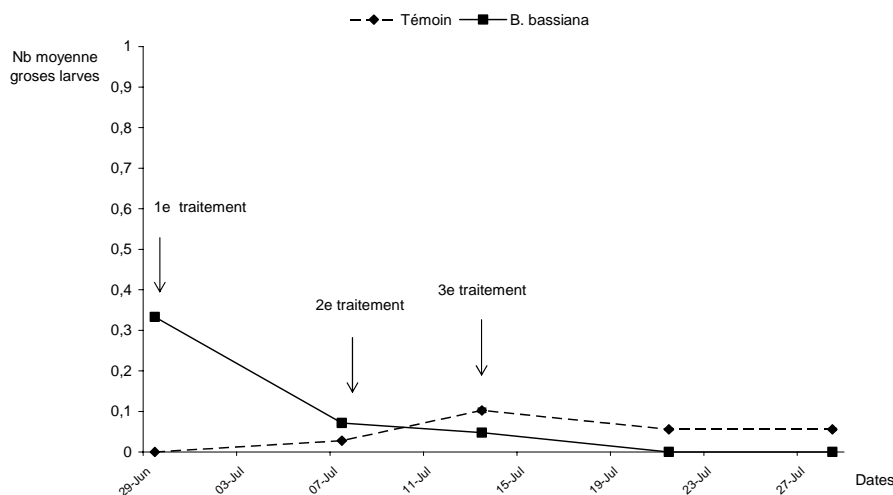


Fig. 5. Effet de *B. bassiana* sur les coccinelles

Défoliation

La défoliation dans les parcelles témoin était légèrement plus élevée que dans les parcelles traitées. Elle était évaluée à 4 (sur une échelle de 5) dans les parties témoins versus 3 dans les parties traitées.

Les rendements n'ont pas été mesurés. Cette décision a été prise suite aux problèmes de formulation rencontrés durant l'été (voir section « analyses des résultats »).

Persistance et viabilité de *B. bassiana* au sol un an après les applications

La présence de spores du champignon dans les parcelles traitées a été de 45% plus élevée que dans les parcelles témoins. De plus, la viabilité de spores a été de 80%.

Analyse des résultats de la phase II en 2005

B. bassiana a significativement diminué le nombre de doryphores adultes à partir du deuxième traitement. Il n'y a pas eu d'effet significatif sur les larves et les masses d'œuf. Le manque de réponse des doryphores au stade œuf et larve s'explique en partie par certains problèmes rencontrés durant la saison. En 2005, une erreur dans la formulation du produit (conidies de *B. bassiana* + le véhicule de surfactants et adjuvants) a entraîné une mauvaise distribution des spores et, par conséquent, une distribution inégale du produit sur les feuilles.

De plus, l'été 2005 a été particulièrement chaud. Les températures moyennes pendant nos tests ont été de 30°C, hautement supérieures aux températures moyennes normales pour la saison et nocives pour *B. bassiana*.

Phase III. Production et vérification en laboratoire de l'efficacité de *B. bassiana* produit sur une autre ferme

La production a été réalisée dans une ferme biologique de Lanaudière. Un premier essai a été réalisé en utilisant des sacs de plastique stériles, résistants aux températures élevées. Une quantité de 200 g riz a été mélangée avec 100 ml d'eau et les sacs ont été placés dans un four conventionnel pour leur stérilisation. Cependant, cette expérience n'a pas fonctionné. Les sacs résistants dans l'autoclave ont fondu dans le four de la cuisinière. Une autre technique de production a alors été essayée. Le riz a été stérilisé dans des pots de verre placés dans une marmite remplie à moitié d'eau. Une fois le riz refroidi, l'inoculum de *B. bassiana* a ajouté. Cet essai a bien fonctionné. La croissance du mycélium a été observée après 4-7 jours d'incubation. Au bout de 15 jours la production était de 2 à 3 X 10⁷ spore/ml.

La vérification de l'efficacité en laboratoire a donné des résultats similaires à ceux obtenus pour la production en laboratoire.

CONCLUSION

Ce projet a permis de démontrer plusieurs aspects concernant la production artisanale et l'utilisation directe de champignon *B. bassiana* par le producteur agricole.

1. Nous avons démontré pour la première fois au Canada, qu'il est possible de produire d'une façon artisanale et peu coûteuse à la ferme le champignon entomophage *B. bassiana*. La méthode de production sélectionnée consiste en stérilisation de pots remplis de 200 g du riz et 100 ml d'eau dans une marmite suivi par l'inoculation du champignon (après le refroidissement du riz) d'une façon le plus stérile possible. Au bout de 15-20 jours, le producteur doit laver le riz contaminé par *B. bassiana* avec 2 L d'eau et le passer par un tamis de 1-2 mm. Il peut ensuite ajouter un peu de surfactant Tween (0.01%) très utilisé dans la production de pâtisseries. Le Tween servira à une meilleure dispersion de spores. Le producteur peut alors pulvériser cette solution sur les plants de pomme de terre. Cependant, le producteur ne peut pas produire le champignon en grande quantité. Sa production sera suffisante pour des traitements préventifs ou pour le contrôle du doryphore sur des petites parcelles.

2. Nous avons calculé qu'avec une production artisanale de 2.5 x 10⁷ conidies/ml, le producteur doit inoculer environ 22 pots de riz pour produire une quantité suffisante pour arroser un acre de pomme de

terre une fois. Ceci démontre, que la production artisanale est possible mais elle est applicable pour de petites surfaces. Les applications peuvent se faire avec n'importe quel type de pulvérisateur.

3. Il est important que le premier traitement soit fait au début de l'éclosion des œufs. Il est très important également, que les traitements suivants (entre 2 et 4 selon la densité de la population de doryphores) soient effectués dans un intervalle inférieur à 8 jours. Comme la formulation artisanale ne contient pas de surfactants qui protègent contre les rayons UV, les applications doivent être effectuées le soir. Les applications ne doivent pas se faire avant une pluie ou simultanément avec un fongicide.

4. *B. bassiana* a une efficacité certaine sur le doryphore de la pomme de terre. Toutefois certaines difficultés liées à la recherche à la ferme ont nuit à la clarté des résultats.

5. Nos résultats ont démontré que *B. bassiana* n'est pas pathogène pour les coccinelles.

6. Nos résultats montrent que les conidies de *B. bassiana* persistent au sol. Donc, si le producteur plante des pommes de terre durant deux années consécutives dans le même champ, il est très possible que la population de doryphores soit en partie contrôlée par le champignon qui reste au sol.

Certains inconvénients non prévus ont nuit à nos travaux. Ce projet de recherche était le premier essai de production à la ferme. Ce projet était aussi le premier essai d'utilisation de *B. bassiana* en régie biologique ce qui a entraîné certains imprévus qui ont nuit à la recherche.

Toutefois, les résultats obtenus sont très prometteurs et nous encourageant à continuer les recherches dans cette direction.