

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Potentiel du spinosad et de *Beauveria bassiana* comme agents de lutte contre le ver gris
(*Agrotis ipsilon*)

Par
Marie-Eve Gosselin

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de maître ès (M.Sc.)
En sciences biologiques

Avril, 2008

© Marie-Eve Gosselin, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Potentiel du spinosad et de *Beauveria bassiana* comme agents de lutte contre le ver gris
(*Agrotis ipsilon*)

Présenté par :
Marie-Eve Gosselin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :
Marc St-Arnaud (président rapporteur)
Jacques Brodeur (directeur)
Guy Bélair (co-directeur)
Stéphanie Pellerin (membre du jury)

Résumé

Le ver gris (*Agrotis ipsilon*) s'avère la noctuelle la plus destructrice des graminées à gazon sur les terrains de golf au Québec. La préoccupation notable envers les effets négatifs des pesticides de synthèse et la nouvelle législation sur leur utilisation stimulent d'autant le développement de méthodes alternatives de contrôle. Le biopesticide spinosad et le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* semblent des candidats prometteurs pour le contrôle du ver gris.

L'objectif général de cette étude était d'établir, en laboratoire, le potentiel du spinosad et de *B. bassiana* pour le contrôle du ver gris, appliqués seuls et en combinaison. Différentes concentrations de chacun des produits ont été inoculées sur des larves de ver gris de troisième stade afin d'estimer les temps létaux (LT) et les concentration létales (CL). Celles-ci ont été utilisées afin de sélectionner les concentrations sublétales devant être testées lors des essais sur les interactions entre les deux agents. Les effets sublétaux du spinosad sur des paramètres d'aptitude biologique du ver gris ont été quantifiés.

Les résultats indiquent une plus grande susceptibilité des larves de ver gris au spinosad comparativement à *B. bassiana*. De façon générale, les combinaisons testées engendrent un effet additif sur la mortalité des larves, ce qui indique la compatibilité des produits. Des doses de 5ppm, 7,5ppm et 10ppm de spinosad sur des larves de ver gris de troisième stade engendrent une diminution de la taille des larves ainsi qu'un délai dans les temps de développement. En conclusion, le spinosad constitue un biopesticide prometteur pour le contrôle des larves du ver gris en champ, appliqué seul ou en combinaison.

Mots clés : ver gris, spinosad, champignon entomopathogène, *Beauveria bassiana*, effet additif, effets sublétaux, terrains de golf, graminées à gazon, lutte biologique

Abstract

The black cutworm (*Agrotis ipsilon*) is an important turfgrass insect pest on golf courses in Québec. With deregistration of some chemistries and new legislation on pesticide uses, the development and the implementation of alternative methods for insect pest management have become critical. In this context, the biopesticide spinosad and the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* look promising for black cutworm control.

The main objective of this study was to assess the susceptibility of the black cutworm to the biopesticide spinosad and to a *Beauveria bassiana* commercial formulation. Different concentrations of each product were inoculated on third instar larvae in order to determine lethal times (LT) and lethal concentrations (LC). Subsequently, types of interaction resulting from simultaneous applications of sublethal doses of products on black cutworm mortality were determined. Finally, effects of spinosad sublethal exposure on a number of fitness parameters were quantified during experimentations.

Agrotis ipsilon third instar larvae were highly susceptible to spinosad compared to *B. bassiana*. Additive interactions were observed from most spinosad-*B. bassiana* combinations tested thus indicating compatibility between products. Topical applications of 5ppm, 7.5ppm and 10ppm of spinosad on third instar larvae reduced larval size and increased time to pupation and to emergence. In conclusion, spinosad is a promising tool of controlling black cutworm larvae in the field, alone or in combination with other products.

Keywords : black cutworm, spinosad, entomopathogenous fungus, *Beauveria bassiana*, additive effect, sublethal effects, golf courses, turfgrass, biological control

Table des matières

| | |
|---|------|
| Résumé | iii |
| Abstract | iv |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | vii |
| Liste des figures..... | viii |
| Liste des abréviations et sigles | ix |
| Remerciements | xi |
| Avant-propos | xii |
| Introduction générale..... | 1 |
| CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE..... | 6 |
| 1.1 Le ver gris (Lepidoptera : Noctuidae) | 7 |
| 1.1.2 Cycle vital..... | 9 |
| 1.1.3 Distribution..... | 9 |
| 1.1.4 Écologie saisonnière..... | 10 |
| 1.1.5 Spectre d'hôtes et dommages | 10 |
| 1.1.6 Ennemis naturels | 12 |
| 1.1.7 Méthodes de contrôle | 12 |
| 1.2 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo-Crivelli) Vuillemin..... | 15 |
| 1.2.1 Description | 15 |
| 1.2.2 Cycle vital..... | 16 |
| 1.2.3 Distribution et évolution dans l'environnement | 19 |
| 1.2.4 Doses recommandées | 20 |
| 1.2.5 Effets sur les organismes non-ciblés | 21 |
| 1.2.6 Potentiel d'utilisation | 22 |
| 1.3 Le spinosad..... | 25 |
| 1.3.1 Description | 25 |
| 1.3.2 Propriétés physicochimiques | 25 |
| 1.3.3 Mode d'action..... | 26 |
| 1.3.4 Doses recommandées | 27 |
| 1.3.5 Effets sur les organismes non-ciblés | 28 |
| 1.3.6 Potentiel d'utilisation | 30 |
| 1.4 La combinaison d'agents de contrôle..... | 32 |
| CHAPITRE 2. TOXICITÉ DU SPINOSAD ET D'UNE FORMULATION COMMERCIALE DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> SUR LES LARVES DE VER GRIS | 35 |
| 2.1 Introduction | 37 |
| 2.2 Materials and Methods | 41 |
| 2.2.1 Insects rearing..... | 41 |
| 2.2.2 Spinosad and <i>B. bassiana</i> formulations | 41 |
| 2.2.3 Bioassays | 42 |
| 2.2.4 Effect of spinosad on fitness parameters | 43 |
| 2.2.5 Spinosad- <i>B. bassiana</i> interaction | 43 |
| 2.2.6 Statistical Analysis | 44 |
| 2.3 Results | 46 |
| 2.3.1 Lethal concentrations and lethal times | 46 |
| 2.3.2 Effect of spinosad on fitness parameters | 48 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.3 Spinosad- <i>B. bassiana</i> interaction | 51 |
| 2.4 Discussion | 53 |
| 2.4.1 Lethal concentrations and lethal times | 53 |
| 2.4.2 Effect of spinosad on fitness parameters | 55 |
| 2.4.3 Spinosad- <i>B. bassiana</i> interaction | 56 |
| 2.5 Acknowledgments | 58 |
| Conclusion générale | 59 |
| Bibliographie | 62 |
| ANNEXES | xii |

Liste des tableaux

| | |
|---|------|
| Table I. Lethal concentration values (LC) of third instar larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) exposed to spinosad (ppm) and <i>Beauveria bassiana</i> (10^6 spores/ml) on day 4 post inoculation. | 46 |
| Table II. The effect of spinosad sublethal concentrations on larval weight of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>), analysed using one-way ANOVAs. | 48 |
| Table III. The effect of spinosad sublethal concentrations on head capsule width of larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>), using one-way ANOVAs. | 49 |
| Table IV. Antagonistic, additive or synergistic interactions when spinosad and <i>Beauveria bassiana</i> are used in combination for treatment of third instar larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)..... | 52 |
| Tableau V. Temps létaux (TL) (jour) issus de l'inoculation simultanée de différentes concentrations de <i>Beauveria bassiana</i> et de spinosad sur le ver gris (<i>Agrotis ipsilon</i>) de troisième stade larvaire, en laboratoire..... | xiii |

Liste des figures

| | |
|--|-------|
| Figure 1.1 Adulte de ver gris, <i>Agrotis ipsilon</i> | 7 |
| Figure 1.2 Larve de ver gris, <i>Agrotis ipsilon</i> | 8 |
| Figure 1.3 Pupa de ver gris, <i>Agrotis ipsilon</i> | 8 |
| Figure 2.1 Lethal times of third instar larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) exposed to spinosad (ppm). | 47 |
| Figure 2.2 Lethal time of third instar larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) exposed to <i>B. bassiana</i> commercial formulation (10^6 spores/ml)..... | 47 |
| Figure 2.3 Weight (g; $\bar{x} \pm SE$) of black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) larvae which survived treatments with different concentrations of spinosad..... | 48 |
| Figure 2.4 Head capsule width (mm; $\bar{x} \pm SE$) of black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) larvae treated with different concentrations of spinosad..... | 49 |
| Figure 2.5 Time to pupation and to emergence (d; $\bar{x} \pm SE$) of third instar larvae of the black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>) treated with two sublethal concentrations of spinosad. . | 50 |
| Figure 3. Mortalité ($\bar{X} \pm SE/2$) des larves de ver gris de troisième stade issue de l'inoculation d'une concentration de 50ppm de spinosad (CL_{50}) selon deux méthodes d'application, en laboratoire | xvii |
| Figure 4. Mortalité ($\bar{X} \pm SE/2$) des larves de ver gris de troisième stade issue de l'inoculation d'une concentration de 7×10^7 spores/ml de <i>Beauveria bassiana</i> (CL_{50}) (souche GHA) selon deux méthodes d'application, en laboratoire | xviii |

Liste des abréviations et sigles

| | |
|------------------|--|
| a.i. | Active ingredient |
| CL ₁₀ | Concentration létale pour tuer 10% des individus |
| CL ₂₀ | Concentration létale pour tuer 20% des individus |
| CL ₅₀ | Concentration létale pour tuer 50% des individus |
| CL ₉₀ | Concentration létale pour tuer 90% des individus |
| cm | Centimètre |
| g | Gramme |
| h | Heure |
| Ha | Hectare |
| HR | Humidité relative |
| i.a. | Ingrédient actif |
| IPM | Integrated pest management |
| L | Litre |
| L:N | Lumière : Noirceur |
| ml | Millilitre |
| pi ² | Pieds carrés |
| ppm | Partie par million |
| TL ₅₀ | Temps léthal pour tuer 50% des individus |
| LC ₁₀ | Lethal concentration for 10% of subjects |
| LC ₂₀ | Lethal concentration for 20% of subjects |
| LC ₅₀ | Lethal concentration for 50% of subjects |
| µm | Micromètre |

*« Nous n'héritons pas de la Terre de nos ancêtres,
nous l'empruntons à nos enfants »* Antoine de Saint-
Exupéry

Remerciements

Cette étude a été réalisée grâce à la contribution financière du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), de la Fondation canadienne de recherche en gazon (CTRF), de la Coalition pour un golf responsable (CGR), de l'Association canadienne des surintendants de golf (ACSG) et du Centre de recherche et développement en horticulture (CRDH) d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada, St-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada.

Je tiens à remercier sincèrement Jacques Brodeur, mon directeur de recherche, Guy Bélair, mon codirecteur, ainsi que Louis Simard pour le support moral, technique et pédagogique constamment apporté lors de la réalisation des expérimentations et de l'analyse et l'interprétation des résultats. Vous êtes, chacun à votre façon, une grande source d'inspiration!

Je tiens également à remercier techniciens et stagiaires qui ont contribué grandement à l'avancement de ce projet de recherche. Un merci tout particulier à M. Yvon Fournier et Mme Nathalie Dauphinais du laboratoire de nématologie du CRDH. Merci à Élisabeth Taschereau, Nicolas Turgeon, Stéphan Campagnaro, Jonathan Roy, Émilie Hamon, Émilie Messier et Anne-Marie Bouchard.

Finalement, je remercie ma famille et mes ami(e)s pour leur soutien et encouragements tout au long de ces années.

Avant-propos

Ces dernières années, la recherche et le développement de méthodes de contrôle alternatives des insectes ravageurs dans les gazons sont sollicitées par la mise en application du Code québécois de gestion des pesticides et de l'imposition d'un plan triennal de réduction des produits de synthèse par les surintendants des terrains de golf de la province. C'est dans ce contexte que ce projet de recherche a été initié. Il semblait important pour nous de travailler en collaboration étroite avec les gens de l'industrie du golf afin de chercher à leur fournir des moyens de contrôle biologique des ravageurs des gazons et, par le fait même, de servir la cause de la protection de l'environnement. Nous nous sommes ainsi attardés à l'étude d'agents de contrôle du ver gris, un des ravageurs majeurs des graminées à gazon. Le ver gris est également un ravageur notable de plusieurs cultures agricoles à travers le pays. La portée des résultats était de ce fait fort intéressante.

Dans ce contexte, ce présent mémoire est en partie rédigé sous la forme d'un article scientifique (Chapitre 2) dans le but de diffuser rapidement les résultats à la communauté scientifique. Une introduction générale, une revue de littérature (Chapitre 1) ainsi qu'une conclusion générale complètent ce mémoire. L'annexe 1 rapporte des résultats complémentaires qui ne sont pas présentés dans l'article, alors que l'annexe 2 concerne une expérience complète permettant de répondre à un des objectifs du projet d'étude. Les résultats issus de cette annexe s'intégraient difficilement à la portion innovante formant le cœur du projet.

Introduction générale

La présence d'insectes ravageurs dans le gazon entraîne des pertes économiques considérables au Québec. Le ver gris (*Agrotis ipsilon* Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) est, pendant son développement larvaire, le plus destructeur de toutes les espèces de noctuides s'attaquant aux graminées à gazon (Potter 1998). Sur les terrains de golf, il est le ravageur majeur sur les verts, les départs et parfois dans les allées et ce, à travers le monde. Le seuil de tolérance des golfeurs face aux dommages engendrés par ce ravageur est très bas ; le ver gris génère donc des applications fréquentes d'insecticides. Au Québec, les surintendants de terrains de golf appliquent habituellement un insecticide une ou deux fois par année à la première et/ou à la seconde période de dommage afin de contrôler ce ravageur (Simard 2006). Prater et Potter (2004) rapportent que certains surintendants aux États-Unis effectuent un traitement insecticide à une fréquence de deux à quatre semaines durant la saison, en mesure préventive. Les insecticides de synthèse homologués au Canada pour le ver gris procurent un contrôle adéquat du ravageur. Par contre, le développement de résistance aux insecticides chimiques et la préoccupation ces dernières années des effets délétères des produits chimiques sur l'environnement et sur la santé humaine ont alimenté un intérêt pour le développement d'agents biologiques de contrôle et leur incorporation dans des programmes de lutte intégrée. En outre, au Québec, suite à des pressions provenant de citoyens et de groupes environnementaux, le gouvernement a déposé, en avril 2003, un Code de gestion bannissant l'utilisation d'un grand nombre de pesticides de synthèse à des fins esthétiques en milieu urbain et récréatif (Ministère de l'environnement 2003). Bien que la restriction de l'utilisation de ces produits exclut les terrains de golf, l'article 73 de ce code stipule entre autres que les propriétaires ou les exploitants de terrains de golf qui appliquent ou font appliquer un pesticide doivent transmettre au ministère un

plan triennal de réduction des pesticides. Le premier bilan des plans de réduction des pesticides sur les terrains de golf déposé par le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, en juin 2007, indique que le ver gris est le principal insecte cité dans les plans de réduction (Laverdière *et al.* 2007). Dans ce contexte, le développement de méthodes alternatives de contrôle du ver gris est prioritaire et souhaité afin de répondre aux nouvelles législations, tout en maintenant une qualité adéquate des surfaces gazonnées.

Parmi les agents de lutte biologique reconnus, les champignons entomopathogènes démontrent un potentiel de contrôle considérable des arthropodes, spécialement lorsqu'ils sont incorporés à des programmes de lutte intégrée (Lacey et Goettel 1995 ; Goettel *et al.* 2005). Ils constituent des agents de contrôle intéressants puisqu'ils sont aptes à infecter leur hôte par simple contact avec la cuticule, rendant ainsi tous les stades de l'insecte potentiellement susceptibles. Les champignons entomopathogènes peuvent également être produits en masse à faible coût et être appliqués avec de l'équipement conventionnel. L'application innondative de conidies d'espèces spécifiques, selon les conditions d'applications recommandées, constitue généralement une solution respectueuse de l'environnement (Goettel *et al.* 2001; Zimmermann 2007). Parmi les champignons entomopathogènes, différentes souches de l'espèce *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) ont démontré des résultats positifs contre une grande variété d'insectes ravageurs, incluant des ravageurs du gazon (Studdert et Kaya 1990; Inglis *et al.* 2001 ; Todorova *et al.* 2002; Thompson et Brandenburg 2004). En outre, le potentiel de *B. bassiana* pour le contrôle de plusieurs espèces de la famille des Noctuidae a été démontré (Barbercheck et Kaya 1991; Filho *et al.* 2002) et deux études ont souligné la susceptibilité du ver gris face à *B. bassiana*, en laboratoire et en champ (Aly 2002; Viji et

Bhagat 2001). Actuellement, aucune étude n'a démontré l'efficacité de *B. bassiana* contre les larves de ver gris au Québec.

Par ailleurs, le bioinsecticide spinosad, un produit dérivé de la bactérie du sol *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz et Yao) (Actinomycetales: Pseudonocardiales), représente une nouvelle classe d'insecticides (Naturalyte) prometteuse en lutte intégrée (Sarfraz *et al.* 2005). Le spinosad ne démontre aucune activité antifongique, antibactérienne ou antivirale (Bret *et al.* 1997). De plus, il est classé par l'Agence de protection environnementale des États-Unis (US Environmental Protection Agency) comme un composé à risques réduits en terme environnemental et toxicologique (Thompson *et al.* 2000). Une évaluation étroite du produit devrait par contre être réalisée dans des situations où la conservation des populations de parasitoïdes est souhaitée (Williams *et al.* 2003). S'appliquant avec de l'équipement conventionnel, comme un pesticide chimique, le spinosad est reconnu pour son action sur plusieurs ravageurs, incluant des ravageurs du gazon (Grewal 1999). Plusieurs auteurs ont démontré le potentiel de contrôle du spinosad sur diverses espèces de la famille des Noctuidae, telles la noctuelle du coton (*Spodoptera littoralis* Boisduval) (Pineda *et al.* 2004; Pineda *et al.* 2007) et le légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda* Smith) (Mendez *et al.* 2002; Williams *et al.* 2004). À notre connaissance, au Canada, l'étude de l'effet du spinosad et de *B. bassiana* sur le ver gris ainsi que l'évaluation de l'interaction entre ces agents de contrôle sur un ravageur n'ont, à ce jour, jamais été réalisées.

À la lumière de ces faits, nous avons formulé l'hypothèse suivante:

Le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* ainsi que le biopesticide spinosad, appliqués seuls ou en combinaison, sont efficaces pour le contrôle du ver gris, un insecte ravageur des graminées à gazon sur les terrains de golf.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de tester en laboratoire l'efficacité d'un champignon entomopathogène, *Beauveria bassiana*, et du biopesticide spinosad, appliqués seuls et en combinaison, sur la mortalité du ver gris.

Les objectifs spécifiques sont :

- i) Établir la susceptibilité du ver gris de troisième stade larvaire face à une formulation commerciale de *Beauveria bassiana* (Botanigard ES) et à un produit commercial dérivé de la bactérie *Saccharopolyspora spinosa*, le spinosad (Success 480 SC) par la détermination de la concentration létale à 50% (CL₅₀) et du temps létal à 50% (TL₅₀).
- ii) Déterminer les effets sub-létaux du spinosad sur le développement du ver gris.
- iii) Comparer deux modes d'application de la formulation commerciale de *B. bassiana* et du spinosad, soit l'application directe des produits sur la larve et le feuillage et l'exposition des larves au feuillage traité, sur la mortalité du ver gris.

- iv) Déterminer l'effet de la combinaison (antagoniste, additive, nulle ou synergique) de la formulation commerciale à base de spores de *B. bassiana* et du spinosad, selon trois concentrations causant de 20 à 50% de mortalité sur le ver gris et déterminer la TL_{50} pour chaque combinaison

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le ver gris (Lepidoptera : Noctuidae)

1.1.1 Caractéristiques

Le ver gris (*Agrotis ipsilon* Hufnagel) (« black cutworm ») fait partie de l'ordre des lépidoptères, de la famille des Noctuidae et de la sous-famille des Noctuinae. Les adultes sont des papillons de nuit velus, possédant une envergure alaire de 35 à 45mm. Les ailes antérieures, de couleur grise noire avec les extrémités plus pâles, sont caractérisées par la présence d'une petite marque noire en forme de triangle effilé au centre de chacune d'entre elles (Figure 1.1). Les ailes postérieures, de couleur pâle et uniforme, sont parsemées de veines plus foncées. Au repos, l'adulte maintient ses ailes à plat, en position triangulaire. Le mâle possède des antennes pectinées alors que celles de la femelle sont filiformes.

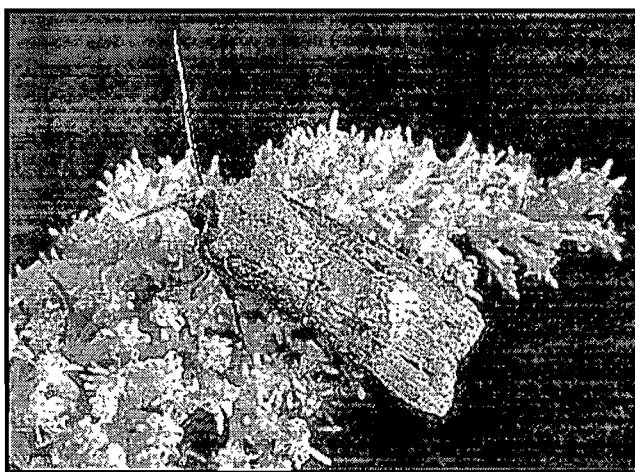


Figure 1.1 Adulte de ver gris, *Agrotis ipsilon* (Potter, 1998)

Les œufs du ver gris sont d'un diamètre de 0,5mm. De couleur crème lors de la ponte, ils deviennent plus foncés lors de la maturation des embryons. Les larves fraîchement écloses ont une longueur d'environ 3,5mm alors que les larves matures varient entre 30 et 45 mm (Potter 1998), avec une largeur d'environ 7mm. Le nombre de stade larvaire varie entre 6 et 7 selon les populations et les conditions de développement. Les larves sont glabres, à l'exception de quelques poils dispersés de façon aléatoire. La partie

supérieure du corps, au dessus des spiracles de couleur noire, varie du gris au noir alors que la partie inférieure est grise pâle (Figure 1.2). La larve ne possède pas de ligne ou marque particulière à l'exception d'un trait pâle et indistinct partant du milieu du dos et allant jusqu'à l'extrémité postérieure. La larve du ver gris possède trois paires de pattes sur le thorax et cinq paires d'appendices sur l'abdomen (Potter 1998). Normalement, lorsqu'elles sont perturbées, les larves se recroquevillent sur elles-mêmes, en forme de C.



Figure 1.2 Larve de ver gris, *Agrotis ipsilon* (© Gosselin, 2005)

Les pupes du ver gris, d'une longueur moyenne de 19mm, varient en couleur de rouges brunes à brunes foncées (Figure 1.3).

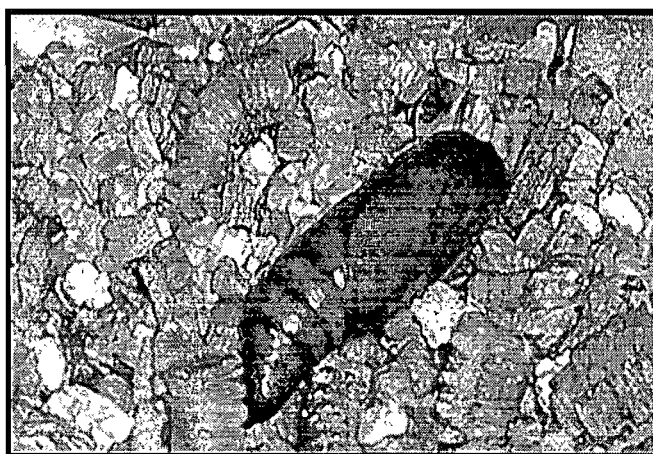


Figure 1.3 Pupa de ver gris, *Agrotis ipsilon* (© Gosselin, 2005)

1.1.2 Cycle vital

Les adultes du ver gris sont actifs de la tombée du jour jusqu'au lever du soleil. Ils prélèvent le nectar des fleurs, ne causant ainsi aucun dommage aux graminées à gazon (Williamson 2001). L'accouplement survient tôt après l'émergence. La femelle pond de 1200 à 1600 œufs, sur une période de 5 à 10 jours, et les attache à l'extrémité des feuilles des graminées à gazon. Après l'éclosion, soit 3 à 6 jours après la ponte, selon la température, les jeunes larves commencent à se nourrir sur le feuillage. Lorsque les larves atteignent le troisième ou le quatrième stade, leur mobilité augmente et elles cherchent de nouveaux sites d'alimentation. Dès lors, elles deviennent souterraines et se creusent un trou ou, sur les terrains de golf, exploitent les trous d'aération afin de s'y cacher durant le jour. Lorsque la nuit tombe, elles sortent et consomment les feuilles des graminées à gazon. Les derniers stades larvaires, à partir du quatrième, sont très destructeurs (Potter 1998). Au total, le développement des larves s'étend de 20 à 40 jours. La pupaison a lieu dans le sol et les adultes émergent environ deux semaines plus tard. Chaque génération, de l'œuf à l'adulte, s'étend en moyenne de 40 à 50 jours (Williamson et Potter 1998).

1.1.3 Distribution

La première mention officielle du ver gris remonte à 1831, en Grande-Bretagne (Showers 1997). Aujourd'hui, la distribution géographique du ver gris est très étendue ; en Amérique du Nord, il est présent dans le sud et l'est du Canada, principalement en Ontario et au Québec, et dans la majorité des états américains (Rockburne et Lafontaine 1976; Showers 1997). On trouve également le ver gris en Amérique centrale, en Amérique du sud, à Hawaï, en Australie, en Nouvelle-Zélande, dans le nord de l'Afrique, en Europe et en Asie.

1.1.4 Écologie saisonnière

Dans les zones tempérées de l'Amérique du Nord, le nombre de générations annuelles varie selon les régions. Aux États-Unis, le ver gris présente cinq à six générations en Louisiane, quatre dans le nord-est du Tennessee, trois dans l'Ohio, au Missouri et dans le centre des Grandes plaines, deux à trois dans le nord-est des Grandes Plaines et deux dans l'état de New-York (Potter 1998). Le ver gris n'hiverné pas à une latitude supérieure à 38°50'N (Showers 1997). En utilisant de puissants systèmes éoliens, les adultes migrent vers le nord au printemps et leur progéniture migre vers le sud à l'automne (Showers 1997). Le ver gris recolonise donc annuellement le nord du continent.

Au Canada, le ver gris présente deux à trois générations en Ontario alors qu'au Québec, sur les terrains de golf, le ver gris est une espèce bivoltine qui présente quelques fois une troisième génération partielle, à la fin septembre, dans le sud-ouest de la province (Sears et al. 1996; Simard 2006). Les adultes arrivent habituellement au début du mois de mai et la première période de dommage a généralement lieu à la fin du mois de juin et au début du mois de juillet. La seconde vague de dommage s'observe à la fin du mois d'août.

1.1.5 Spectre d'hôtes et dommages

Le ver gris est un insecte polyphage dont les larves s'attaquent aux grandes cultures telles le maïs (*Zea mays* Linn.), le coton (*Gossypium* sp. L.), le tabac (*Nicotiana tabacum* Linn.) et le blé (*Triticum* sp.), ainsi qu'à plusieurs cultures maraîchères et fruitières (Rings et al. 1975; Showers 1997; Kullik et al. 2005). La consommation de tiges, de feuilles, de racines, de bulbes et de tubercules peut tuer les plantes, pouvant ainsi réduire les rendements de manière significative. Chez les graminées à gazon, le ver gris s'attaque aux espèces les plus communes, particulièrement à l'agrostide (*Agrostis palustris* Hudson) et au

pâturin annuel (*Poa annua* Linn.). L'ivraie vivace (*Lolium perenne* Linn.), le pâturin couché (*Poa supina* Shrader) ainsi que la fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Shreber) sont des espèces de graminées également propices au développement du ver gris (Williamson et Potter 1997a; Hong et Williamson 2006). Par contre, plusieurs cultivars du pâturin du Kentucky (*Poa pratensis* Linn.) se révèlent être des hôtes inaptés au développement et à la survie des larves de ver gris (Williamson et Potter 1997b; Williamson et Hong 2003; Hong et Williamson 2006).

Sur les terrains de golf, les larves de ver gris s'activent du coucher au lever du soleil (Potter 1998). Elles émergent de leurs cavités et dévorent les tiges et les feuilles des graminées à gazon. Elles peuvent demeurer partiellement à l'intérieur de leur trou et consommer le gazon autour de l'ouverture ou alors elles peuvent quitter leur abri et brouter à la surface. Durant cette période d'activité, les larves peuvent parcourir une distance considérable, soit d'un bout à l'autre d'un vert de golf (à plus de 23 mètres) (Williamson et Potter 1997c). Les dommages se traduisent par des zones de gazon endommagé, ressemblant à des marques de balles, ce qui réduit l'uniformité de la surface de jeu (Tashiro 1987). De plus, la prédation des larves par les oiseaux et autres animaux qui prélèvent des touffes de gazon cause des dommages indirects, réduisant de surcroît la qualité de jeu (Potter 1998). L'ensemble de ces dommages altère le roulement de la balle et réduit la qualité esthétique de la surface de jeu. D'autres espèces de la famille des noctuidés, incluant le ver gris bronzé (*Nephelodes minians* Guenee), le ver gris panaché (*Peridroma saucia* Hubner), le légionnaire uniponctué (*Pseudaletia unipuncta* Haworth) et le légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda* Smith) représentent des ravageurs sporadiques sur les pelouses et dans l'herbe longue des terrains de golf de l'Amérique du

Nord, mais ces espèces attaquent rarement les graminées à gazon sur les verts et les départs des terrains de golf (Potter 1998).

1.1.6 Ennemis naturels

Plusieurs insectes prédateurs de la famille des Carabidae, des Staphylinidae et des Coccinellidae attaquent le ver gris (Frank et Shrewsbury 2004). Également, les espèces *Bonnetia comta* (Fallen) (Diptera : Tachinidae) et la guêpe *Meteorus vulgaris* (Cresson) (Hymenoptera : Braconidae) sont des parasitoïdes du ver gris (Cossentine et Lewis 1986; Stinner et House 1990). Aucune de ces espèces parasites n'est disponible commercialement (Potter 1998). En outre, il a été démontré que la fourmi *Lasius neoniger* (Emery), bien que considérée par les surintendants des terrains de golf comme une espèce pouvant être nuisible, engendre un contrôle important du ver gris par la consommation des œufs présents sur les verts de golf, dans les allées et dans l'herbe longue (Lopez et Potter 2000). Enfin, certaines espèces d'oiseaux consomment les larves de ver gris, soit les corneilles, les geais ainsi que les merles, ainsi que quelques petits mammifères (Potter 1998).

1.1.7 Méthodes de contrôle

Au Canada, deux insecticides de synthèse sont homologués pour le ver gris sur les terrains de golf, soit le chlorpyrifos (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS; O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate) et le carbaryl (C₁₂H₁₁NO₂; 1-naphthalenyl methylcarbamate (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire 2008). Ces deux produits engendrant un contrôle satisfaisant, la lutte chimique est préconisée à travers le pays.

Parmi les agents biologiques de contrôle, les nématodes entomopathogènes, principalement du genre *Steinernema*, démontrent un potentiel de contrôle du ver gris (Capinera *et al.* 1988; Shetlar *et al.* 1996; Baur *et al.* 1997; Hazir *et al.* 2003). Le

baculovirus nucleopolyhedrovirus multicapside *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV) a récemment été l'objet d'études ayant établi un potentiel de contrôle des larves de ver gris (Boughton *et al.* 1999; Prater *et al.* 2006). Quant à *B. bassiana*, quelques auteurs ont démontré une susceptibilité du ver gris à cette espèce de champignon entomopathogène (Viji et Bhagat 2001; Aly 2002). D'autre part, quelques biopesticides présentent également un potentiel de contrôle de ce ravageur. L'azadirachtine (« neem »), extrait de l'espèce végétale *Azadirachta indica* A. Juss, présente un potentiel de contrôle sur les larves de ver gris lorsque ces dernières sont très jeunes et qu'elles subissent une mue à quelques jours d'intervalle (Potter 1998). La protéine végétative insecticide Vip3A de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (souche AB88) démontre une activité insecticide sur le ver gris (Estruch *et al.* 1996). D'autres travaux ont rapporté une toxicité de l'endotoxine Cry9ca de *B. thuringiensis* contre les larves de ver gris (Lambert *et al.* 1996; De Maagd *et al.* 2003). En ce qui concerne le spinosad, quelques tests en champ ont engendré des résultats positifs (Shetlar *et al.* 1997; Heller et Walker 1998; Shetlar *et al.* 1998; Swier *et al.* 1998). De plus, la formulation commerciale Conserve SC[®] est actuellement homologuée et utilisée sur les terrains de golf aux États-unis pour lutter contre le ver gris (Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana, U.S.A).

Des pratiques culturales peuvent également permettre un contrôle du ver gris sur les terrains de golf. La tonte quotidienne peut prélever de 80 à 90% des œufs de ver gris attachés au feuillage (Potter 1998). De ce fait, la disposition des résidus de tonte à une distance stratégique des verts de golf peut être un moyen efficace de contrer le ver gris (Williamson et Potter 1997d). De plus, une tonte effectuée tôt le matin peut broyer mécaniquement les larves de ver gris qui se trouvent encore à la surface. Également, l'établissement et l'entretien d'une zone tampon d'environ 30 pieds autour des verts de golf

peuvent permettre une gestion des populations réservoirs aux pourtours des verts, en y semant, par exemple, des espèces ou cultivars de graminées résistants au développement du ver gris tel le pâturin de Kentucky (Williamson et Potter 1997a). Enfin, Frank et Shrewsbury (2004) ont démontré que la mise en place de bandes de conservation en bordure des allées de terrains de golf permet d'augmenter l'abondance des prédateurs et des parasitoïdes du ver gris, amplifiant de ce fait la prédation et le parasitisme des larves de ce ravageur.

1.2 *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin

1.2.1 Description

En 1807, Agostino Bassi di Lodi a observé une maladie chez le ver à soie (*Bombyx mori* Linn.) (Lepidoptera : Bombycidae), qu'il a nommée « muscardine blanche ». En 1835, il a démontré, pour la première fois, qu'un champignon pouvait engendrer une maladie chez un insecte. Au cours de la même année, l'espèce aujourd'hui connue sous le nom de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Criv.) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) a été étudiée et décrite par le naturaliste italien Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli. Celui-ci lui donna alors le nom *Botrytis bassiana*, en l'honneur de Bassi (Zimmermann 2007). En 1911, Beauverie étudia également ce champignon entomopathogène, suivi en 1912, par Vuillemin. Ce dernier créa le genre *Beauveria* en l'honneur du chercheur. Depuis la première description de l'espèce, ce champignon est utilisé en contrôle biologique contre les insectes ravageurs.

La classification de *B. bassiana* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Par le passé, l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes, les membres de cette sous-division ayant comme spécificité qu'ils ne produisent jamais, ou très rarement, de spores sexuées. Cette classe est en fait caractérisée par la présence de formes mycéliennes portant des spores asexuées, appelées conidies, engendrées sur des cellules conidiogènes spécialisées. Par contre, à l'heure actuelle, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les *Deuteromycota* et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique. Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des *Ascomycota* sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *B. bassiana* (Inglis *et al.* 2001). Cette

espèce fait dès lors partie du règne des *Mycota*, de la division des *Ascomycota* et de l'ordre des *Hypocreales*.

B. bassiana croît généralement densément à travers l'exosquelette des cadavres d'insectes tués par l'espèce. Le champignon produit des colonies cotonneuses variant de blanchâtres à jaunâtres, présentant occasionnellement une couleur rougeâtre. Les conidies, ou spores, possèdent un diamètre de 2-6 μ m et sont soutenues par de longs filaments en zigzag ou par des extensions apicales d'environ 20 μ m, appelées rachis (Humber 1997; Zimmermann 2007). Les cellules conidiogènes forment de courts épis, d'aspect épineux. En condition aérobie, *B. bassiana* produit des conidiospores de forme sphérique (1-4 μ m de diamètre) ou ovales (1,55-5,5 X 1-3 μ m d'envergure) alors qu'en milieu anaérobie, l'espèce produit des blastospores de forme ovales (2-3 X 7 μ m). Les blastospores sont aussi infectieux que les conidiospores.

1.2.2 Cycle vital

Le champignon entomopathogène *B. bassiana* infecte ses hôtes principalement à travers la cuticule de l'insecte, selon sept étapes distinctes : 1) l'adhésion des spores à la cuticule, 2) la germination, 3) la différenciation, 4) la pénétration à travers la cuticule, 5) la neutralisation de la réponse de l'hôte et des réactions de défense immunitaire, 6) la prolifération à l'intérieur de l'hôte par la formation de blastospores ou de mycélium et 7) la croissance saprophyte hors du cadavre de l'hôte et la production de nouvelles conidies (Inglis *et al.* 2001). Les conidies de *B. bassiana* adhèrent à la cuticule de l'insecte et s'y attachent grâce à des forces hydrophobiques et électrostatiques (Boucias *et al.* 1988). Certaines substances, telles des détergents, des solvants et des protéines de poids moléculaires élevés, sont connues pour avoir la capacité de neutraliser l'hydrophobicité et

réduire l'attachement des conidies. Une fois adhérentes, elles forment un mucilage qui engendre une modification épicuticulaire. Cette étape mène à la germination. Celle-ci dépend largement des conditions environnantes, telles la température, la lumière et, principalement, de l'humidité relative (Feng *et al.* 1994; Inglis *et al.* 2001). En général, la fenêtre de pourcentage d'humidité relative menant à la germination de *B. bassiana* varie de 92% à 100% (Walstad *et al.* 1970; Hallsworth et Magan 1999). En ce qui a trait à la température, *B. bassiana* démontre une activité pathogène optimale entre 25 et 30° C, selon l'espèce hôte et la souche (Ekesi *et al.* 1999; Lecuano *et al.* 2001; Tefera et Pringle 2003). La composition biochimique de la cuticule de l'hôte est également un facteur important pour la germination; *B. bassiana* dépend, pour son développement, de sources de carbone tel le glucose, la glucosamine, la chitine et l'amidon. L'azote est également nécessaire pour la croissance des hyphes. Par contre, certains composés cuticulaires comme les acides gras, la mélanine, les aldéhydes, les cétones et certains alcools peuvent démontrer une activité antimicrobienne (Inglis *et al.* 2001; Zimmermann 2007). L'étape de différenciation se caractérise par la production de structures de pénétration, appelé appressoria chez *B. bassiana*. Ces structures servent de point d'ancrage et ramollissent la cuticule, favorisant ainsi la pénétration. Celle-ci s'effectue généralement via les endroits minces et non-sclérotisés de la cuticule comme aux joints, entre les segments et à travers les pièces buccales. La pénétration s'opère par une combinaison de pression mécanique et d'activité enzymatique impliquant des protéases, des lipases et des chitinases (Pekrul et Grula 1979; Inglis *et al.* 2001). Par la suite, une fois qu'il atteint l'hémocoel, le champignon entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe. Pour ce faire, le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte. L'espèce *B. bassiana* produit des composés toxiques non enzymatiques telles la beauvericine, des beauverolides et des bassianolides qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de

proliférer (Inglis *et al.* 2001). La mort de l'insecte survient alors par la déplétion de nutriments, l'invasion et la destruction des tissus et le relâchement de toxines. Sous conditions optimales, la mort d'un insecte survient normalement entre 3 et 5 jours à partir du moment de l'infection. Une fois l'insecte mort, l'espèce produit un antibiotique, l'oosporin, qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophages dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis *et al.* 2001). Le champignon entame alors une phase saprophytique. Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau intersegmentaire si les conditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage mycélien blanc cotonneux, nommé muscardine, constitué d'hyphes et de conidiophores supportant les conidies. La phase saprophytique du cycle du champignon ne dépend pas de l'humidité ambiante. Par contre elle est influencée par la température (Ferron 1977). Au contraire, le processus de formation des conidies est largement dépendant de l'humidité relative, requérant plus de 95% (Luz et Fargues 1998). Enfin, la survie des conidies est grandement réduite par la radiation solaire (Inglis *et al.* 2001).

Le succès de l'infection d'un champignon entomopathogène dépend d'une variété de facteurs tels la nature et la physiologie de l'hôte, c'est-à-dire l'âge, le stade de développement de l'insecte au moment de l'infection, ses mécanismes spécifiques de défenses, sa nutrition ainsi que l'exposition aux lésions causées par des agents non-microbiens (i.e. prédateurs et parasites), chimiques ou mécaniques. (i.e. ses mécanismes de défense), la physiologie du champignon (i.e. sa capacité, par exemple, à produire des enzymes et des toxines) et l'environnement (Inglis *et al.* 2001). L'interaction entre les variables environnementales joue également un rôle non négligeable sur le pouvoir

pathogène du champignon. Enfin, la susceptibilité de la plupart des insectes est dépendante de la dose de spores à laquelle ils sont exposés (Butt et Goettel 2000).

1.2.3 Distribution et évolution dans l'environnement

B. bassiana est un champignon ubiquiste, qui croît dans les sols et qui possède la capacité d'infecter des insectes, autant dans les régions tropicales que tempérées. La distribution de *B. bassiana* est mondiale, sa présence ayant été rapportée au Canada, aux États-Unis, en Turquie, en Côte d'Ivoire, en Afrique de l'Ouest équatorial, en Afrique central, en Afrique du Sud, aux Bahamas, au Népal, dans l'est de la Sibérie, en Nouvelle-Zélande et au Japon (Zimmermann 2007). Le type d'habitat de *B. bassiana* varie des sols alpins, aux tourbières, aux sols dominés par la savane, aux forêts, aux sols cultivés, aux dunes et aux sols désertiques. Il est également présent en eau courante (Zimmermann 2007). Son pouvoir entomopathogène a été relevé sur plus de 200 espèces d'insectes, dans neuf ordres différents, principalement chez les Lépidoptères et les Coléoptères (Feng *et al.* 1994).

La viabilité des spores de *B. bassiana* dans l'air est grandement affectée par la température, l'humidité et le rayonnement solaire. En effet, une inactivation rapide (quelques heures) des conidies par la radiation ultraviolette a été démontrée en laboratoire (Fargues *et al.* 1996), la portion UVB du spectre solaire (285-315nm) étant la plus néfaste. De plus, il a été démontré que la persistance de l'activité des spores de *B. bassiana* à la surface de feuilles de soya diminue de moitié 5 à 10 jours après l'exposition (Gardner *et al.* 1977). L'espèce végétale influence également la persistance et le pouvoir infectieux des conidies (Zimmermann 2007). En ce qui concerne l'eau, les précipitations jouent un rôle dans la dispersion des conidies. Le type de sol ainsi que sa structure affectent le mouvement

des conidies à travers le sol (Storey et Gardner 1988; Storey *et al.* 1989). Ainsi, la persistance des conidies de champignons dans le sol est dépendante de la température et de la quantité d'eau présente. Selon Lingg et Donaldson (1981), la demi-vie des conidies de *B. bassiana* dans le sol varie de 14 jours à 25°C et 75% de saturation en eau à 276 jours à 10°C et 25% de saturation en eau. Par ailleurs, en lutte biologique, la formulation utilisée et/ou la méthode d'application influencent également la persistance, et le pouvoir infectieux, des spores au niveau du sol (Inglis *et al.* 2001). Par exemple, l'inactivation rapide par la radiation solaire des propagules infectieuses est considérée comme l'obstacle majeur à la commercialisation et l'utilisation des entomopathogènes en champs. De ce fait, la présence de différents types d'écrans solaire et/ou de filtres solaire dans les formulations augmente la persistance des conidies de *B. bassiana* sur le feuillage (Inglis *et al.* 1995).

1.2.4 Doses recommandées

La dose à laquelle une mycose se développe dépend de plusieurs facteurs tels la souche de l'espèce de champignon utilisée, l'espèce ciblée et le mode d'application adoptée (Ferron 1978). Des conidies de diverses souches de *B. bassiana* sont commercialisées par plusieurs compagnies sous plus d'une dizaine de formulations différentes à travers le monde (Zimmermann 2007). Les doses recommandées par ces différentes compagnies varient selon le type de culture, l'espèce cible, le stade de développement de cette dernière et l'isolat de *B. bassiana*. Aux États-Unis, deux souches différentes de l'espèce sont commercialisées, soit les souches GHA (Laverlam International Corporation) et ATCC 74040 (Troy Biosciences Inc.). Par exemple, la souche GHA de *B. bassiana*, commercialisée sous le nom de Botanigard ES, contient 1×10^{10} spores/ml. Cette suspension émulsifiable contient 11,3% d'ingrédients actifs et 88,7% d'ingrédients inertes. Pour la plupart des applications au sol, la compagnie recommande une dose de 2 à 8 onces

du produit par 1000 pieds carrés, la dose la plus élevée étant recommandée pour les ravageurs les plus coriaces à contrôler tels les charançons des racines (Laverlam International Corporation, Butte, MT, USA). Dans la plupart des grandes cultures, les recommandations varient autour de 1×10^{13} conidies/hectare.

1.2.5 Effets sur les organismes non-ciblés

L'application inondative de spores de *B. bassiana* n'a démontré, avec le temps, aucune activité phytotoxique (Zimmermann 2007). De plus, aucun impact n'a été relevé, à ce jour, de la part des toxines produites par *B. bassiana* sur des espèces végétales. Par contre, récemment, la beauvericine, isolée et testée à partir d'espèces de *Fusarium*, a démontré des effets hautement toxiques sur les protoplastes de plusieurs espèces végétales (Moretti *et al.* 2002). D'autre part, *B. bassiana* a la capacité de se développer comme endophyte chez certaines espèces végétales, spécialement le maïs (Bing et Lewis 1992). Jusqu'à présent, aucune activité néfaste de cette propriété de l'espèce sur la croissance et la santé des végétaux n'a été rapportée (Zimmermann 2007). Par ailleurs, en ce qui a trait aux organismes du sol tels les collemboles et les mites, aucun effet préjudiciable important n'a été relevé de la présence de *B. bassiana* (Zimmermann 2007).

Par ailleurs, au fil des années, certains effets néfastes issus de l'utilisation de *B. bassiana* sur quelques espèces de prédateurs, parasitoïdes et organismes bénéfiques comme les pollinisateurs ont été observés. Ces effets ont été relevés principalement en laboratoire (Zimmermann 2007). Par exemple, *B. bassiana* réduit la longévité et engendre une mycose à des concentrations de 10^6 - 10^8 spores/individu chez l'abeille domestique *Apis mellifera* Linn., en laboratoire (Vandenberg 1990). Par contre, plusieurs auteurs considèrent que les champignons entomopathogènes, dans l'ensemble, engendrent un impact négatif

négligeable envers ces organismes non-ciblés (Goettel *et al.* 2000), surtout lorsque la sélection de l'isolat et les facteurs spatio-temporels sont pris en compte.

L'impact de différents isolats de *B. bassiana* sur les vertébrés a également été étudié à maintes reprises. Dans l'ensemble, l'espèce est considérée comme étant non-toxique et non-infectieuse face aux vertébrés (Zimmermann 2007). Par contre, quelques infections causées par *B. bassiana* ont été relevées chez une espèce de poisson et chez des espèces de tortues captives (Middaugh et Genthner 1994; Gonzales-Cabo *et al.* 1995). Chez les amphibiens et les oiseaux, aucun effet néfaste n'a été rapporté. En ce qui concerne les mammifères, dont les humains, certains risques toxiques ou pathogènes, ainsi que des allergies, ont été relevés. Des études moléculaires ont prouvé que *B. bassiana* peut produire plusieurs immunoglobulines d'isotype E (protéines IgE) réactives (Westwood *et al.* 2005). Par contre, en ce qui concerne les propriétés pathogènes et/ou toxiques envers les humains, les quelques cas rapportés concernent des individus la plupart du temps immuno-déficient (Zimmermann 2007). Enfin, en ce qui concerne les métabolites secondaires produits par *B. bassiana*, il a été démontré que les formulations commercialisées existantes ne posent aucun risque à la santé des humains et des animaux puisque les composés sécrétés sont spécifiques à l'hôte qu'ils attaquent et que la quantité produite dans l'environnement n'est pas abondante (Strasser *et al.* 2000).

1.2.6 Potentiel d'utilisation

Les champignons entomopathogènes sont des agents de lutte biologique reconnus. Ils ont été employés, à maintes reprises, afin de réprimer une multitude de ravageurs, et ce, de manière efficace (Inglis *et al.* 2001). Par contre, les interactions complexes entre le pathogène, l'hôte, les conditions environnementales et le facteur temps font en sorte que

l'application de champignons entomopathogènes n'engendre par toujours des résultats positifs constants sur les ravageurs ciblés. Ces facteurs, associés au fait que les champignons entomopathogènes soient relativement coûteux à produire et qu'ils soient sensibles à la température du sol, à la radiation solaire et à l'humidité, font en sorte que leur développement en tant que bio-insecticide dans les gazons a, par le passé, été limité (Glare et Jackson 1992). Du point de vue de l'industrie, les tactiques de gestion envers les insectes ravageurs dans les gazons des terrains de sport doivent être compatibles avec les standards d'esthétisme, de qualité de surface de jeu, de sûreté, de temps et de coûts (Potter 2003). Aujourd'hui, l'intégration des champignons entomopathogènes comme agents de contrôle des ravageurs à un système de lutte intégrée (Integrated Pest management (IPM)) rehausse leur potentiel d'utilisation. Il est cependant important d'optimiser le choix de la souche et sa formulation. En effet, des problèmes d'efficacité sont inextricablement liés à la production et à la formulation des champignons entomopathogènes. Cependant, de récents progrès au niveau de la technologie des myco-insecticides augmentent leur potentiel comme agent de contrôle des ravageurs, autant d'un point de vue environnemental qu'économique (Wraight et Carruthers 1999). Enfin, il est important d'assurer l'application du produit en quantité adéquate au bon moment. Ce dernier dépend habituellement de la présence de l'hôte, des conditions environnementales favorables et de la compatibilité avec la régie d'entretien, tel l'irrigation, l'application de fongicide etc. (Lacey *et al.* 2001).

Différents auteurs ont démontré la susceptibilité de plusieurs espèces de noctuidés à diverses souches de *B. bassiana*, tels *Alabama argillacea* (Hübner), *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sesamia calamistis* (Hampson) et *Panolis flammea* (Dennis & Schiffermüller) (Filho *et al.* 2002; Hick *et al.* 2001 ; Cherry *et al.* 2004 ; Nguyen *et al.* 2007). En ce qui concerne le ver gris, Viji et Bhagat (2001) rapportent que *B. bassiana* engendre une

protection adéquate des cultures de maïs face à ce ravageur durant les derniers stades de croissance des plants. Par ailleurs, Aly (2002) a démontré que les œufs et les larves de deuxième stade de *A. ipsilon* sont susceptibles à cette espèce de champignon entomophage.

L'utilisation du champignon entomopathogène *B. bassiana* offre des avantages intéressants. Étant apte à infecter ses hôtes par simple contact avec la cuticule, tous les stades de l'insecte sont potentiellement susceptibles (Cloutier et Cloutier 1992). Actuellement, diverses souches de *B. bassiana* peuvent également être produites en masse à moindre coût et les formulations peuvent être normalement appliquées avec de l'équipement conventionnel. Enfin, les conidies de *B. bassiana* constituent un agent de lutte biologique généralement sûr d'un point de vue toxicologique et environnemental (Zimmermann 2007).

1.3 Le spinosad

1.3.1 Description

Le spinosad est un biopesticide issu du mélange des deux métabolites secondaires les plus actifs retrouvés naturellement chez la bactérie actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Actinomycetales: Pseudonocardiales), la spinosyne A et la spinosyne D. Isolée à partir d'un échantillon de sol provenant des Caraïbes, *S. spinosa* a été décrite pour la première fois en 1990 par Mertz et Yao. Les spinosynes sont des lactones macrocycliques dérivées d'une fermentation aérobie sur médium nutritif (Thompson *et al.* 2000). Structuellement, ces composés macrolides portent un seul anneau tétracyclique auquel s'attachent deux sucres différents. À la suite de la fermentation, un processus industriel est réalisé afin de former une suspension aqueuse fortement concentrée. Le spinosad technique se compose à 85% de spinosynes A et 15% de spinosynes D (Sarfraz *et al.* 2005). Ce biopesticide a été commercialisé en 1997 par Dow AgroSciences Inc. (Thompson *et al.* 2000).

1.3.2 Propriétés physicochimiques

Le spinosad possède un pH, dans l'eau, de 7,74 et il est non-volatile. Ce produit subit, principalement dans l'environnement, une photodégradation ainsi qu'une dégradation microbienne. Ces processus libèrent les composés naturels du spinosad, soit le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote (Thompson 1999). La demi-vie du spinosad varie selon le type de photolyse ; au niveau du sol elle est de 9 à 10 jours, alors qu'une photolyse aqueuse engendre une demi-vie de moins d'une journée. À la surface des feuilles, la demi-vie du spinosad varie de 1,6 à 16 jours, selon la radiation solaire (Organic Materials Review Institute (OMRI) 2002). Lorsque dégradé par métabolisme aérobie dans le sol, en absence de lumière, le spinosad a une demi-vie de 9 à 17 jours. L'hydrolyse ne contribue

pas significativement à la dégradation du produit, ce dernier étant relativement stable dans une eau d'un pH de 5 à 7. Dans une eau ayant un pH de 9, la demi-vie du spinosad atteint 200 jours minimum. En outre, le potentiel de lessivage du produit est très faible due à une mobilité dans le sol modérée ($K_d = 5-323$), à une solubilité dans l'eau de faible à modérée et à une courte période résiduelle dans l'environnement (Thompson *et al.* 2000). Ce biopesticide se dissout rapidement dans l'environnement, autant au niveau des systèmes aquatiques que terrestres (Cleveland *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2002). Plusieurs auteurs rapportent une dégradation rapide des résidus du spinosad, en champ, accompagné d'une légère toxicité résiduelle, variant de 3 à 7 jours suite à l'application (Williams *et al.* 2003). Finalement, l'application foliaire du spinosad, bien que ce dernier ne soit pas systémique, peut engendrer un mouvement trans-laminaire dans les tissus de la feuille (Thompson *et al.* 2000). Il ne démontre par contre aucune activité phytotoxique chez les plantes terrestres (Cleveland *et al.* 2001).

1.3.3 Mode d'action

Le spinosad engendre une surexcitation prolongée et, ultimement, une perturbation irréversible du système nerveux de l'insecte. Il agit à la fois par contact et par ingestion, l'efficacité étant plus élevée lorsque le produit est ingéré (OMRI 2002). Plus précisément, les spinosynes engendrent l'excitation du système nerveux de l'insecte, par l'entremise des récepteurs nicotinique et à acide gamma-aminobutyrique (GABA). Le mode d'action du spinosad est unique, c'est-à-dire qu'aucune autre classe de produits n'affecte le système nerveux de l'insecte de cette manière. En effet, mêmes les insecticides chimiques basés sur les récepteurs nicotiniques, tel l'imidaclopride, agissent à des sites différents de ceux activés par le spinosad (Salgado et Saar 2004). De ce fait, le spinosad ne partage pas de résistance croisée connue avec d'autres insecticides (Liu et Yue 2000; Ishaaya *et al.* 2007).

Enfin, son mode d'action est caractérisé par des contractions musculaires involontaires ainsi qu'une prostration de la larve et des tremblements. Une fois infecté, l'insecte cesse de manger et subit, dans un délai d'environ 24 heures, une paralysie puis la mort.

Le spinosad est un insecticide relativement sélectif, reconnu pour être particulièrement toxique envers les lépidoptères, les diptères et les thysanoptères (Thompson *et al.* 2000). Il est en outre efficace contre les hyménoptères et quelques espèces parmi les coléoptères et les orthoptères qui consomment de grandes quantités de feuillages (Sparks *et al.* 2001). D'autres types de spinosynes et des spinosoïdes, des dérivés synthétiques, démontrent une activité contre plusieurs espèces de l'ordre des coléoptères, des homoptères, des hyménoptères, des isoptères et des orthoptères, formant ainsi une nouvelle génération d'analogues actuellement en développement (Salgado 1998; Williams *et al.* 2003).

1.3.4 Doses recommandées

En 2000, le spinosad était homologué sur plus de 150 cultures dans plus de 30 pays à travers le monde (Cleveland *et al.* 2001). Aux États-unis, il est actuellement homologué dans plusieurs types de cultures : légumes crucifères (e.g. chou et chou-fleur), légumes à feuilles (e.g. épinards, persil, céleri, laitue), légumes fructifères (e.g. tomates, poivre), grandes cultures (e.g. tabac, coton), plantations de fruits ainsi que dans les gazons (Grewal 1999; Cleveland *et al.* 2001; Sarfraz *et al.* 2005). Le spinosad est commercialisé principalement sous des formulations possédant différentes concentrations d'ingrédient actif (i.a.) telles Tracer[®], Conserve[®], Success[®], SpinTor[®] et Justice[®] (Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana, U.S.A.). La quantité de spinosad recommandée pour le contrôle des insectes ravageurs varie selon la nature spécifique de ces derniers et de leur habitat. En

général, 25 à 175 g d'i.a. / ha sont conseillés pour la plupart des insectes défoliateurs, 70 à 360 g i.a. /ha pour les mineuses et 88 à 450 g i.a. /ha pour les ravageurs des gazons (Thompson *et al.* 2000). Selon le type d'application, aérienne ou terrestre, le volume nominal proposé diffère et entraîne une concentration finale d'ingrédient actif variant de 150ppm à 8750ppm par pulvérisation aérienne (Dow AgroSciences 2001).

1.3.5 Effets sur les organismes non-ciblés

Le spinosad est classé par l'Agence Protection Environnementale des États-Unis (United States Environmental Protection Agency) comme un composé à risques réduits en terme environnemental et toxicologique (Thompson *et al.* 2000). Par contre, différents effets létaux et sublétaux sur des ennemis naturels ont été relevés (Williams *et al.* 2003). L'impact du produit varie selon la dose à laquelle l'espèce non visée est exposée. Selon une synthèse récente réalisée par Williams *et al.* 2003, parmi 27 espèces de prédateurs testées, aucune ne présente d'effets néfastes significatifs lorsqu'elles sont exposées à des doses de spinosad représentatives des recommandations de la compagnie. Par contre, Galvan *et al.* (2005) ont rapporté, chez la coccinelle asiatique (*Harmonia axyridis* Pallas), une diminution de la survie du premier stade, un prolongement de la période de développement, un ralentissement du gain de poids et une réduction de la fertilité chez les femelles, et ce, à des doses de spinosad (SpinTor 2SC[®]) équivalentes à 50% et moins de la dose recommandée en champ.

Les effets négatifs du spinosad sont plus importants chez les parasitoïdes. Selon une synthèse regroupant 25 espèces de parasitoïdes, 35 des 45 études en laboratoire et 18 des 21 études en champ analysées démontrent que le spinosad est de modérément dangereux à dangereux sur ces espèces (Williams *et al.* 2003). Il engendre des effets tels une diminution

ou une perte de la capacité de reproduction, une réduction de la longévité ainsi que des changements au niveau du comportement (Williams *et al.* 2003). Selon les auteurs, l'utilisation de ce biopesticide devrait être étroitement surveillée dans des situations où la conservation des populations de parasitoïdes est particulièrement souhaitée. Également, la survie et la reproduction de deux espèces de parasitoïdes du légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda* Smith), soit *Chelonus insularis* (Cresson) et *Euplectrus plathypenae* (Howard), sont affectées lorsqu'elles sont exposées à des doses de spinosad (Tracer[®]) variant de 20ppm à 200ppm, en laboratoire (Penagos *et al.* 2005). Des études récentes ont également rapporté des impacts négatifs de formulations de spinosad, telles le Success[®], GF-120[®] et Entrust[®], sur plusieurs espèces de parasitoïdes, (Wang *et al.* 2005 ; Hossain et Poehling 2006 ; Arthurs *et al.* 2007).

Selon le classement de l'Agence de protection environnementale des États-unis, le spinosad possède une faible toxicité envers les mammifères et les oiseaux alors qu'il démontre une toxicité qualifiée de légère à modérée envers les organismes aquatiques (Thompson *et al.* 2000). Par contre, des tests chez les mammifères n'ont démontré aucun effet carcinogène, tératogène, mutagène ou neurotoxique de la part de ce produit. D'autre part, le spinosad est considéré comme étant hautement toxique envers les abeilles (Thompson *et al.* 2000). Par contre, selon Cleveland *et al.* (2001), les tests réalisés en laboratoire ayant permis de parvenir à cette classification ne sont pas représentatifs de la réalité en champ. Des expériences réalisées en milieu naturel évoquent des impacts réduits sur ces mêmes pollinisateurs.

Finalement, le spinosad possède un profil toxicologique relativement intéressant lorsqu'il est comparé aux insecticides de synthèse communs (Sparks *et al.* 2001). De façon

générale, il est sûr envers les organismes non-ciblés. Par contre, les possibles effets délétères que le spinosad peut engendrer chez les hyménoptères parasitoïdes doivent être fortement considérés lors de l'utilisation de ce biopesticide.

1.3.6 Potentiel d'utilisation

De plus en plus utilisé à travers le monde, le spinosad est un outil très prometteur des programmes de lutte intégrée (Sarfraz *et al.* 2005), entre autres, envers plusieurs ravageurs de la famille des noctuidés. Mendez *et al.* (2002) et Williams *et al.* (2004) ont démontré un contrôle des larves du légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*), en laboratoire et en champ. La susceptibilité de différents stades larvaires du ver du coton (*Spodoptera littoralis*) face au spinosad a également été relevée à maintes reprises (Pineda *et al.* 2004 ; Pineda *et al.* 2006 ; Pineda *et al.* 2007). Enfin, plusieurs tests ont démontré une action positive du spinosad en champ et sur des verts de golf sur les stades larvaires 2, 3 et 4 du ver gris (Shetlar *et al.* 1997 ; Heller et Walker 1998; Sheltar *et al.* 1998; Swier *et al.* 1998). Le système gazon, de par sa seule strate, herbacée, représente un milieu simple caractérisé majoritairement par une seule espèce de graminée. De ce fait, l'utilisation du spinosad dans cet écosystème implique qu'il soit appliqué directement sur la source de nourriture du ravageur ciblé, ce qui est d'autant intéressant puisque le produit est majoritairement efficace lorsqu'il est ingéré (OMRI 2002). Enfin, le spinosad agissant rapidement comparativement à la plupart des agents de lutte biologique, son utilisation s'arrime bien à la régie d'entretien intensive requise sur les terrains de golf.

L'utilisation du spinosad offre plusieurs avantages par rapport aux pesticides de synthèses. Premièrement, de manière générale, le spinosad est considéré comme un insecticide à risques réduits face aux organismes non-ciblés, en plus de ne présenter aucun

effet toxicologique chronique chez les mammifères (i.e. un pouvoir neurotoxique). Son potentiel de lessivage est très bas, il ne s'accumule pas dans l'environnement et n'est pas volatil. Comme le spectre d'action du spinosad est relativement large, il peut engendrer un contrôle efficace de ravageurs appartenant à plusieurs ordres d'insectes. De plus, du fait que le spinosad ne partage pas de mécanisme de résistance croisée connue avec aucun autre insecticide, l'adoption d'un système de rotation de ce produit avec d'autres types d'insecticides est logiquement envisageable. En outre, puisque le spinosad ne présente aucune activité antifongique, antibactérienne ou antivirale, il peut être appliqué conjointement avec des agents de lutte biologique ou d'autres biopesticides. Enfin, le spinosad est un produit facilement utilisable, l'application s'effectuant comme un pesticide conventionnel.

1.4 La combinaison d'agents de contrôle

L'application combinée d'entomopathogènes et d'insecticides de synthèse à des doses sublétales ou d'autres agents de lutte biologique a été proposée comme stratégie afin d'améliorer l'efficacité des agents microbiens (Anderson *et al.* 1989; Lacey *et al.* 2001).

De telles combinaisons peuvent améliorer le contrôle selon différents mécanismes. Premièrement, une modification de la mortalité de la population du ravageur ciblée peut être obtenue par l'action conjointe de deux agents selon trois types d'effets, soit un effet synergique, un effet additif ou encore un effet antagoniste (Koppenhöfer et Kaya 1997; Roy et Pell 2000). Une interaction synergique entre deux agents résulte en une mortalité plus élevée que l'addition des mortalités individuelles issues de chacun des agents sur une population de ravageurs. Une mortalité additive survient si les agents de contrôle interagissent très peu ou pas; le niveau total de mortalité est équivalent aux mortalités individuelles combinées de chacun des agents. Au contraire, un effet antagoniste peut survenir, celui-ci se traduisant par une mortalité totale moindre que celle engendrée par une mortalité additive. Les mécanismes responsables de l'obtention d'un effet synergique n'ont pas encore été démontrés. Une hypothèse suppose qu'un des agents de contrôle crée un stress physiologique ou un affaiblissement du système immunitaire chez l'insecte ciblé, permettant au second agent d'être plus efficace (Fargues 1973; Sanyang et Van Emden 1996; Koppenhöfer et Kaya 1997; Hiromori et Nishigaki 1998; Koppenhöfer *et al.* 1999). Il a en effet été démontré que l'évolution du processus infectieux varie selon l'état physiologique de l'individu traité : une accélération et une augmentation de la mortalité sont constatées parmi des insectes déjà malades ou physiologiquement affaiblis (Ferron 1978). En ce sens, l'obtention d'une période de temps létale plus courte est également un

mécanisme indirect d'amélioration du contrôle issu du synergisme entre deux agents. Barbercheck et Kaya (1990) ont démontré que la co-infection par des nématodes et *B. bassiana* peut réduire la durée de la période d'infection létale comparativement à celle engendrée par l'un ou l'autre des agents.

Deuxièmement, la combinaison d'agents peut permettre de réduire la variabilité associée aux agents biologiques de contrôle (Guetsky *et al.* 2001). Par exemple, il a été démontré que, dans le but de supprimer *Botrytis cinerea* sur des feuilles de fraisières, l'application simultanée de la levure *Pichia guilhermondii* et de la bactérie *Bacillus mycoïdes* a permis d'élargir les conditions environnementales sous lesquelles le contrôle biologique de ces agents est efficace et de réduire les coefficients de variation associés à chacun des agents. Enfin, la combinaison peut permettre d'utiliser moins d'ingrédients actifs que la quantité requise si chacun des agents étaient appliqués individuellement (Ericsson *et al.* 2007). De ce fait, l'impact sur les organismes non-ciblés peut être réduit (Mendez *et al.* 2002).

Plusieurs études ont rapporté des effets additifs ou synergiques issus de la combinaison d'agents entomopathogènes avec des insecticides (Anderson et Roberts 1983; Sanyang et Van Emden 1996; Kaakeh *et al.* 1997; Quintela et McCoy 1997; Hiromori et Nishigaki 1998; Pachamuthu et Kamble 2000) ou avec différents ennemis naturels (Barbercheck et Kaya 1990; Barbercheck et Kaya 1991; Koppenhöfer et Kaya 1997; Koppenhöfer *et al.* 1999; Choo *et al.* 2002). Également, le potentiel synergique du spinosad appliqué conjointement avec des pathogènes d'insectes a récemment été démontré. La combinaison de doses réduites de spinosad avec le nucléopolyhedrovirus multiple du légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda* Smith) a démontré un effet synergique sur

la mortalité de ce ravageur (Mendez *et al.* 2002). Ericsson *et al.* (2007) ont obtenu un effet synergique issu de la combinaison de doses sublétales de spinosad avec le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) (Ascomycota: Hypocreales) chez deux espèces de coléoptères, *Agriotes lineatus* Linn. et *Agriotes obscurus* Linn. À notre connaissance, aucune étude n'a examiné l'effet d'une combinaison *B. bassiana*-spinosad sur un insecte ravageur.

CHAPITRE 2. TOXICITÉ DU SPINOSAD ET D'UNE FORMULATION
COMMERCIALE DE *BEAUVERIA BASSIANA* SUR LES LARVES DE VER
GRIS

Toxicity of spinosad and *Beauveria bassiana* to the black cutworm, and the additivity of sublethal doses.

Gosselin, M-E^{1,2}, Bélair, G.¹, Simard, L.¹ and Brodeur, J.²

¹ Centre de recherche et de développement en horticulture de agriculture et agro-alimentaire
Canada, St-Jean-sur-Richelieu

² Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal, Montréal

The main objective of this study was to assess the susceptibility of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*) to the biopesticide spinosad and to a commercial formulation of *Beauveria bassiana*. We quantified the effects of sublethal doses of spinosad on a number of *A. ipsilon* fitness parameters, and interactions resulting from simultaneous applications of sublethal doses of spinosad and *B. bassiana*. Under laboratory conditions, *A. ipsilon* third instar larvae were highly susceptible to spinosad, with an estimated median lethal concentration (LC₅₀) of 50ppm. The entomopathogenic fungus, *B. bassiana* had a lower efficacy with an estimated LC₅₀ of 7 X 10⁷ spores/ml. Topical applications of 5ppm, 7.5ppm and 10ppm of spinosad on third instar larvae reduced larval size and increased time to pupation and to emergence. However, pupal and adult weights were not significantly different between treated and control individuals. Additivity was observed from most spinosad-*B. bassiana* combinations tested, thus indicating compatibility between products. We concluded that spinosad is a promising tool of controlling black cutworm larvae alone or in combination with other products.

Key words: *Agrotis ipsilon*, black cutworm, spinosad, *Beauveria bassiana*, additive interaction.

2.1 Introduction

Larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon* Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) are serious pest of many economic crops worldwide, including corn, tobacco, cotton, wheat and vegetables (Rings *et al.* 1975; Showers 1997). Black cutworm is also the most damaging species among all cutworms attacking turfgrasses on golf courses (Potter 1998). Larvae feed preferentially on creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) and annual bluegrass (*Poa annua* L.) on golf course putting greens, tees and fairways (Williamson and Potter 1997a; Vittum *et al.* 1999). In United States, the number of annual black cutworm generations varies latitudinally: five to six in Louisiana, three in Ohio and Missouri and two in New-York (Potter, 1998). In Ontario and Québec, Canada, the black cutworm presents two generations per year with an occasional third partial generation in south western Québec (Sears *et al.* 1996; Simard 2006). Because the tolerance for black cutworms is extremely low on golf courses, repeated applications of conventional synthetic insecticides is common. However, concerns over the deleterious effects of chemicals on environmental and human safety have provided a strong impetus for the development of bioinsecticides for use in integrated control of insect pests.

The biopesticide spinosad is a mixture of two naturally occurring macrocyclic lactone compounds, spinosyn A and spinosyn D, isolated during the fermentation of the soil bacterium *Saccharopolyspora spinosa* Mertz and Yao (Actinomycetales: Pseudonocardiales) (Thompson *et al.* 2000). Spinosad has a unique mode of action; acting primarily on the insect's nervous system at the nicotine acetylcholine receptor, and at the γ -aminobutyric acid (GABA) receptors (Watson 2001; Millar and Denholm 2007). Exposure causes cessation of feeding followed, approximately 24h later, by paralysis and death.

Spinosad is a stomach poison with some contact activity. It is effective on a range of arthropod pest species, mostly Lepidoptera, Diptera, Coleoptera and Thysanoptera (Sparks *et al.* 1999). Spinosad can provide good control of noctuids such as the cotton leafworm (*Spodoptera littoralis* Boisd.) (Pineda *et al.* 2004; Pineda *et al.* 2007) and the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith) (Mendez *et al.* 2002; Williams *et al.* 2004). Spinosad has been reported to have moderate toxicity to fish, very little toxicity to birds and mammals and relatively low toxicity to many insects natural enemies (Thompson *et al.* 2000). However, spinosad may be harmful to predators and hymenopteran parasitoids (Williams *et al.* 2003). It is classified by the United States Environmental Protection Agency as an environmentally and toxicologically reduced risk material. Different spinosad based products have been registered in more than 30 countries (Williams *et al.* 2004).

Entomopathogenic fungi have demonstrated considerable potential in microbial control of arthropods especially within integrated pest management (IPM) programs (Goettel *et al.* 2000). *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Criv.) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) is a ubiquitous fungus which has been isolated from infected insects both in temperate and tropical areas throughout the world (Zimmerman 2007). Infecting its hosts principally through the cuticle, *B. bassiana* has been recorded from over 200 species of insects in nine orders, mainly Lepidoptera and Coleoptera (Feng *et al.* 1994; Inglis *et al.* 2001). Several *B. bassiana* based products have been commercialized and, according to a review by Zimmerman (2007), this species should be considered as safe on the basis of actual knowledge on the biology, fate and behaviour in the environment, and effects on non-target organisms. Previous studies have documented the susceptibility of many noctuids species to *B. bassiana* (Barbercheck et Kaya 1991; Viji and Bhagat 2001; Filho *et al.* 2002). Of significance, Aly (2002) demonstrated the vulnerability of eggs and larvae of

the black cutworm to *B. bassiana*. Under optimal conditions, the host death occurs between 3 to 5 days. However, applications of entomopathogenic fungi, under field conditions, have not always provided consistent suppression of insect pests (Inglis *et al.* 2001). An array of abiotic and biotic factors may affect the ability of fungi to survive, propagate, infect and kill their hosts, including climatic conditions (solar radiation, temperature, humidity), microbial antagonist and host conditions (physiological and developmental stage, behaviour) (Goettel *et al.* 2000; Lacey *et al.* 2001).

Combined applications of entomopathogens and sublethal dosages of synthetic insecticides or other biological control agents have been proposed as a strategy to improve the efficacy of microbial agents (Anderson *et al.* 1989; Lacey *et al.* 2001). Such approach may use less of each active ingredient/organisms that would be required if they were to be applied individually and may reduce the variability of biological control (Guetsky *et al.* 2001; Ericsson *et al.* 2007). Control agents apply in combination may act synergistically, additively or antagonistically (Ferguson and Stiling 1996). Several studies reported additive or synergistic effects from the combination of entomopathogens, mostly fungi, with insecticides (Anderson and Roberts 1983; Sanyang and Van Emden 1996; Kaakeh *et al.* 1997; Quintela and McCoy 1997; Hiromori and Nishigaki 1998; Pachamuthu and Kamble, 2000) or with other insect natural enemies (Barbercheck and Kaya 1990; Barbercheck and Kaya 1991; Koppenhöfer and Kaya 1997; Koppenhöfer *et al.* 1999; Choo *et al.* 2002). For example, *B. bassiana* interacted with sublethal doses of imidaclopride to produce a synergistic response in Colorado potato beetle larval mortality (Furlong and Groden 2001). Mixtures of spinosad with insect pathogens demonstrated synergism when applied with *S. frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (Mendez *et al.* 2002) or with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) (Ascomycota: Hypocreales) (Ericsson *et al.* 2007).

We report the results of a study on the effectiveness of (1) a commercial preparation of spinosad (2) a commercial formulation of the GHA strain of *B. bassiana* and (3) the combined use of these two formulations, on mortality of third instar black cutworm larvae under laboratory conditions. As spinosad provided good control of black cutworm larvae comparatively to *B. bassiana* commercial formulation, and because sublethal effects may negatively impact insect fitness, we further quantified the consequences of spinosad sublethal exposure on a number of *A. ipsilon* developmental parameters (larval weight, head capsule width, time to pupation and to emergence, pupal weight and adult dry weight).

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Insects rearing

Agrotis ipsilon used in this study originated from a population infesting Larrimac golf course's nursery in August 2006 (Chelsea, Qc, Canada). All life stages were reared in a controlled environmental chamber at 24°C, 75% RH and under a photoperiod of 16:8 (L:D) h, standard conditions for all experiments. Adults were maintained in breeding cages (37 X 31 X 31cm) and were fed with a sweeten solution (Gatorade®, QTG Canada Inc., Peterborough, ON, Canada). Eggs were collected daily and transferred on artificial diet (Southland Products Inc., Lake Village, AR, U.S.A.) in 9cm diameter Petri dishes. Second instar larvae were transferred into individual plastic cup (Solo Cup Co., model P100) filled with artificial diet, until pupation.

2.2.2 Spinosad and *B. bassiana* formulations

Solutions of spinosad were prepared from a commercial formulation (Success 480 SC®) containing 480g/L of spinosad active ingredient (a.i.). Product label recommendation for control of *A. ipsilon* in turfgrass is 35ml/1000pi² (Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana, U.S.A.). For a nominal 1000-L ground spray application volume, this recommendation would represent a concentration of 1808mg/L or parts per million (ppm) spinosad. Consequently, we selected 1800ppm as being a representative concentration of a field application.

Solutions of the entomopathogenic fungus were prepared from a commercial formulation of the GHA strain of *B. bassiana* (Botanigard ES®) containing 2.1 X 10⁹ spores/ml (Laverlam Inc., Butte, MT, U.S.A.). In the United States, the label dose rate recommended for turf and ornamental insect control is 8 fluid ounces Botanigard ES® per

1000 square feet. This dose corresponds to a spore concentration of 1.78×10^5 conidia, when used in a 9cm Petri dish. Prior to all tests, ten plates of Sabouraud Dextrose Agar (SDA) were inoculated with the formulation to assess *B. bassiana* conidia viability. Petri dishes were incubated at 25°C in complete darkness for 48-72 h. Qualitative germination was determined by white mycelium presence covering media surface and was always > 90%.

2.2.3 Bioassays

In all tests, newly molted third instar larvae of *A. ipsilon* were placed in the center of a 9cm-diameter disposable Petri dish containing 2g of creeping bentgrass clippings (*Agrostis palustris* Hudson 'Alpha') (Gloco Inc., Anjou, Qc, Canada). Turfgrass was grown in peat moss growing medium (Pro-mix "Mycorise Pro"[®], Premier Tech Ltée., Rivière-du-Loup, Qc, Canada) in plastic containers and maintained in greenhouses at the Horticulture Research and Development Center (HRDC) (Agriculture and Agri-Food Canada, St-Jean-sur-Richelieu, Qc, Canada) for four weeks. The bottom and top of Petri dishes also contained two 10-cm-diameter Whatman No.2 filter papers that were moistened with distilled water. One millimeter of fungal or biopesticide solution was sprayed on larvae and clippings using a Potter tower (Annexe 2). Control larvae were treated with one ml of distilled water. Petri dishes were held, randomly, in an environment chamber. Treated leaves were removed 96 h later, and larvae were transferred in new Petri dishes covered with moist filter papers and provided *ad libitum* with untreated fresh turfgrass clippings.

Eight concentrations of spinosad (2000, 1000, 500, 100, 50, 10, 7.5 and 5ppm) and seven concentrations of *B. bassiana* (1×10^9 , 7.5×10^8 , 5×10^8 , 1.5×10^8 , 1×10^8 , 1×10^7 and 1×10^6 spores/ml) were tested. Twenty larvae per concentration were used.

Experiments were replicated three times with spinosad (3 X 20) and twice (2 X 20) with *B. bassiana*. Larval mortality was scored daily.

2.2.4 Effect of spinosad on fitness parameters

During experiments to determine lethal concentrations, surviving larvae treated with spinosad were weighed on a precision electronic balance and their head capsules measured under 7.5 X magnification every four days, until pupation, using an image analysis software (IMT iSolution Lite, version 6.5). Fresh turfgrass clippings were provided *ad libitum* and filter papers were moistened to maintain suitable humidity level. Development times from third instar to pupation and to adult emergence were monitored. Pupae were weighed 24 h after pupation. Following emergence, adults were collected and sexed. They were then killed, dried for two days at 122°F, and individually weighed on an a precision electronic balance.

2.2.5 Spinosad-*B. bassiana* interaction

To determine the nature of the interaction between spinosad and *B. bassiana* when used in combination, bioassays were performed as described above using mixtures of spinosad (3, 8 and 50ppm) and *B. bassiana* (7×10^6 , 1×10^7 , 7×10^7 and 8×10^8 spores/ml) in a 1ml solution. These concentrations were expected, based on previous bioassays, to cause 10, 20 and 50% mortality respectively. Fifteen to twenty larvae were treated with each product alone or in combination (spinosad + *B. bassiana*). Mortality was recorded daily during seven days and the experiment was repeated six times.

2.2.6 Statistical Analysis

Before analysis, all mortality data were corrected for mortality of control insects (Abbott 1925). Lethal concentration (LC) and lethal time (LT) data were analysed using PROC PROBIT (SAS Institute Inc., 2006), and significant differences between treatments were identified using 95% confidence intervals (Tabashnick and Cushing 1987). For spinosad treatments, differences in larval weight and head capsule width were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA). When data were not normally distributed, they were transformed using square root or exponent ($e^{(x)}$). Differences in pupal weight, adult dry weight, time to pupation and time to emergence of males and females were analysed using two-way ANOVAs. Following significant differences between concentrations ($P < 0.05$), means were compared using Tukey's HSD tests. All statistical analyses were performed using JMP IN statistical software version 5.1 (SAS Institute, Inc., 2003).

The type of interactions between spinosad and *B. bassiana* was determined using the procedure described by Finney (1964) and modified by McVay et al (1977) and Salama et al. (1984). The expected additive proportional mortality M_E for the spinosad-*B. bassiana* combinations was calculated by $M_E = M_S + M_B(1 - M_S)$, where M_S and M_B are the observed proportional mortalities caused by spinosad and *B. bassiana* solutions alone, respectively. The expected value was then converted into percentage mortality (Mnf_E). Results from a chi-square test, $\chi^2 = (M_{SB} - M_E)^2 / Mnf_E$, where M_{SB} is the observed mortality for the spinosad-*B. bassiana* formulation combinations, were compared to the expected chi-square value for 1 *df*. If the calculated χ^2 value exceeded the table value, a nonadditive effect, (synergistic or antagonistic) was identified (Finney, 1964); if the difference $M_{SB} - M_E = D$

had a positive value, the interaction was considered synergistic, and if D had a negative value, the interaction was considered antagonistic. In contrast, if the tabular value exceeded calculated chi-square value, then an additive effect was recorded.

2.3 Results

2.3.1 Lethal concentrations and lethal times

Third instar larvae of *A. ipsilon* were susceptible to spinosad and to the *B. bassiana* commercial formulation (Table I, Figures 2.1 and 2.2). Significant concentration-mortality data from probit regression analysis were used to estimate the spinosad LC₁₀ (3ppm), LC₂₀ (8ppm) and LC₅₀ (50ppm) and the *B. bassiana* LC₁₀ (7×10^6 spores/ml), LC₂₀ (1×10^7 spores/ml) and LC₅₀ (7×10^7 spores/ml) on day 4 (Table I). With both products, there was no significant difference in lethal concentrations from day 4 to day 7 post-inoculation (data not shown).

Table I. Lethal concentration values (LC) of third instar larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*) exposed to spinosad (ppm) and *Beauveria bassiana* (10^6 spores/ml) on day 4 post inoculation.

| | LC ₅₀ (FL) ^a | LC ₂₀ (FL) | LC ₁₀ (FL) | Intercept ±SE ^b | Slope±SE | χ ² ^c | P |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------|-----------------------------|---------|
| Spinosad | 47.88 (32.18-69.72) | 7.87 (4.09-12.81) | 3.06 (1.31-5.60) | -1.80±0.21 | 1.07±0.10 | 105.95 | <0.0001 |
| | LC ₅₀ (FL) | LC ₂₀ (FL) | LC ₁₀ (FL) | Intercept ±SE | Slope±SE | χ ² | P |
| <i>B. bassiana</i> | 69.49 (43.76-94.41) | 14.70 (5.76-26.10) | 6.53 (1.97-1.36) | -11.84±1.53 | 1.52±0.18 | 68.12 | <0.0001 |

a 95% fiducial limits (FL)

b SE, standard- error

c Pearson Chi-square of the slope

For both products, lethal times were concentration-dependant, larvae dying earlier in treatments with higher concentrations of spinosad or *B. bassiana* conidia than in those with lower concentrations (Figures 2.1 and 2.2). For spinosad, differences in LT₅₀ were significant ($P < 0.05$) between low (5, 7.5 and 10ppm), medium (50 and 100ppm) and high concentrations (500, 1000 and 2000ppm) (Figure 2.1). There was no significant difference in LT₅₀ ($P < 0.05$) between *B. bassiana* formulation concentrations of 1×10^8 spores/ml to 1×10^9 spores/ml (Figure 2.2).

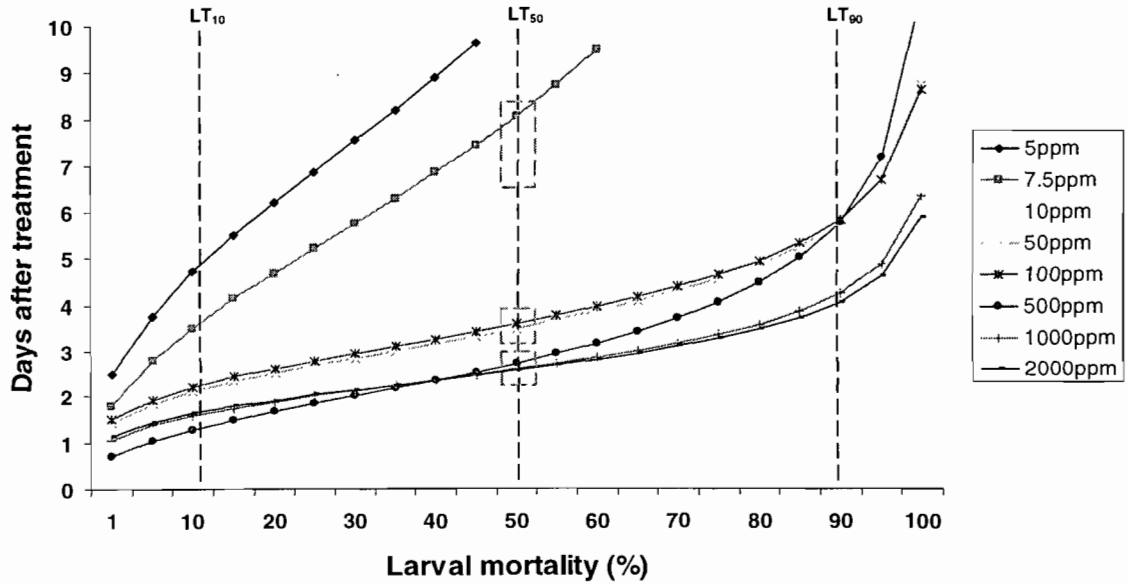


Figure 2.1 Lethal times of third instar larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*) exposed to spinosad (ppm). LT₅₀ values within the same rectangle are not significantly different based on their 95% confidence intervals.

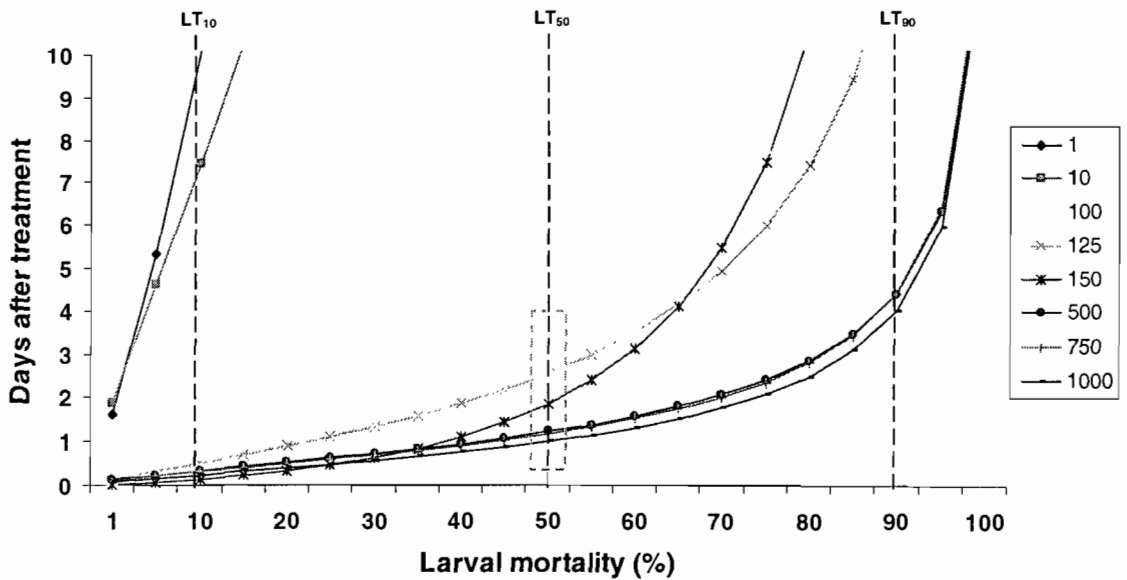


Figure 2.2 Lethal time of third instar larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*) exposed to *B. bassiana* commercial formulation ($\times 10^6$ spores/ml). LT₅₀ values within the same rectangle are not significantly different based on their 95% confidence intervals.

2.3.2 Effect of spinosad on fitness parameters

Sublethal concentrations of spinosad significantly reduced mean *A. ipsilon* weight over time (Table II, Figure 2.3). Control larvae exposed to untreated turfgrass clippings gained more weight than larvae exposed to spinosad after 4 and 8 days. However, after 16 days, this pattern was only significant for larvae treated with 10ppm of spinosad.

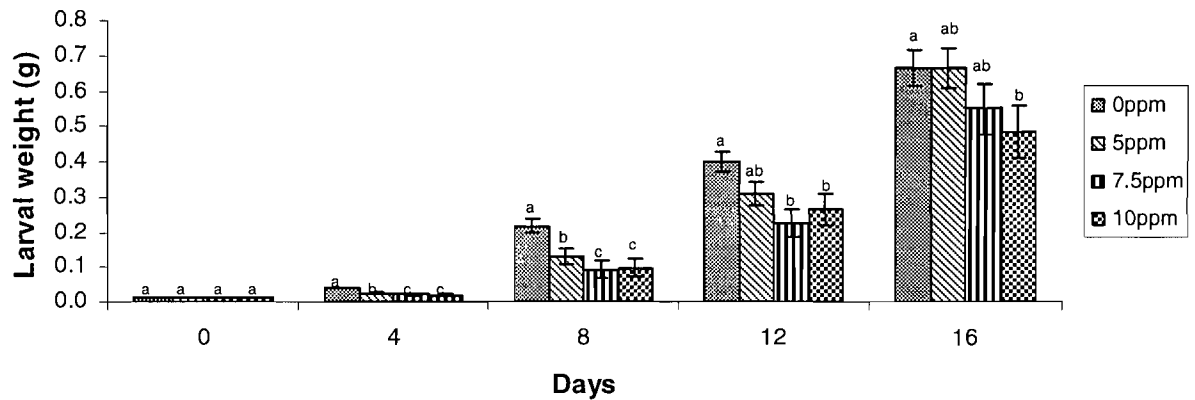


Figure 2.3 Weight (g; $\bar{x} \pm SE$) of black cutworm (*Agrotis ipsilon*) larvae which survived treatments with different concentrations of spinosad. For each day, different letters over bars indicate significant differences between treatments ($\alpha = 0.05$).

Table II. The effect of spinosad sublethal concentrations on larval weight of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*), analysed using one-way ANOVAs.

| Days after treatment | Source | F | df | P |
|----------------------|-----------------------|-------|----|--------|
| 0 | Block | 5.29 | 1 | 0.0230 |
| | Concentration | 0.31 | 3 | 0.8158 |
| | Concentration X Block | 2.58 | 3 | 0.0563 |
| 4 | Block | 25.03 | 1 | <.0001 |
| | Concentration | 21.94 | 3 | <.0001 |
| | Concentration X Block | 7.14 | 3 | 0.0002 |
| 8 | Block | 19.35 | 1 | <.0001 |
| | Concentration | 15.52 | 3 | <.0001 |
| | Concentration X Block | 2.39 | 3 | 0.0743 |
| 12 | Block | 18.41 | 1 | <.0001 |
| | Concentration | 8.66 | 3 | <.0001 |
| | Concentration X Block | 2.96 | 3 | 0.0360 |
| 16 | Block | 17.60 | 1 | <.0001 |
| | Concentration | 3.68 | 3 | 0.0152 |
| | Concentration X Block | 1.80 | 3 | 0.1530 |

The head capsule width of larvae exposed to 7.5ppm and 10ppm of spinosad were smaller than those of control larvae on days 8, 12 and 16 after treatment (Table III, Figure 2.4).

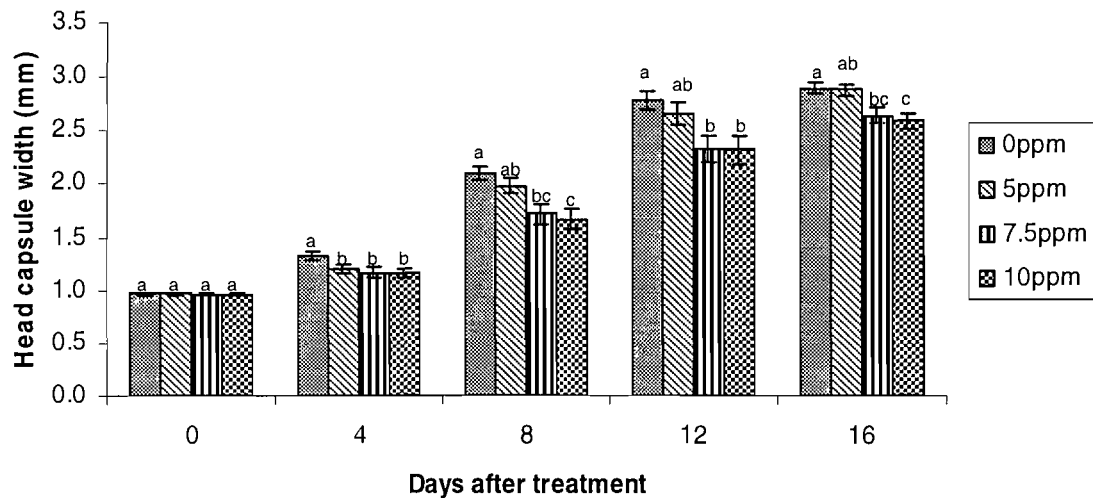


Figure 2.4 Head capsule width (mm; $\bar{x} \pm SE$) of black cutworm (*Agrotis ipsilon*) larvae treated with different concentrations of spinosad. For each day, different letters over bars indicate significant differences between treatments ($\alpha = 0.05$)

Table III. The effect of spinosad sublethal concentrations on head capsule width of larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*), using one-way ANOVAs.

| Days after treatment | Source | F | df | P |
|----------------------|-----------------------|-------|----|--------|
| 0 | Block | 24.23 | 1 | <.0001 |
| | Concentration | 0.58 | 3 | 0.6262 |
| | Concentration X Block | 0.10 | 3 | 0.9589 |
| 4 | Block | 11.24 | 1 | 0.0010 |
| | Concentration | 4.60 | 3 | 0.0043 |
| | Concentration X Block | 1.65 | 3 | 0.1799 |
| 8 | Block | 3.53 | 1 | 0.0633 |
| | Concentration | 8.81 | 3 | <.0001 |
| | Concentration X Block | 1.43 | 3 | 0.2381 |
| 12 | Block | 2.32 | 1 | 0.1311 |
| | Concentration | 5.75 | 3 | 0.0012 |
| | Concentration X Block | 1.00 | 3 | 0.3937 |
| 16 | Block | 0.24 | 1 | 0.6237 |
| | Concentration | 6.83 | 3 | 0.0004 |
| | Concentration X Block | 1.23 | 3 | 0.3032 |

Larval development time from third instar to pupation was similar for both sex when third instar larvae were treated with any given sublethal concentrations, but was

significantly different among concentrations (Sex: $F = 0.031$, $df = 1$, $P = 0.86$; Concentrations: $F = 10.99$, $df = 2$, $P = <0.001$; Sex X Concentration: $F = 0.70$, $df = 2$, $P = 0.50$, Figure 2.5). Development time to pupation was longer for larvae exposed to 5ppm or 10ppm of spinosad. Similar results are observed when pupation time is included to the analysis (Sex: $F = 0.056$, $df = 1$, $P = 0.813$; Concentrations: $F = 10.27$, $df = 2$, $P = <0.001$; Sex X Concentration: $F = 0.67$, $df = 2$, $P = 0.51$, Figure 2.5).

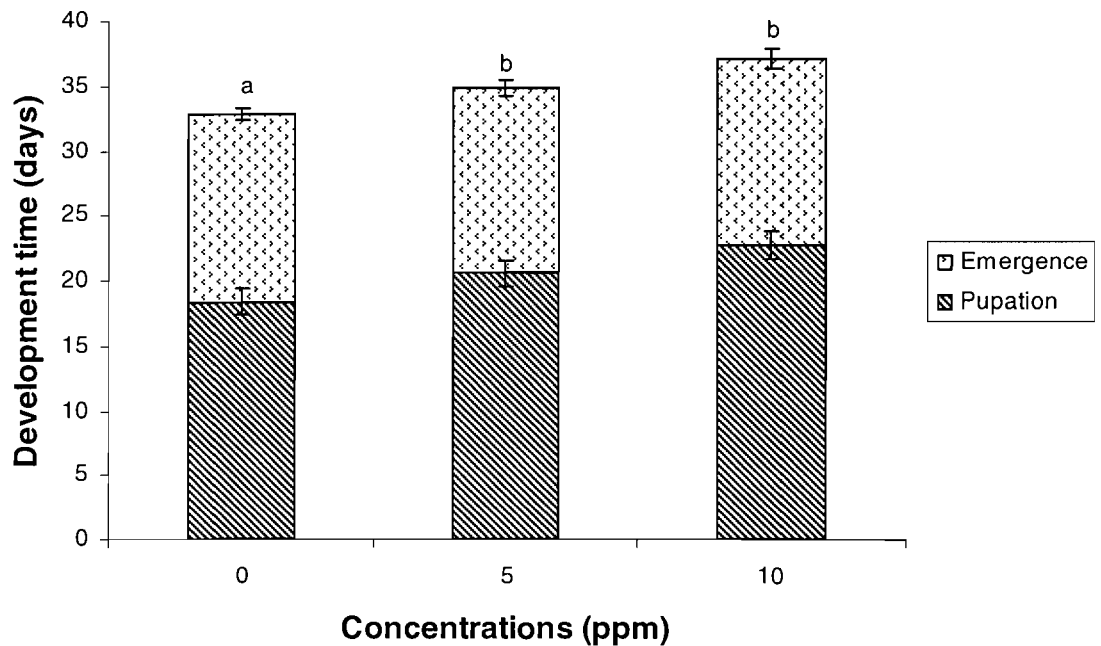


Figure 2.5 Time to pupation and to emergence (d; $\bar{x} \pm SE$) of third instar larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*) treated with two sublethal concentrations of spinosad. Bars with the same letters indicate that means (total time) are not significantly different ($\alpha = 0.05$)

Pupal and adult weights were similar for individuals exposed to spinosad treatments (Pupa; Concentrations: $F = 1.645$, $df = 2$, $P = 0.199$; Adult; Concentrations: $F = 0.074$, $df =$

2, $P = 0.929$), but females were heavier than males (Pupa; Sex: $F = 4.90$, $df = 1$, $P = 0.029$; Adult; Sex: $F = 12.70$, $df = 1$, $P = 0.0006$).

2.3.3 Spinosad-*B. bassiana* interaction

Seven days after treatments, spinosad concentrations of 3, 8 and 50ppm a.i. caused 10.2 to 66.5% mortality of *A. ipsilon* larvae in agreement with the mortality observed in previous tests. Similarly, *B. bassiana* concentrations of 7×10^6 , 1×10^7 , 7×10^7 and 8×10^8 spores/ml caused 8.0 to 88.1% mortality as observed previously.

For most combinations, we observed an additive interaction between *B. bassiana* and spinosad (Table IV). *B. bassiana* at concentrations of 7×10^7 spores/ml (LC_{50}) and 8×10^8 spores/ml (LC_{90}) mixed with different concentrations of spinosad caused *A. ipsilon* mortality varying from 47.5% to 100%. These results were similar to expected mortality, indicating additive effects. However, an antagonistic effects was observed when 7×10^6 spores/ml (LC_{10}) of *B. bassiana* was combined with 8ppm (LC_{20}) of spinosad. Finally, the treatment combining 1×10^7 spores/ml (LC_{20}) of *B. bassiana* and 50ppm a.i. (LC_{50}) of spinosad resulted in a greater mortality (93.5%) than the expected mortality (73.5%) on days 6 and 7, indicating synergism ($D: 20.01\%$). LT_{50} estimated from *B. bassiana*-spinosad combinations are reported in Annexe 1.

Table IV. Antagonistic, additive or synergistic interactions when spinosad and *Beauveria bassiana* are used in combination for treatment of third instar larvae of the black cutworm (*Agrotis ipsilon*).

| Treatment concentrations | | Time ^a (days) | Spinosad | <i>B. bassiana</i> product | Mortality (%) | | χ^2 ^b | Interaction ^c |
|--------------------------|---|-----------------------------|----------|-------------------------------|---------------|----------|-----------------------|--------------------------|
| Spinosad (ppm) | <i>B. bassiana</i> ($\times 10^6$ spores ml ⁻¹) | | | | Expected | Observed | | |
| 50 | 7 | 4 | 68.7 | 10.1 | 71.8 | 67.7 | 0.24 | Add. |
| | | 5 | 68.7 | 11.1 | 72.2 | 75.8 | 0.18 | Add. |
| | | 6 | 67.6 | 9.1 | 70.6 | 79.1 | 1.04 | Add. |
| | | 7 | 66.5 | 8.0 | 69.1 | 79.4 | 1.53 | Add. |
| 8 | 7 | 4 | 40.4 | 10.1 | 46.4 | 23.2 | 11.59* | Antag. |
| | | 5 | 41.4 | 11.1 | 47.9 | 25.3 | 10.72* | Antag. |
| | | 6 | 40.4 | 9.1 | 45.9 | 28.9 | 6.24* | Antag. |
| | | 7 | 38.3 | 8.0 | 43.3 | 28.6 | 4.98* | Antag. |
| 3 | 7 | 4 | 7.1 | 10.1 | 16.5 | 13.1 | 0.67 | Add. |
| | | 5 | 11.1 | 11.1 | 21.0 | 16.2 | 1.11 | Add. |
| | | 6 | 11.2 | 9.1 | 19.3 | 13.3 | 1.86 | Add. |
| | | 7 | 10.2 | 8.0 | 17.4 | 11.3 | 2.15 | Add. |
| 50 | 10 | 4 | 68.7 | 25.3 | 76.6 | 88.9 | 1.97 | Add. |
| | | 5 | 68.7 | 25.3 | 76.6 | 92.9 | 3.48 | Add. |
| | | 6 | 67.6 | 23.7 | 75.3 | 93.7 | 4.52* | Synerg. |
| | | 7 | 66.5 | 21.0 | 73.5 | 93.5 | 5.45* | Synerg. |
| 8 | 10 | 4 | 40.4 | 25.3 | 55.5 | 43.4 | 2.61 | Add. |
| | | 5 | 41.4 | 25.3 | 56.2 | 49.5 | 0.80 | Add. |
| | | 6 | 40.4 | 23.7 | 54.6 | 54.0 | 0.01 | Add. |
| | | 7 | 38.3 | 21.0 | 51.3 | 54.5 | 0.21 | Add. |
| 3 | 10 | 4 | 7.1 | 25.3 | 30.5 | 16.2 | 6.77* | Antag. |
| | | 5 | 11.1 | 25.3 | 33.6 | 19.2 | 6.15* | Antag. |
| | | 6 | 11.2 | 23.7 | 32.2 | 27.9 | 0.59 | Add. |
| | | 7 | 10.2 | 21.0 | 29.0 | 25.3 | 0.47 | Add. |
| 50 | 70 | 4 | 68.7 | 42.4 | 82.0 | 97.0 | 2.74 | Add. |
| | | 5 | 68.7 | 48.5 | 83.9 | 100.0 | 3.10 | Add. |
| | | 6 | 67.6 | 47.8 | 83.1 | 100.0 | 3.45 | Add. |
| | | 7 | 66.5 | 53.5 | 84.4 | 100.0 | 2.89 | Add. |
| 8 | 70 | 4 | 40.4 | 42.4 | 65.7 | 60.6 | 0.39 | Add. |
| | | 5 | 41.4 | 48.5 | 69.8 | 62.6 | 0.74 | Add. |
| | | 6 | 40.4 | 47.8 | 68.9 | 68.7 | 0.00 | Add. |
| | | 7 | 38.3 | 53.5 | 71.3 | 67.5 | 0.20 | Add. |
| 3 | 70 | 4 | 7.1 | 42.4 | 46.5 | 47.5 | 0.02 | Add. |
| | | 5 | 11.1 | 48.5 | 54.2 | 49.5 | 0.41 | Add. |
| | | 6 | 11.2 | 47.8 | 53.6 | 55.1 | 0.04 | Add. |
| | | 7 | 10.2 | 53.5 | 58.2 | 53.5 | 0.39 | Add. |
| 8 | 800 | 4 | 40.4 | 84.4 | 90.7 | 97.8 | 0.55 | Add. |
| | | 5 | 41.4 | 88.9 | 93.5 | 97.8 | 0.20 | Add. |
| | | 6 | 40.4 | 88.5 | 93.2 | 97.7 | 0.22 | Add. |
| | | 7 | 38.3 | 88.1 | 92.7 | 97.6 | 0.27 | Add. |
| 3 | 800 | 4 | 7.1 | 84.4 | 85.5 | 100.0 | 2.44 | Add. |
| | | 5 | 11.1 | 88.9 | 90.1 | 100.0 | 1.08 | Add. |
| | | 6 | 11.2 | 88.5 | 89.8 | 100.0 | 1.16 | Add. |
| | | 7 | 10.2 | 88.1 | 89.3 | 100.0 | 1.28 | Add. |

^a Days from inoculation time

^b Chi-square comparisons exceeding 3.84, df=1 and $\alpha=0.05$, are considered non-additive

^c *B. bassiana*-spinosad interaction classified as antagonistic, additive or synergistic

Standard errors not shown in order to lighten the table

2.4 Discussion

2.4.1 Lethal concentrations and lethal times

Our results show that third instar larvae of *A. ipsilon* are susceptible to topical applications of either spinosad or a commercial formulation of *B. bassiana* under laboratory conditions, spinosad being most likely to provide effective control of black cutworm populations when using economical doses.

At a concentration of 50ppm a.i. (95% fiducial limits: 32-70ppm), the 4-day LC₅₀ value estimated for spinosad under laboratory conditions corresponds to a dose much lower than the recommended rates of Conserve SC[®] for *A. ipsilon* in turfgrass, at a spraying volume of 1000L (1800ppm a.i.). Our LC₅₀ value is within the range of one previously published study as Mendez *et al.* (2002) estimated that, under laboratory conditions, LC₅₀ of spinosad for larvae of another noctuid species, *S. frugiperda*, was 3ppm a.i. while the label recommended a concentration of 200ppm, in the field. In addition, mortality of black cutworm occurred rapidly when larvae were exposed to doses of 50ppm a.i. and higher of spinosad, attaining approximately 50% within three days. Such a pattern concurs with the mode of action of spinosyns. Following contamination, the insect central nervous system is perturbed, leading to involuntary muscle contractions (Salgado 1998; Salgado *et al.* 1998). The insects then stop feeding, 4 to 24 hours after inoculation, depending on doses, and prostrate (Salgado and Sparks 2005). Subsequently, the insects suffer from tremors and paralysis prior to death. Spinosad activity is usually slower than synthetic insecticides but more rapid than most entomopathogens (Bret *et al.* 1997). We frequently observed that larvae inoculated with doses of 50ppm of spinosad and over turned black and laid down within the first 24 hours.

Relatively high doses of the GHA strain of *B. bassiana* were required to obtain consistent mortality of *A. ipsilon* with an estimated LC₅₀ value of ca. 7×10^7 spores/ml. Published lethal concentrations of *B. bassiana* towards noctuid larvae are highly variable. Aly (2002) reported LC₅₀ values of 2.01×10^3 spores/ml and 4.74×10^3 spores/ml for *A. ipsilon* eggs and second instar larvae, respectively. Nguyen *et al.* (2007) reported median lethal concentrations of 1.5×10^5 conidia ml⁻¹ for *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. Similarly, great variability is observed when results are reported in terms of percent mortality. Hicks *et al.* (2001) observed over 80% mortality for the noctuid *Panolis flammea* Dennis & Schiffermüller when treated with *B. bassiana* at a concentration of 4.8×10^5 spores/ml. Filho *et al.* (2002) reported mortality over 60% for the cotton leafworm *Alabama argillacea* (Hübner) larvae exposed to a *B. bassiana* concentration of 1×10^8 conidia ml⁻¹. Susceptibility of insect hosts to entomopathogenic fungi varies greatly with host species, host physiological conditions, and fungus isolates (Feng *et al.* 1994; Inglis *et al.* 2001). Variability can also be associated to variation in conidia viability in our experiences, as preliminary tests were conducted to assure their presence instead of a viability proportion.

Under optimal conditions, insects infected by entomopathogenic fungi usually die 3 to 5 days following application (Inglis *et al.* 2001). However, in our study, black cutworm larvae died rapidly when infected with the commercial formulation of *B. bassiana* at concentrations higher than 1×10^8 spores/ml. LT₅₀ values ranging from 1 to 2.92 days suggest that the fungus carrier influence in some way the susceptibility of the host to the pathogen. Bioassays conducted with spores are required to determine the actual virulence of GHA strain of *B. bassiana* towards black cutworm larvae.

In the United States, the label dose rate recommended for turf and ornamental insect control is 8 fluid ounces Botanigard ES[®] per 1000 square feet, which correspond to a spore concentration of 1.78×10^5 conidia, when used in a 9cm Petri dish. Under our laboratory conditions, the LC₅₀ value obtained for the tested commercial formulation of the GHA strain of *B. bassiana* is well over this recommendation, suggesting that this biopesticide is not an economic control method for the black cutworm.

2.4.2 Effect of spinosad on fitness parameters

Pesticide sublethal effects contribute to reduce population growth of arthropod pests. In our study, we observed a reduced weight gain during larval development of *A. ipsilon* treated with low doses of spinosad. Similar effects have been reported for other noctuid species. A decrease in weight of third and fifth instars larvae of *Spodoptera exigua* exposed to sublethal doses of spinosad has been observed, as well as a decrease in the consumption rate and feeding duration (Yee and Toscano 1998). Pineda *et al.* (2006) observed a significant reduction of growth when neonate larvae of *Spodoptera littoralis* were fed with sublethal doses of spinosad mixed into a diet. In this instance, insects paralyzed by spinosad ceased feeding. Ericsson *et al.* (2007) also demonstrated a dose-dependent reduction in feeding activity of larvae of the wireworms *Agriotes lineatus* (L.) and *Agriotes obscurus* L. after exposure to spinosad.

Black cutworm larvae appear to have the capacity to recover from the initial detrimental effects of exposure to sublethal doses of spinosad. Sixteen days after inoculation, larvae treated with 5ppm or 7.5ppm of spinosad were similar in weight as control larvae, in contrast with previous days. A similar pattern was observed with head

capsule width. Furthermore, no significant differences in pupal and adult weight have been observed between control larvae and those treated with 5ppm or 10ppm of spinosad. The mechanisms involved in the observed weight recovery of *A. ipsilon* larvae exposed to sublethal doses of spinosad, and the potential long term consequences on the insect fitness warrant further consideration. Wanner *et al.* (2000) studied the knockdown effect of spinosad on the gypsy moth (*Lymantria dispar*) and demonstrated a possible paralysis recovery. They established that surface contact exposure to spinosad generates a dose-dependent development of paralysis in second instar larvae and that some temporary recovery can occur at low doses when the insect can feed. In our study, black cutworm larvae have been exposed during four days to contaminated turfgrass clippings after which new insecticide-free clippings have been provided *ad libitum* until complete development. Pineda *et al.* (2007) showed detrimental effects of spinosad on reproduction of *S. littoralis*. They hypothesized that reduction in fecundity and fertility may be due to the costs of fighting neurotoxic effects which involves the transfer of energy reserves.

2.4.3 Spinosad-*B. bassiana* interaction

Our results indicate that combinations of spinosad and the *B. bassiana* commercial formulation mostly resulted in additive mortality. Combinations tested are not likely to improve mortality of *A. ipsilon* larvae beyond what is expected from single application of spinosad. Thus, we suggest that spinosad alone should be used on black cutworm larvae in the field. In the United States, spinosad has provided significant reductions of third, fourth, fifth and sixth instars black cutworm larvae on golf greens (Shetlar *et al.* 1997; Heller et Walker; 1998, Sheltar *et al.* 1998; Swier *et al.* 1998). Our findings suggest that black cutworm larvae control can be achieved, under optimal conditions, with lower doses of

spinosad when compared to field recommended rate of 1800ppm. If similar results applied to the field situation, the use of low doses would not only reduce the cost of treatment but also the negative impact on non-target species. In a maize field trial, spinosad applied at 3ppm showed very little adverse effects on the abundance of insect natural enemies whereas application of the product label recommended rate of 200ppm had effects similar to those of the pesticide chlorpyrifos (Mendez *et al.* 2002).

Spinosad is compatible with the *B. bassiana* commercial formulation as shown by the additive effects observed in our study. Formulated conidia of *B. bassiana*'s GHA strain can be compatible with chemical insecticides (Delgado *et al.* 1999) and negative impact of spinosad on entomopathogens has rarely been reported. Ericsson *et al.* (2007) observed a significant decrease in the mean growth rate of *M. anisopliae* when spinosad concentrations were 192ppm or higher, doses that are greatly over the rates generating synergism in their study. In contrast, Kabaluk and Ericsson (2007) showed that *M. anisopliae* colony growth was unaffected by the presence of spinosad in the culture. Spinosad displays no antifungal, antibacterial or antiviral activity (Bret *et al.* 1997). Recent findings indicate emergent resistance to spinosad in lepidopteran pests, as a consequence of repeated and intensive exposure (Moulton *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2002). Therefore, combination of spinosad with other entomopathogens could prevent resistance development of insect pest. Theoretically, under certain conditions, mixtures can delay the development of resistance more effectively than sequences or rotations of insecticides (Denholm and Rowland 1992).

2.5 Acknowledgments

The authors thank Yvon Fournier, Nathalie Dauphinais, Élisabeth Taschereau, Nicolas Turgeon, Stéphan Campagnaro, Jonathan Roy, Émilie Hamon and Émilie Messier for dedicated technical assistance and Stéphane Daigle for statistical advices. The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Golf Superintendents Association, the Coalition for Responsible Golf and the Canadian Turfgrass Research Foundation provided financial support for this project.

Conclusion générale

Des deux agents de contrôle étudiés lors de ce projet de recherche, le spinosad retient particulièrement l'attention quant à son potentiel de répression des populations de ver gris. Nos résultats démontrent la grande susceptibilité des larves de troisième stade exposées au spinosad. La démonstration au champ de l'efficacité de ce biopesticide et son homologation au Canada pour le ver gris signifieraient la venue d'un nouvel outil pouvant s'insérer aisément dans un programme de lutte intégrée sur les terrains de golf du Québec. Actuellement, le spinosad est commercialisé au Canada, dans le but de contrôler des espèces autres que le ver gris, et est reconnu en tant que biopesticide à risques réduits par l'Agence de réglementation de lutte antiparasitaire (ARLA, 2008). Cependant, il importe de surveiller étroitement les effets de l'utilisation de ce produit. L'étude de l'impact du spinosad, à court, moyen et long terme, réalisée en tenant compte de la régie d'entretien des terrains de golf et de ses composantes environnementales spécifiques, permettra de reconnaître et de minimiser les conséquences potentiellement néfastes de ce produit sur les espèces non ciblées. Nos résultats ont également démontré que des doses sublétales de spinosad peuvent modifier certains paramètres d'aptitude biologique (« fitness ») du ver gris tels le gain de poids, la croissance corporelle et le temps de développement. Des études complémentaires portant sur l'alimentation des larves de ver gris et les capacités de reproduction des adultes permettraient de déterminer l'impact réel des effets sublétaux du spinosad sur la dynamique des populations de ver gris.

Nos résultats démontrent par ailleurs que le champignon entomopathogène *B. bassiana* (souche GHA) offre un faible potentiel de contrôle du ver gris de troisième stade

larvaire. Les concentrations requises afin d'obtenir des taux de mortalité satisfaisants sont très élevées par rapport aux doses recommandées en champ aux États-Unis. De ce fait, l'utilisation du Botanigard ES[®] sur le troisième stade larvaire du ver gris ne semble pas rentable d'un point de vue économique. Cependant, notre étude confirme que ce ravageur peut être infecté par *B. bassiana*. L'application simultanée de doses de spinosad et de *B. bassiana*, lors de cette présente étude, visait, entre autres, à diminuer les mécanismes de défense du ver gris dans le but d'améliorer l'efficacité du champignon entomopathogène. Par contre, bien que les résultats aient démontré la compatibilité des deux produits, l'effet synergique escompté sur la mortalité des larves n'a pas été observé. Dès lors, il semble primordial de s'attarder à l'étude du mécanisme provoquant la synergie issue de la combinaison d'agents de contrôle afin d'arrimer ces résultats avec les connaissances sur les mécanismes de défenses de l'hôte visé. Selon nous, les avantages mêmes pouvant découler de l'action conjointe de deux ou plusieurs agents de contrôle justifient amplement la poursuite des études sur la combinaison. Ceux-ci se traduisent notamment par l'amélioration et l'encouragement de l'utilisation de champignons entomopathogènes comme agents de lutte biologique, la réduction de la quantité de chacun des produits à appliquer, le retardement ou l'évitement du développement de résistance chez les insectes ciblés ou encore l'élargissement des conditions environnementales dans lesquelles les agents sont efficaces lorsque appliqués seuls.

L'hypothèse principale de ce projet d'étude supposait que le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* ainsi que le biopesticide spinosad, appliqués seuls ou en combinaison, sont efficaces pour le contrôle du ver gris. À la lumière de nos résultats, seules les doses de spinosad testées en laboratoire s'avèrent efficaces pour le contrôle du ver gris.

En bref, le but ultime de ce projet de recherche était d'identifier des méthodes de contrôle alternatives aux pesticides de synthèse sur le ver gris afin de les insérer rapidement dans les systèmes de lutte intégrée prenant place ces dernières années dans la régie d'entretien des terrains de golf au Québec. Les résultats positifs obtenus avec le spinosad permettent de conclure que la première partie de cet objectif est atteinte. L'apport de travaux supplémentaires permettra de vérifier les possibilités de l'utilisation du spinosad sur le ver gris en champ et ultimement de permettre l'intégration du produit par les surintendants de terrains de golf. Notre étude souligne également de nouveaux horizons à exploiter en ce qui a trait à l'amélioration des méthodes de contrôle biologique des ravageurs, lesquels engendrent parfois des résultats inconstants. Il importe, à la lumière d'un passé accablant où la surutilisation des composés de synthèse a engendré le développement rapide de résistance chez les organismes ciblés ainsi que des effets délétères sur la santé environnementale et humaine, de chercher à gérer de façon durable et intelligente les outils de contrôle actuels et à venir et de prévoir les effets de leur utilisation à court, moyen et long terme. À l'aube d'un désastre écologique planétaire, il n'y a plus de temps à perdre et l'humain se doit de se préoccuper de la santé environnementale des milieux qu'il exploite en y incluant l'ensemble de ses composantes, et plus encore.

Bibliographie

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. 2008. Information sur les produits. http://pr-rp.pmra-arla.gc.ca/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL (page consultée le 13 avril 2008).
- Aly, S.H. 2002. Susceptibility of different stages of the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera, Noctuidae) to the infection with the fungus, *Beauveria bassiana*. *Assiut Journal of Agricultural Science* 33: 177-186.
- Anderson, T.E., Roberts, D.W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology* 76: 1437-1441.
- Anderson, T.E., Hajek, A.E., Roberts, D.W., Priesler, H.K., Robertson, J.L. 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82: 83-89.
- Arthurs, S.P., Lacey, L.A., Miliczky, E.R. 2007. Evaluation of the codling moth granulovirus and spinosad for codling moth control and impact on non-target species in pear orchards. *Biological Control* 41: 99-109.
- Baur, M.E., Kaya, H.K., Tabashnik, B.E. 1997. Efficacy of a dehydrated Steinernematid nematode against black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 1200-1206.
- Barbercheck, M.E., Kaya, H.K. 1990. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 55: 225-234.
- Barbercheck, M.E., Kaya, H.K. 1991. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 20: 707-712.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* 2: 39-47.
- Boughton, A.J., Harrison, R.L., Lewis, L.C., Bonning, B.C. 1999. Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 289-294.

- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P. 1988. Non-specific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1795-1805.
- Bret, B.L., Larson, L.L., Schoonover, J.R., Sparks, T.C., Thompson, G.D. 1997. Biological properties of Spinosad. *Down to Earth* 52 : 6-13.
- Butt, T.M., Goettel, M.S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. In: *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (eds A. Navon and K.R.S. Ascher) pp141-191.
- Capinera, J.L., Pelissier, D., Menout, G.S., Epsky, N.D. 1988. Control of black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera : Noctuidae), with entomogenous nematodes (Nematoda :Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52 : 427-435.
- Cherry, A.J., Banito, A., Djegui, D., Lomer, C. 2004. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. *International Journal of Pest Management* 50: 67-73.
- Choo, H., Kaya, H.K., Huh, J., Lee, D.W., Kim, H.H., Lee, S.M., Choo, Y.M. 2002. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. *Biocontrol* 47: 177-192.
- Cleveland, C.B., Mayes, M.A., Cryer, S.A. 2001. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Management Science* 58: 70-84.
- Cleveland, C.B., Bormett, G.A., Saunders, D.G., Powers, F.L., McGibbon, A.S., Reeves, G.L., Rutherford, L., Balcer, J.L. 2002. Environmental fate of spinosad: Dissipation and degradation in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3244-3256.
- Cloutier, C., Cloutier, C. 1992. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. Dans : *La lutte biologique*, Tech & Doc Lavoisier (Vincent, C., Coderre, D.) 671p.
- Cossentine, J.E., Lewis, L.C. 1986. Studies on *Bonnetia comta* (Diptera : Tachinidae) parasitizing *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera : Noctuidae) larvae. *Biocontrol* 31 : 323-330.
- Delgado, F.X., Britton, J.H., Onsager, J.A., Swearingen, W. 1999. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savana grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 34-39.

- Denholm, I., Rowland, M.W. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and Practice. *Annual Review of Entomology* 37: 91-112.
- De Maagd, R. A., Weemen-Hendriks, M., Molthoff, J. W., Naimov, S. 2003. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Archives of Microbiology* 179: 363-367.
- Dow Agrosiences. 2001. Spinosad Technical Bulletin. Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, IN.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., Ampong-Nyarko, K. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol and Science Technology* 9: 177-185.
- Ericsson, J.D., Kabaluk J.T., Goettel, M.S., Myers, J.H. 2007. Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology* 100: 31-38.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5389-5394.
- Fargues, J. 1973. Susceptibility of larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (*Fungi imperfecti*, Moniliales) in the presence of reduced doses of insecticide. *Annales de Zoologie, Écologie Animale* 5: 231-246.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J., Rougier, M. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135: 171-181.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology* 4:3-34.
- Ferguson, K.I., Stiling, P. 1996. Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. *Oecologia* 108: 375-379.
- Fernandez, S., Groden, E., Vanderberg, J.D. et Furlong, M.J. 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 217-226.

- Ferron, P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga* 22: 393-396.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- Filho, E.C., Marques, E.J., Barros, R. 2002. Selection of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates to control *Alabama argillacea* caterpillars. *Scientia Agricola* 59: 457-462.
- Finney, D.J. 1964. "Probit analysis". Cambridge Univ. press, London
- Frank, S.D., Shrewsbury, P.M. 2004. Effect of conservation strips on the abundance and distribution of natural enemies and predation of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) on golf course fairways. *Environmental Entomology* 33: 1662-1672.
- Furlong, M.J., Groden, E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, Imidacloprid, and cyromazine. *Journal of Economic Entomology* 94: 344-356.
- Galvan, T.L., Koch, R.L., Hutchison, W.D. 2005. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicoloured Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 34: 108-114.
- Gardner WA, Sutton RM, Noblet R. 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. *Environmental Entomology* 6: 616-618.
- Glare, T.R., Jackson, T.A. 1992. Use of pathogens in scarab pest management. Intercept, Andover, Hampshire, 298p.
- Gonzales-Cabo, J.F., Espejo-Serrano, J., Barcena-Asensio, M.C. 1995. Mycotic pulmonary disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise. *Mycoses* 38: 167-169.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D., Wraight S.P. 2000. Fungi. In: Lacey L.A. and Kaya H.K. (eds), *Field manual of techniques in invertebrate pathology* pp.255-282.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegel, J.P., Evans, H.C. 2001. Safety of fungal biocontrol agents, In: Butt, T.M., Jackson, C. et Magan, N. (eds), *Fungi as biocontrol agents*. CABI Publishing. Oxon. 390 pages.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.R. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 6, Elsevier, Oxford. pp.361-406.

- Grewal, P.S. 1999. Factors in the success and failure of microbial control in turfgrass. *Integrated Pest Management Review* 4: 287-294.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinooor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 261-266.
- Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, P., Keskin, N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27: 181-202.
- Heller, P.R., Walker, R. 1998. Suppression of black cutworm larvae with spinosad, bifenthrin, chlopyrifos and experimental formulations on creeping bentgrass. *Arthropod Management Tests* 23: 312-313.
- Hicks, B.J., Watt, A.D., Cosens, D. 2001. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agents against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Forest Ecology and Management* 149: 275-281.
- Hiromori, H., Nishigaki, J. 1998. Joint action of an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) with synthetic insecticides against the Scarab beetle, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Applied Entomology and Zoology* 33: 77-84.
- Hong, S.C., Williamson, R.C. 2006. Suitability of various turfgrass species and cultivars for development and survival of black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 99: 850-857.
- Hossain, M.B., Poehling, H-M. 2006. Non-target effects of three biorationale insecticides on two endolarval parasitoids of *Liriomyza sativae* (Dipt., Agromyzidae). *Journal of Applied Entomology* 130: 360-367.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. In "Manual of Techniques in Insect Pathology." (L. Lacey, Ed.). Academic Press, San Diego, CA.pp153-186.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L. 1995. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control* 5:581-590.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C. et Magan, N. (eds), *Fungi as biocontrol agents*. CABI Publishing. Oxon. 390 pages.

- Ishaaza, I., Barazani, A., Kontsedalov, S., Horowitz, A.R. 2007. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomological Research* 37: 148-152.
- Kabaluk, J.T., Ericsson, J.D. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal* 99: 1377-1381.
- Kaakeh, W., Reid, B.L. Bohnert T.J., Bennet G.W. 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). *Journal of Economic Entomology* 90: 473-482.
- Kullik, S.A., Sears, M.K., McLeod, D.G.R., Gualtieri, L.L., Schaafsma, A.W. 2005. Phenology and field biology of black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Ontario no-till corn. *Journal of Economic Entomology* 98: 1594-1602.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K. 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for Scarab Grub control. *Biological Control* 8: 131-137.
- Koppenhöfer, A.M., Choo, H.Y. Kaya, H.K., Lee, D.W., Gelernter W.D. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control* 14: 37-44.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological control* 21: 230-248.
- Lacey, L.A., Goettel, M.S. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* 40:3-27.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., Van Rie, J., Vliet, A.V., Peferoen, M. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 80-86.
- Laverdière, C., Dion, S., Gauthier, F. 2007. Bilan des plans de réduction des pesticides sur les terrains de golf, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 54 p.
- Lecuanò, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa, F.R., Arcas, J.A. 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 38: 172-179.
- Lingg, A.J., Donaldson, M.D. 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 191-200.

- Liu, N.N., Yue, X. 2000. Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1269-1275.
- Lopez, R., Potter, D.A. 2000. Ant predation on eggs and larvae of the black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Environmental Entomology* 29: 116-125.
- Luz, C., Fargues, J. 1998. Factors affecting conidia production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 97-103.
- McVay, J.R., Gudauskas, R.T., Harper, J.D. 1977. Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 29: 367-372.
- Mendez, W.A., Valle, J., Ibarra, J.E., Cisneros, J., Penagos, D.I., Williams, T. 2002. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) in maize. *Biological Control* 25: 195-206.
- Mertz, E.P., Yao, R.C. 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp nov isolated from soil collected in a sugar rum still. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 34-39.
- Middaugh, D.P., Genthner, F.J. 1994. Infectivity and teratogenicity of *Beauveria bassiana* in *Menidia beryllina* embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 95-102.
- Millar, N.S., Denholm, I. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 7: 53-66.
- Ministère de l'environnement du Québec. 2003. Code de gestion des pesticides. [Online] <http://www.menv.gouv.qc.ca/pesticides/permis/code-gestion/guide-golf/index.htm> (cité le 21 mai 2006).
- Moretti, A., Belisario, A., Tafuri, A., Ritieni, A., Corazza, L., Logrieco, A. 2002. Production of beauvericin by different races of *Fusarium oxysporum* F. sp. *Melonis*, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. *European Journal of Plant Pathology* 108: 661-666.
- Moulton, J.K., Pepper, D.A., Dennehy, T. 2000. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Management Science* 56: 842-848.
- Nguyen, N.T.H., Borgemeister, C., Phoehling H-M, Zimmermann, G. 2007. Laboratory investigations on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae. *Biocontrol Science and Technology* 17: 853-864.
- Organic Materials Review Institute (OMRI). 2002. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review: Spinosad, Crops. 14p.

- Pachamuthu, P., Kamble, S.T. 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlopyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against german cockroach (Dictyoptera : Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 60-70.
- Pekrul, S., Gula, E. A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*. 34: 238-247.
- Penagos, D.I., Cisneros, J., Hernandez, O., Williams, T. 2005. Lethal and sublethal effects of the naturally derived insecticide spinosad on parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 15: 81-95.
- Pineda, S., Budia, F., Schneider, M., Gobbi, A., Vinuela, E., Valle, J., Del Estal, P. 2004. Effects of two biorational insecticides, Spinosad and Methoxyfenozide, on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology* 97: 1906-1911.
- Pineda, S., Smagghe, G., Schneider, M.I., Del Estal, P., Vinuela, E., Martinez, A.M., Budia, F. 2006. Toxicity and pharmacokinetics of spinosad and Methoxyfenozide to *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 35: 856-864.
- Pineda, S., Schneider M-I., Smagghe, G., Martinez, A-M., Del Estal, P., Vinuela, E., Valle, J., Budia F. 2007. Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 100: 773-780.
- Potter, D.A. 1998. Destructive turfgrass insects: biology, diagnosis and control. Ann Arbor Press. Chelsea. MI. 366pp.
- Potter, D.A. 2003. Managing insect pests of sport fields: problems and prospects. ISHS Acta Horticultura 661: International Conference on Turfgrass Management and Science for Sport Fields. pp.449-460.
- Prater, C.A., Redmond, C.T., Barney, W., Bonning, B.C., Potter, D.A. 2006. Microbial control of black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass using *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Economic Entomology* 99: 1129-1137.
- Prater, C.A., Potter, D.A. 2004. New tool for biological warfare on cutworms. USGA sponsored. Green section Record. November-December. 42: 15-17.
- Quintela, D.E., McCoy, C.W. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus*

- (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology* 26: 1173-1182.
- Rings, R. W., Arnold F. J., Johnson, B. A. 1975. Host range of the black cutworm [*Agrotis ipsilon* (Hfn.)] on vegetables: a bibliography. *Bulletin of Entomological Society of America* 21: 229-234.
- Rockburne, E. W., Lafontaine, J.D. 1976. The cutworm moths of Ontario and Quebec. Research Branch Canada Department of Agriculture Publication 1593: 164pp.
- Roy, H.E., Pell, J.K. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. *Biocontrol* 10: 737-752.
- Salama, H.S., Foda, M.S., Zaki, F.N. Moawad, S. 1984. Potency of combinations of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 77: 885-890.
- Salgado, V.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 60: 91-102.
- Salgado, V.L., Sheets, J.J., Watson, G.B., Schmidt, A.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 60: 103-110.
- Salgado, V.L., Saar, R. 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxinsensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Journal of Insect Physiology* 50: 867-879.
- Salgado, V.L., Sparks, T.C. 2005. The spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of action, and Resistance In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Seven-Volume Set, pp137-169.
- Sanyang, S., Van Emden, H.F. 1996. The combined effects of the fungus *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and the insecticide cypermethrin on *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairmaire) in the laboratory. *Integrated Journal of Pesticides Management* 42: 183-187.
- Sarfraz, M., Dossall, L.M., Keddie, B.A. 2005. Spinosad: A promising tool for integrated pest management. *Outlooks on Pest Management* 16:78-84.
- Sears, M. K., Hsiang, T., Charbonneau, P. 1996. Diseases and insects of turfgrass in Ontario. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Publication 162. 36p.
- Shetlar, D. J., Belcher, M., Niemczyk, H. D., Richmond, D. S. 1996. Black cutworm and sob webworm larval control with biologicals on creeping bentgrass. *Arthropod Management Tests* 22: 351-352.

- Shetlar, D.J., Belcher, M., Niemczyk, H.D., Richmond, D.S. 1997. Black cutworm and sod webworm larval control with spinosad on creeping bentgrass. *Arthropod Management Tests* 352.
- Shetlar, D.J., Niemczyk, H.D., Pinkston, W. 1998. Efficacy of spinosad and standards for control of large black cutworm larvae. *Arthropod Management Tests* 23: 316.
- Showers, W.B. 1997. Migratory ecology of the black cutworm. *Annual Review of Entomology* 42: 393-425.
- Simard, L. 2006. Distribution, abundance et écologie saisonnière des principaux insectes ravageurs du gazon sur les terrains de golf du Québec et évaluation du potentiel de contrôle de nématodes entomopathogènes indigènes, Thèse de doctorat. Québec, Canada, Université Laval, 187pp.
- Sparks, T.C., Crouse, G.D., Durst, G. 2001. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spynosyns and spinosoids. *Pest Management Science* 57: 896-905.
- Stinner, B.R., House, G.J. 1990. Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *Annual Review of Entomology* 35: 299-328.
- Storey, G.K., Gardner, W.A. 1988. Movement of an aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soils. *Environmental Entomology* 17: 135-139.
- Storey, G.K., Gardner, W.A., Tollner, E.W. 1989. Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. *Environmental Entomology* 18: 835-839.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T.M. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metharhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10: 717-735.
- Studdert, J.P., Kaya, H. 1990. Water potential, temperature and clay-clothing of *Beauveria bassiana* conidia: effect on *Spodoptera exigua* pupal mortality in two soil type. *Journal of Invertebrate Pathology* 56: 327-336.
- Swier, S.R., Rollins, A., Lamarche, R., Hodgson, M. 1998. Control of early instar black cutworm larvae with spinosad formulations and dursban. *Arthropod Management Tests* 23: 317-318.
- Tabashnik BE, Cushing, NL. 1987. Quantitative genetic analysis of insecticide resistance: variation in fenvalerate tolerance in a diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) population. *Journal of Economic Entomology* 82: 5-10.
- Tashiro, H. 1987. Turfgrass insects of the United States and Canada. Cornell University Press, Ithaca. 391p.

- Tefera, T., Pringle, K. 2003. Germination, radial growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera :Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 13: 699-704.
- Thompson, G.D. 1999. Development of spinosad and attributes of a new class of insect control products. University of Minnesota. [Online]: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/hutchins2.htm> (cité le 16 janvier 2008)
- Thompson, G.D., Dutton, R., Sparks, T.C. 2000. Spinosad-a case of study: an example from a natural products discovery program. *Pest Management Science* 56: 696-702.
- Thompson, D.G., Brenda, J.H., Lanteigne, L.J., Buscarini, T.M., Chartrand, D.T. 2002. Fate of spinosad in litter and soils of a mixed conifer stand in the Acadian forest region of New Brunswick. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 790-795.
- Thompson, S. R., Brandenburg, R. L. 2004. Scientists Pursue Biological Control for Turfgrass Pests. *Turfgrass Trends*. [online]. <http://www.turfgrasstrends.com/turfgrasstrends/article/articleDetail.jsp?id=128084> (cité le 23 mai 2006).
- Todorova, S.I., Cloutier, C., Côté., J-C., Coderre, D. 2002. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina : Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F.) (Hem.,Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 126: 182-185.
- Vandenberg, J.D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 755-759.
- Viji, C.P., Bhagat, R.M. 2001. Bioefficacy of some plant products, synthetic insecticides and entomopathogenic fungi against black cutworm, *Agrotis ipsilon*, larvae on maize. *Indian Journal of Entomology* 63: 26-32.
- Vittum, P.J., M.G. Villami, H. Tashiro. 1999. *Turfgrass insects of the United States and Canada*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, 422p.
- Walstad, J.D., Anderson, R.F., Stambaugh, W.J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology* 16: 221-226.
- Wang, X-G., Jarjees, E.A., McGraw, B.K., Bokonon-Ganta, A.H., Messing, R.H., Johnson, M.W. 2005. Effects of spinosad-based fruit fly bait GF-120 on tephritid fruit fly and aphid parasitoides. *Biological Control* 35: 155-162.
- Wanner, K.W., Helson, B.V., Harris, B.J. 2000. Laboratory and field evaluation of spinosad against the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Pest management Science* 56: 855-860.

- Watson, G.B. 2001. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 71: 20-28.
- Westwood, G.S., Huang, S.W., Keyhani, N.O. 2005. Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy* 3: 1-8.
- Williams, T., Valle, J., Vinuela, E. 2003. Is the naturally derived insecticide spinosad compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science and Technology* 13: 459-475.
- Williams, T., Cisneros, J., Penagos, D.I., Valle, J., Tamez-Guerra, P. 2004. Ultralow rates of spinosad in phagostimulant granules provide control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Journal of Economic Entomology* 97: 422-428.
- Williamson, R. C., Potter, D. A. 1997a. Turfgrass species and endophyte effects on survival, development, and feeding preference of black cutworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 1290-1299.
- Williamson, R. C., Potter, D. A. 1997b. Cutworms relish some grasses, avoid others. *Golf Course Management*, December: 49-52.
- Williamson, R. C., Potter, D. A. 1997c. Nocturnal activity and movement of black cutworms (Lepidoptera: Noctuidae) and response to cultural manipulations on golf course putting greens. *Journal of Economic Entomology* 90: 1283-1289.
- Williamson, R. C., Potter, D. A. 1997d. Oviposition of black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) on creeping bentgrass putting greens and removal of eggs by mowing. *Journal of Economic Entomology* 90: 590-594.
- Williamson, R.C., Potter, D.A. 1998. An innovative approach to black cutworm management. *USGA Green Section Record* p.6-8
- Williamson, R.C. 2001. Black cutworms in golf course turf. *Garden facts*. University of Wisconsin-Extension 3 pp.
- Williamson, R.C., Hong, S.C. 2003. Not all bluegrasses are created equal. *Golf Courses Management* 93-95.
- Wraigt, S.P., Carruthers, R.I. 1999. Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops In: *Biopesticides, Use and Deelivery* (Hall, F.R. and Menn, J.J.) Humana Press, 626p.
- Yee, W.L., Toscano, N.C. 1998. Laboratory evaluations of synthetic and natural insecticides on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) amage and survival on lettuce. *Journal of Economic Entomology* 91: 56-63.
- Zhao, J-Z, Li, Y-X, Collins, H.L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Shelton, A.M. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth

(Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology* 95: 430-436.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, *Biocontrol Science and Technology* 17: 1-44.

ANNEXES

Annexe 1. Temps létaux (TL) (jour) issus de différentes combinaisons de spinosad-*B. bassiana* testées sur le ver gris (*Agrotis ipsilon*), en laboratoire.

INTRODUCTION

L'application combinée de deux agents de contrôle sur un ravageur peut entraîner différents effets positifs. Par exemple, l'application simultanée de nématodes *Steinernema feltiae* et du champignon *B. bassiana* sur des larves de la fausse-teigne du rucher (*Galleria mellonella* Linn.) réduit la période d'infection létale comparativement à l'application d'un seul des agents pathogènes (Barbercheck et Kaya, 1990). Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer les temps létaux issus de chacune des combinaisons spinosad-*B. bassiana* testées sur les larves de ver gris dans notre étude afin de les comparer aux temps létaux issus de l'application des agents de contrôle seuls.

RÉSULTATS

Tableau V. Temps létaux (TL) (jour) issus de l'inoculation simultanée de différentes concentrations de *Beauveria bassiana* et de spinosad sur le ver gris (*Agrotis ipsilon*) de troisième stade larvaire, en laboratoire.

| Traitements | | TL ₅₀ (jour) (95% I.C.) |
|--|------------------------|------------------------------------|
| <i>B. bassiana</i> (spores ml ⁻¹) | Spinosad (ppm) | |
| 8X10 ⁸ (CL ₉₀ ^a) | 3 (CL ₁₀) | 1,32 (1,21-1,44)a* |
| 7X10 ⁷ (CL ₅₀) | 50 (CL ₅₀) | 1,48 (1,37-1,60)a |
| 8X10 ⁸ (CL ₉₀) | 8 (CL ₂₀) | 1,56 (1,22-1,86)ab |
| 1X10 ⁷ (CL ₂₀) | 50 (CL ₅₀) | 2,05 (1,78-2,31)b |
| --- | 50 (CL ₅₀) | 2,31 (1,59-2,95)bc |
| 8X10 ⁸ (CL ₉₀) | --- | 2,67 (1,98-3,31)bc |
| 7X10 ⁶ (CL ₁₀) | 50 (CL ₅₀) | 3,33 (2,79-3,90)c |
| 7X10 ⁷ (CL ₅₀) | 8 (CL ₂₀) | 3,60 (3,00-4,31)c |
| 7X10 ⁷ (CL ₅₀) | 3 (CL ₁₀) | 4,81 (3,84-6,58)cd |
| 7X10 ⁷ (CL ₅₀) | --- | 5,18 (3,98-8,08)d |

^a Concentration létale à 90%

*TL₅₀ suivi par la même lettre ne diffèrent pas de manière significative sur la base de leurs intervalles de confiance (95%) (Tabashnick et Cushing 1987).

Annexe 2. Comparaison de deux modes d'application du spinosad et de *Beauveria bassiana* sur la mortalité des larves de ver gris (*Agrotis ipsilon*).

Introduction

Le ver gris est un insecte nocturne, actif du coucher au lever du soleil (Potter 1998). En général, dans la régie d'entretien des terrains de golf, les traitements (fongicides, insecticides ou autres) se font en dehors des périodes d'utilisation de la surface de jeu par les golfeurs, soit tôt le matin ou en fin de journée. Cependant, ce mode de gestion n'assure pas la présence des larves à la surface, par exemple, des verts de golf, lors des applications d'insecticides. Dans le but d'optimiser l'efficacité de l'agent de contrôle, la comparaison de deux modes d'application de *B. bassiana* et du spinosad sur la mortalité du ver gris, permettra de déterminer si des ajustements au niveau des interventions contre ce ravageur doivent être réalisés. La première méthode consiste en l'application des produits directement sur la larve et le feuillage alors que la deuxième consiste en l'exposition de la larve à du feuillage traité.

Matériel et Méthode

Élevage d'insecte

Les larves de ver gris utilisées lors de cette étude ont été prélevées d'une population infestant la pépinière du club de golf Larrimac (Chelsea, QC, Canada). Tous les stades larvaires ont été élevés dans une chambre à environnement contrôlée, à 24°C, 75% HR, sous une photopériode de 16:8 L:N h, conditions standards pour toutes les expérimentations. Les adultes ont été maintenus dans des cages à reproduction (37 X 31 X 31cm) et ont été nourris avec une solution sucrée (Gatorade®, QTG Canada Inc., Peterborough, ON, Canada). Les œufs ont été récoltés quotidiennement et disposés sur une

diète artificielle (Southland Products Inc., Lake Village, AR, U.S.A.) couvrant la partie inférieure de Pétris de 9cm de diamètre. Les larves de deuxième stade ont été transférées dans des contenants de plastique individuels (Solo Cup Co., modèle P100), remplis de diète artificielle, et maintenues dans ceux-ci jusqu'à la pupaison.

Formulations de spinosad et de *B. bassiana*

Les solutions expérimentales de spinosad ont été préparées à partir d'une formulation commerciale (Success 480 SC[®]) contenant 480g/L d'ingrédients actifs (i.a.) (Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana, U.S.A.). Des dilutions en série ont été réalisées afin d'obtenir une concentration de spinosad de 50ppm, dose correspondant à la concentration létale à 50% (CL₅₀) préalablement déterminée sur les larves de ver gris de troisième stade.

Les solutions du champignon entomopathogène ont été préparées à partir d'une formulation commerciale de la souche GHA de *B. bassiana* (Botanigard ES[®]), contenant $2,1 \times 10^9$ spores/ml (Laverlam Inc., Butte, MT, U.S.A.). Des dilutions en série ont été réalisées afin d'obtenir une quantité de conidies de *B. bassiana* de 7×10^7 spores/ml. Cette dose correspond à la concentration létale à 50% (CL₅₀) préalablement déterminée sur les larves de ver gris de troisième stade. Avant chaque expérience, 10 pétris de Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ont été inoculés avec la formulation afin de tester la viabilité des conidies de *B. bassiana*. Les pétris ont été incubés à 25°C, dans la noirceur, pour une période de 48 à 72 heures. La germination a par la suite été déterminée de manière qualitative par la présence de mycélium blanc recouvrant le milieu de culture. Elle a été à chaque reprise, de plus de 90%.

Bioessais

Les larves de *A. ipsilon* de troisième stade ont été placées au centre de pétris de 9cm de diamètre contenant 2g de résidus de tonte d'agrostide stolonifère (*Agrostis palustris* Hudson 'Alpha') (Gloco Inc., Anjou, Qc, Canada)). Les graminées à gazon ont été semées dans un médium de croissance composé principalement de mousse de tourbe (Pro-mix "Mycorise Pro"[®], Premier Tech Ltée., Rivière-du-Loup, Qc, Canada), dans des contenants en plastique, et maintenus dans les serres du Centre de Recherche et Développement en Horticulture (CRDH) (Agriculture et Agro-Alimentaire Canada, St-Jean-sur-Richelieu, Qc, Canada) pendant 4 semaines. Le contenant et le couvercle des pétris contenaient chacun un filtre en papier Whatman No.2 de 10cm de diamètre, lesquels étaient humidifiés avec de l'eau distillée. Un millilitre de solution d'insecticide a été pulvérisé à l'aide d'une tour de Potter. Dans le premier traitement, la larve de troisième stade a été placée au centre du pétri, sur les résidus de graminées à gazon, afin de pulvériser les deux éléments simultanément. Dans le deuxième traitement, seuls les résidus de graminées à gazon ont été placés dans le pétri et pulvérisés. Les pétris ont ensuite été disposés à l'air ambiant pendant 30 minutes, afin de sécher. Suite à cette période, la larve de troisième stade a été placée au centre du pétri. Dans le contrôle, les mêmes traitements ont été réalisés avec 1ml d'eau. Les pétris ont par la suite été disposés de façon aléatoire dans une chambre à environnement contrôlé.

L'expérience a été réalisée trois fois en utilisant 15, 20 et 15 larves, respectivement, par traitement. Les résidus de tonte de graminées à gazon ont été retirés après 96 heures et les larves ont été transférées dans de nouveaux pétris contenant des papiers filtres humidifiés. De nouveaux résidus de tonte, non traités, ont été fournis aux larves *ad libitum*. La mortalité des larves a été relevée quotidiennement.

Analyses statistiques

Préalablement aux analyses statistiques, les pourcentages de mortalité issus de chacun des traitements ont été corrigés en fonction de la mortalité dans les traitements contrôles (Abbott 1925). Les différences de mortalité entre les deux méthodes d'inoculation, pour chacun des produits, ont été analysées en utilisant un test de khi carré, pour chacun des jour de relevé de mortalité. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel JMP IN statistical software version 6.0.0 (SAS Institute, Inc., 2005).

Résultats

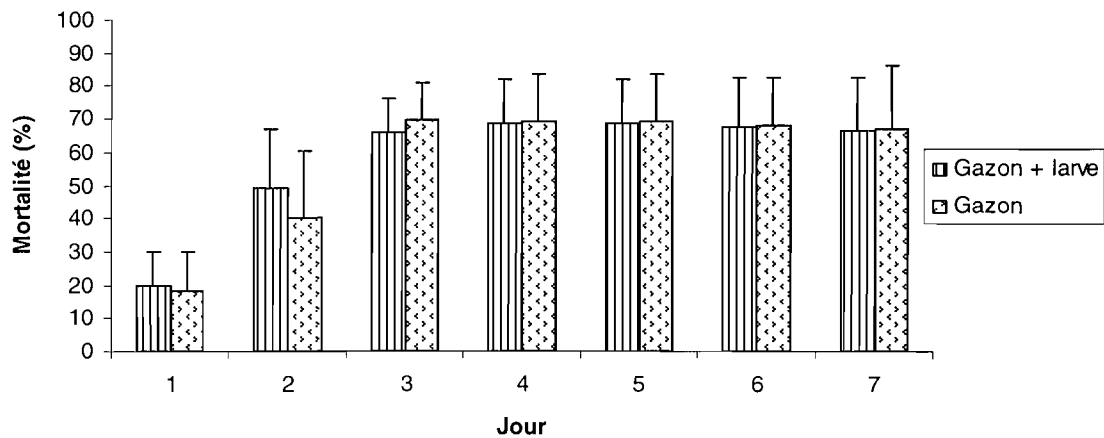


Figure 3. Mortalité ($X \pm SE/2$) des larves de ver gris de troisième stade issue de l'inoculation d'une concentration de 50ppm de spinosad (CL_{50}) selon deux méthodes d'application, en laboratoire. À l'intérieur d'un même jour, la mortalité des larves ne diffère pas de manière significative (Pearson Chi-square $\alpha = 0,05$)

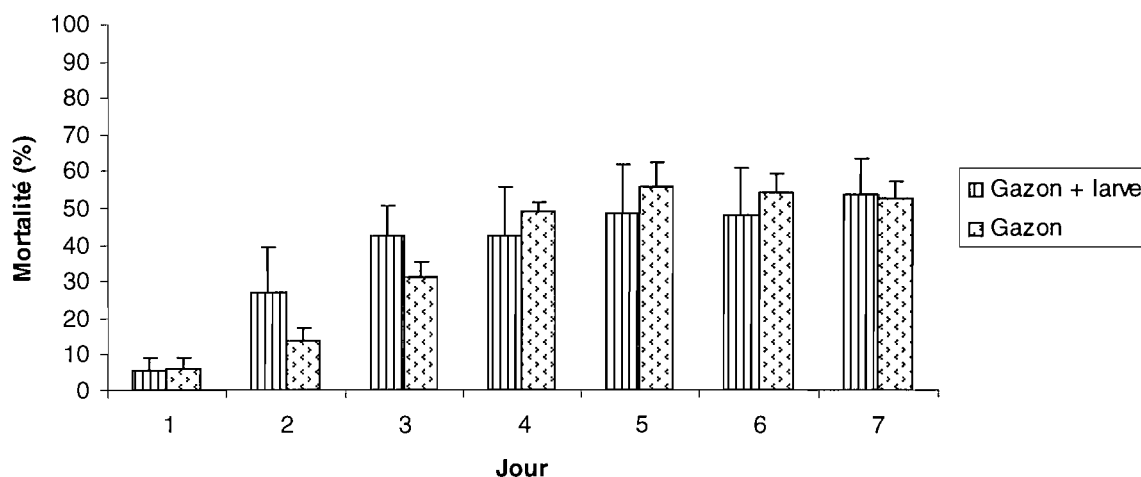


Figure 4. Mortalité ($X \pm SE/2$) des larves de ver gris de troisième stade issue de l'inoculation d'une concentration de 7×10^7 spores/ml de *Beauveria bassiana* (CL₅₀) (souche GHA) selon deux méthodes d'application, en laboratoire. À l'intérieur d'un même jour, la mortalité des larves ne diffère pas de manière significative (Pearson Chi-square $\alpha = 0,05$)

Conclusion

Les résultats ne démontrent aucune différence notable entre les pourcentages de mortalité des larves de ver gris de troisième stade soumises aux deux méthodes d'inoculation, pour chacun des produits. Le spinosad est un biopesticide qui agit à la fois par contact et par ingestion. Cependant, l'efficacité est plus élevée lorsque la matière active est ingérée (OMRI 2002). Nos résultats vont effectivement dans ce sens. Dans notre étude, un impact positif du spinosad via la cuticule de l'insecte aurait engendré un pourcentage de mortalité plus élevé lors de l'inoculation des résidus de graminée et de la larve à la fois, comparativement à l'inoculation seule des résidus. Or cet effet n'a pas été relevé. Ainsi, la présence des larves ne semble pas nécessaire à l'obtention d'un contrôle par le spinosad lorsque la larve est en présence d'une source de nourriture infectée. Des tests en champ devraient être effectués afin de valider cette information.

Quant à *B. bassiana*, le mode d'infection par les conidies s'effectue principalement à travers la cuticule de l'insecte (Inglis *et al.* 2001). Fernandez *et al.* (2001) ont rapporté une mortalité de 77% chez les larves du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) pulvérisées directement avec des conidies de *B. bassiana* et exposées à du feuillage traité, comparativement à 34% chez les larves seulement exposées à du feuillage traité. Cependant, nos résultats ne démontrent pas cette tendance. Il est à noter que dans notre étude, la variation du pourcentage de mortalité entre les expériences est particulièrement élevée. De ce fait, il serait pertinent d'augmenter le nombre de répétitions pour être en mesure de diminuer cette variation et ainsi discerner l'effet réel du traitement sur la mortalité des larves. Finalement, il serait intéressant d'inclure dans l'étude l'acquisition des conidies par les larves de ver gris exposées à du feuillage traité ainsi que la capacité de germination de ces dernières.