

# Réponse des stades larvaires de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) à l'application de champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*

Ouorou Kobi Douro Kpindou <sup>(1)</sup>, Denis Assouan Djegui <sup>(1)</sup>, Isabelle Adolé Glitho <sup>(2)</sup>, Manuele Tamò <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA). 08 B.P. 0932. Tri Postal. Cotonou (Bénin).

E-mail : d.kpindou@cgiar.org

<sup>(2)</sup> Université de Lomé. Faculté des Sciences. Laboratoire d'Entomologie Appliquée. B.P. 1515. Lomé (Togo).

Reçu le 27 octobre 2010, accepté le 9 février 2012.

Deux expérimentations ont été mises en place pour étudier la réponse effet/dose de deux souches de champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae*, Met 31 et *Beauveria bassiana*, Bb 11 sur les stades larvaires de *Helicoverpa armigera*. Dans la première expérimentation, la souche Met 31 de *M. anisopliae* a été testée sur le stade L3 de *H. armigera*, tandis qu'à la deuxième, les deux souches Met 31 et Bb 11 ont été testées sur le stade L4 du même insecte. Pour les deux expérimentations, les doses de 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> conidies par insecte ont été utilisées. Les observations ont porté sur la mortalité des larves, la sporulation des cadavres, la formation des chrysalides et l'émergence des adultes. La formule d'Abbott a été utilisée pour corriger les taux de mortalité au niveau des insectes traités. La régression de Cox a été utilisée pour déterminer la DL50. Pour la première expérimentation, les taux de mortalité des larves L3 de *H. armigera* n'étaient pas significativement différents entre les doses d'application de Met 31 de 10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup> conidies par insecte. Lors de la deuxième expérimentation, le taux de mortalité des larves L4 (74 %) soumises à la dose d'application de Met 31 de 10<sup>7</sup> conidies par insecte a été significativement le plus élevé. Pour la souche Bb 11, malgré l'écart observé entre les taux de mortalité causés par 10<sup>6</sup> (58 %) et ceux causés par 10<sup>7</sup> conidies par insecte (90 %), aucune différence significative n'a été enregistrée au seuil de 5 %. Les cadavres des chenilles L4 issus des plus faibles doses n'ont pas sporulé. Les témoins ont enregistré le plus fort taux de chrysalides et d'adultes. Ces deux paramètres ont été fonction de la dose : plus la dose est forte, moins élevés sont les taux de chrysalides et d'adultes. Pour toutes les souches de champignons utilisées, quel que soit le stade larvaire de *H. armigera*, la réponse effet/dose a été significative.

**Mots-clés.** *Helicoverpa armigera*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, expérimentation en laboratoire, champignon entomopathogène, larve, lutte biologique, dose létale.

**Response of the nymphs of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*.** Two experiments on dose/mortality response between the instars of *Helicoverpa armigera* and two strains of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* (Met 31) and *Beauveria bassiana* (Bb 11) were carried out in laboratory conditions. In the first experiment, *M. anisopliae* Met 31 was tested on the third instar of *H. armigera*, while in the second experiment, both Met 31 and Bb 11 were tested on the fourth instar. In all the experiments, the following different doses of conidia per insect were used: 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>. The following parameters were measured: mortality and sporulation rates, the number of pupae formed and the number of adults that emerged. Abbott's formula was used to correct the treatment mortality rates. LD50 was determined using Cox-regression. For the third instar in experiment one, no significant difference was observed between high doses (10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> conidia per insect). For instar L4, only the dose of 10<sup>7</sup> conidia per insect showed high mortality rates (74%). For the strain Bb 11, in spite of the variation observed between the mortality rates induced by high doses (10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> conidia per insect), no significant difference was recorded at the 5% level. No mycosis was observed from cadavers resulting from lower doses when tested on L4. The control recorded the highest numbers of pupae and adults. These two parameters were related to the level of dosage: the higher the dose, the lower the numbers of pupae and adults that emerged. For all the strains of fungi used, whatever the larval stage of *H. armigera*, the dose/mortality response was significant.

**Keywords.** *Helicoverpa armigera*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, laboratory experimentation, entomogenous fungi, larvae, biological control, lethal dose.

## 1. INTRODUCTION

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) est signalé comme provoquant de sérieux dégâts, en particulier sur le cotonnier, la tomate et le maïs. Sur le cotonnier, deux ou trois larves sur une plante peuvent détruire toutes les capsules en 15 jours (CABI et al., 2003). De même, selon Parry (1982), une seule chenille de troisième ou de quatrième stade de *H. armigera* peut dévorer cinq à six boutons floraux en une nuit. La lutte chimique est la méthode la plus souvent utilisée contre les larves des lépidoptères ravageurs des plantes. Elle a été, en général, très efficace pour détruire les ravageurs sur un grand nombre de cultures. Ainsi, de nombreux produits chimiques, notamment les pyréthriinoïdes, les organochlorés (dont le DDT), les carbamates et les régulateurs de croissance, ont été utilisés dans la lutte contre ces ravageurs (Vandamme et al., 1966 ; Ascher et al., 1991 ; Rao et al., 1992). Malheureusement, l'utilisation de ces produits chimiques a entraîné des effets néfastes, tels que l'apparition de nouveaux ravageurs, la pollution de l'environnement et la détérioration de la santé humaine et animale. Face à ces inconvénients, les espoirs se sont portés sur des alternatives.

Divers biopesticides à base de champignons entomopathogènes, *Metarhizium* sp. et *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, sont disponibles dans le commerce pour la gestion des insectes ravageurs d'importance agricole comme le foreur de caféier *Hypothenemus hampei* Ferrari et diverses espèces de Curculionidae (Adane et al., 1996 ; De la Rosa et al., 1997), les locustes et les sauteriaux (Johnson et al., 1993 ; Bateman, 1997 ; Lomer et al., 1999 ; Lomer et al., 2001), les lépidoptères (Deshpande et al., 2001 ; Abdel-Razek et al., 2006 ; Godonou et al., 2009 ; James et al., 2009).

Les espèces les plus utilisées dans cette lutte sont *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin et *Metarhizium flavoviride* Gams and Roszypal. Kulkarnia et al. (2008) ont réalisé des essais avec plusieurs souches de ce champignon sur les larves de *H. armigera* au laboratoire. Toutes les souches utilisées étaient infestives et les plus virulentes ont causé des mortalités allant de 50 % à 92,5 %. Gopalakrishan et al. (1989) précisent que tous les stades de l'insecte, hormis l'œuf, peuvent être touchés. Les adultes mis en contact avec une suspension de conidies ne meurent pas, mais les femelles pondent des œufs stériles.

La pathogénicité de *Beauveria bassiana* a été démontrée pour la première fois par Bassi (1835). Ce champignon a été utilisé dans le monde entier contre plusieurs insectes nuisibles : en ex-URSS pour la gestion du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]) (Coleoptera : Chrysomelidae) ; en Chine contre le Bombyx du pin (*Dendrolimus punctata*

[Walker]) (Lepidoptera : Lasiocampidae). Dans le Nord de l'Amérique, des essais à base de *B. bassiana* ont été réalisés en laboratoire (aux États-Unis dans le comté d'Arlington et dans l'État de Massachusetts) contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lefebvre, 1931a ; Lefebvre, 1931b). D'autres études, menées par Gowda et al. (1992) indiquent des taux d'infection de 6 à 12 % par *B. bassiana* pour des chenilles de *H. armigera* collectées sur du pois d'Angole en Inde. Wilson (1983) a noté en Australie une mortalité naturelle due à *B. bassiana* touchant 15 à 20 % des chrysalides hivernantes. La pathogénicité de *B. bassiana* vis-à-vis de *H. armigera* a été étudiée au laboratoire dans différentes conditions d'humidité et de température. Lujan et al. (2001) ont montré qu'à 25 °C, avec une humidité relative élevée (95 %), la mortalité des larves de l'insecte traitées avec différentes concentrations de *B. bassiana* était très rapide et très élevée.

Les travaux préliminaires effectués sur les larves de troisième stade de *H. armigera* avec les souches de champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* au Laboratoire de l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA, Bénin) ont montré que ces dernières sont pathogènes au ravageur (Douro Kpindou et al., 2012). La présente investigation a été réalisée pour évaluer l'efficacité de ces pathogènes à diverses doses sur certains stades de *H. armigera*.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Milieu d'étude

Les expérimentations ont été conduites dans les laboratoires de l'IITA (Bénin) de mars à mai 2009. Les conditions ambiantes de la salle étaient de  $26 \pm 0,5$  °C et de  $65,5 \pm 5$  % RH.

### 2.2. Provenance des larves de *H. armigera* utilisées

Les larves de *H. armigera* utilisées ont été fournies par le Laboratoire d'Élevage de l'IITA (Bénin). Ce sont des insectes ramenés de prospections. Ils ont été élevés sous un régime alimentaire artificiel composé de haricots, d'agar, de maïs, de levure de brasserie, d'acide ascorbique, d'acide sorbique, de miel, de formaldéhyde et de p-hydroxybenzoate de méthyle (Teakle et al., 1985).

### 2.3. Provenance des champignons entomopathogènes

Les souches des champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* utilisées proviennent de l'unité de collection de l'IITA (Bénin) et avaient déjà été testées pour leur pathogénicité (Douro Kpindou

et al., 2012). Les conidies de ces champignons ont été produites par l'Unité de Production de l'IITA par un procédé diphasique (liquide, solide) (Cherry et al., 1999). Le taux de germination après 24 h d'incubation à 26 °C était de  $93,06 \pm 0,04$  %.

#### 2.4. Protocole expérimental

Deux expérimentations ont été mises en place. Dans la première, pour raison de disponibilité de l'hôte, seule une souche de *M. anisopliae* (Met 31) a été utilisée pour inoculer les larves de 3<sup>e</sup> stade de *H. armigera*. Lors de la deuxième expérimentation, deux souches, l'une de *M. anisopliae* (Met 31) et l'autre de *B. bassiana* (Bb 11) ont été utilisées pour inoculer les larves de 4<sup>e</sup> stade de *H. armigera*.

Chaque expérimentation a consisté en cinq traitements constitués d'une formulation témoin (uniquement de l'huile d'arachide) et de quatre différentes concentrations des conidies de chaque souche de champignon utilisée (**Tableau 1**). Ces traitements ont été répétés, chacun, dans trois blocs aléatoires complets. Dix larves de *H. armigera* de même stade ont été utilisées par répétition. L'application topique a été la méthode utilisée pour inoculer les larves (Bateman et al., 1996 ; Peveling et al., 1997). Les larves ont été mises individuellement dans des boîtes (3,8 x 2,9 x 4,0 cm, avec des couvercles perforés pour l'aération) et soumis au même régime alimentaire que celui du laboratoire d'élevage.

Le prélèvement des cadavres a été fait de manière quotidienne. Ces cadavres prélevés ont été séchés pendant 24 h, puis incubés dans des boîtes de Petri contenant du papier buvard légèrement imbibé pour l'observation d'éventuelles sporulations.

Le nombre de chrysalides mortes et le nombre d'adultes émergés ont été enregistrés. Pour les traitements où les deux sexes ont émergé, les adultes ont été mis en accouplement et les œufs pondus ont été comptés.

#### 2.5. Analyse des données

Les taux moyens de mortalité des larves et des chrysalides, de sporulation, de formation et d'émergence des chrysalides obtenus à la fin des observations, ont été utilisés pour tracer les histogrammes. Les taux de

mortalité des insectes traités ont été corrigés en utilisant la formule d'Abbott (1925) :

$$\% \text{ mortalité} = \left(1 - \frac{nTa}{nCa}\right) \times 100$$

où  $nTa$  est le nombre d'individus survivants dans les insectes traités après traitement et  $nCa$  est le nombre d'individus survivants dans les témoins après traitement.

Les taux de sporulation ont été calculés sur la base des individus (larves ou chrysalides) morts dans chaque traitement. Le taux d'émergence a été calculé sur la base du nombre de chrysalides formées dans chaque traitement.

Après une transformation arc-sinus, une analyse de variance a été faite. Lorsque l'ANOVA a révélé des différences significatives entre traitements, le test SNK (Student-Newman Keuls), au seuil de 5 %, a été conduit afin de séparer les moyennes des différents traitements. Les valeurs des SNK ont été représentées par des traits verticaux au niveau des figures de manière à faciliter la comparaison. Lorsque les valeurs successives sont égales, pour éviter l'encombrement des figures, une seule de ces valeurs a été représentée. Pour toutes ces analyses, le logiciel SAS version 9.1 (2003) a été utilisé.

**Estimation de la DL50 (Dose Létale 50).** L'analyse et la modélisation des données temps-dose-mortalité ont été effectuées en utilisant le modèle « *Cox regression* » (SPSS, 1989-2007<sup>1</sup>). Les modèles de régression de Cox utilisent la fonction de risque pour estimer le risque d'échec relatif. La fonction de risque,  $h(t)$  est une évaluation de la mort potentielle d'un individu par unité de temps à un moment donné, étant donné que l'individu a survécu jusqu'à ce moment. Les modèles de *Cox regression* sont exprimés en termes de fonction de risque comme suit :

$$h(t) = [h_0(t)]e^{(BX)} \quad (1)$$

<sup>1</sup> This product uses WinWrap Basic, copyright 1993-2007, Polar engineering and consulting, <http://www.winwrap.com>. Licensed to Team EQX.

**Tableau 1.** Stades larvaires de *Helicoverpa armigera* utilisés, souches de champignons et doses appliquées — *Larval stages of Helicoverpa armigera used, fungal isolates and doses applied.*

Expérimentation	Stade larvaire	Souche	Concentration (conidies·ml <sup>-1</sup> )	Volume d'application	Dose (conidies par insecte)
I	3 <sup>e</sup>	Met 31	0 ; 5·10 <sup>6</sup> ; 5·10 <sup>7</sup> ; 5·10 <sup>8</sup> ; 5·10 <sup>9</sup>	2 µl	0 ; 10 <sup>4</sup> ; 10 <sup>5</sup> ; 10 <sup>6</sup> ; 10 <sup>7</sup>
II	4 <sup>e</sup>	Met 31, Bb 11	0 ; 10 <sup>7</sup> ; 10 <sup>8</sup> ; 10 <sup>9</sup> ; 10 <sup>10</sup>	1 µl	0 ; 10 <sup>4</sup> ; 10 <sup>5</sup> ; 10 <sup>6</sup> ; 10 <sup>7</sup>

où  $X$  représente  $\log(\text{dose})$ ,  $B$  le coefficient de régression qui est le risque relatif (ici risque instantané de décès) associé à un traitement par rapport à un autre traitement,  $e$  la base du logarithme népérien et  $h_0(t)$  est la fonction de risque lorsque  $X$  est égal à 0.

La fonction cumulative de risque,  $H(t)$ , est liée à la fonction de survie et peut être dérivée de la fonction de survie comme suit :

$$H(t) = -\ln S(t). \quad (2)$$

La fonction de risque et la fonction de survie sont étroitement liées, et toutes les deux ont été calculées en utilisant le procédé de *Cox regression* (SPSS, 1989-2007).

La DL50 est définie comme la dose d'un agent (chimique ou biologique) nécessaire pour produire la mort de la moitié des organismes testés à un moment donné après application (Maddox, 1982). La DL50 peut être dérivée des équations (1) et (2) comme suit :

$$X = 10^{\frac{\ln(\ln(0,5) - \ln(h_0(t)))}{B}}.$$

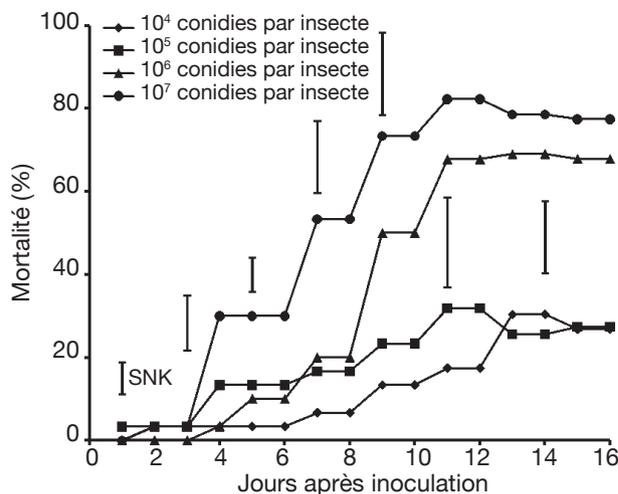
Les intervalles de confiance pour la DL50 ont été calculés sur la base des mêmes équations, utilisant les informations suivantes : écart-type (SE) de  $B$  et écart-type (SE) de  $h_0(t)$ .

### 3. RÉSULTATS

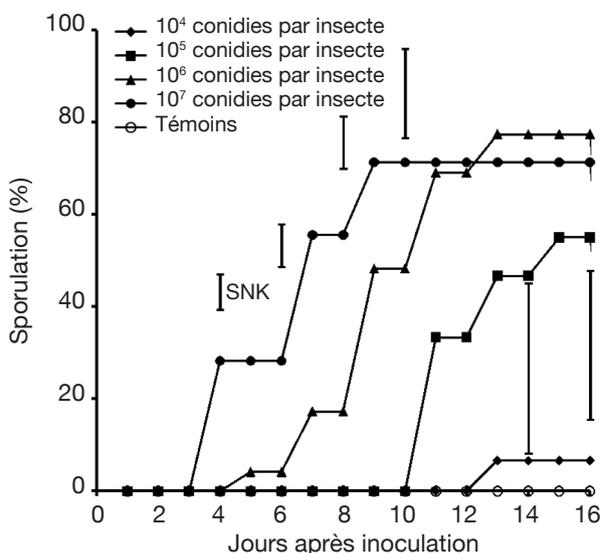
#### 3.1. Mortalité et sporulation des cadavres

**Expérimentation I.** L'évolution des taux de mortalité enregistrés pour toutes les doses de Met 31 utilisées avait suivi la même allure (**Figure 1**). La dose  $10^7$  conidies par insecte a significativement tué plus de larves L3 de *H. armigera* que les doses  $10^4$  et  $10^5$  conidies par insecte. Entre les doses  $10^7$  et  $10^6$  conidies par insecte, la différence a été significative du 4<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour après inoculation pour s'estomper à partir du 11<sup>e</sup> jour après inoculation (**Figure 1**). Les taux de mortalité corrigés obtenus au bout de 16 jours étaient de  $17,7 \pm 19,4 \%$ ,  $20,6 \pm 10,4 \%$ ,  $65,0 \pm 6,5 \%$ ,  $74,5 \pm 7,6 \%$  respectivement pour les doses de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  conidies par insecte. La dose de  $10^6$  conidies par insecte ne s'est démarquée des plus faibles doses qu'à partir du 9<sup>e</sup> jour après inoculation. Les doses  $10^4$  conidies par insecte et  $10^5$  conidies par insecte ont eu des taux de mortalité similaires.

La tendance a été la même pour les taux de sporulation observés au niveau des cadavres issus des différentes doses (**Figure 2**). Le taux de sporulation observé au niveau des cadavres engendrés par la dose  $10^5$  conidies par insecte a été plus élevé et significativement différent de celui de la dose  $10^4$  conidies par insecte.



**Figure 1.** Évolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L3 de *Helicoverpa armigera* après traitement au Met 31 — Temporal evolution of corrected mortality rates after treatment of the third stage of *Helicoverpa armigera* with Met 31.



**Figure 2.** Évolution temporelle des taux moyens de sporulation des cadavres après traitement des larves de 3<sup>e</sup> stade de *Helicoverpa armigera* au Met 31 — Temporal evolution of average sporulation rates after treatment of the 3<sup>rd</sup> stage of *Helicoverpa armigera* with Met 31.

Malgré ces taux de sporulation relativement plus élevés observés au niveau des fortes doses, aucune différence significative n'a été enregistrée entre elles et la dose  $10^5$  conidies par insecte.

#### Expérimentation II

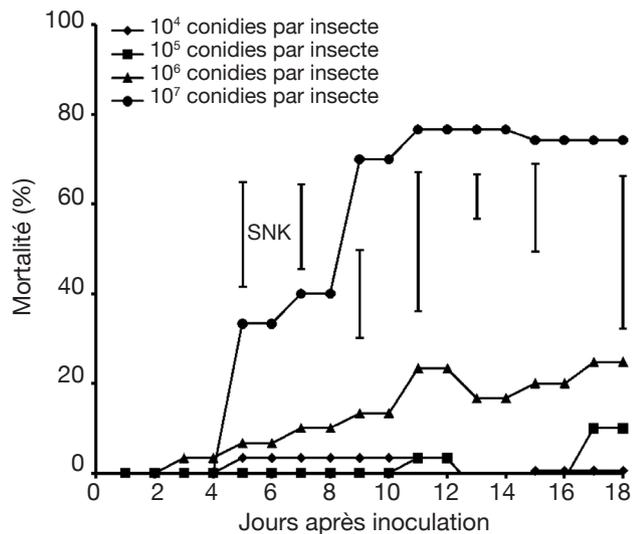
*Application de M. anisopliae (Met 31).* À la dose de  $10^7$  conidies par insecte, les taux de mortalité corrigés

enregistrés pour les larves du 4<sup>e</sup> stade de *H. armigera* étaient similaires à ceux obtenus pour les larves du 3<sup>e</sup> stade (74 %). Les taux de mortalité au niveau des autres doses étaient faibles. Dix-huit jours après inoculation des larves, ils étaient de 25 % et 10 % pour  $10^6$  conidies par insecte et  $10^5$  conidies par insecte, respectivement. Ces taux étaient significativement plus faibles au seuil de 5 % par rapport à ceux de la forte dose,  $10^7$  conidies par insecte ; il y en a qui s'étaient d'ailleurs annulés (0,5 %) ( $10^4$  conidies par insecte) (Figure 3).

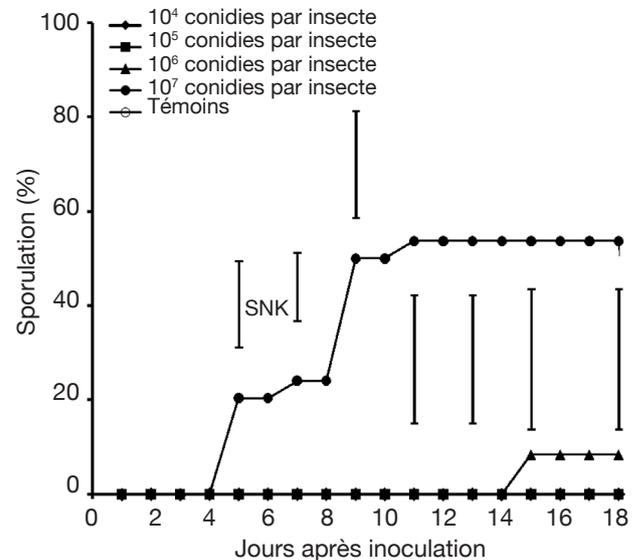
Le plus fort taux de sporulation obtenu était de 54 %. Seuls les cadavres issus des doses les plus élevées ( $10^7$  et  $10^6$  conidies par insecte) avaient sporulé (Figure 4).

*Application de B. bassiana (Bb 11)*. Les taux de mortalité corrigés enregistrés au niveau du 4<sup>e</sup> stade larvaire de *H. armigera* étaient de  $13,3 \pm 14,9$  % ;  $18,1 \pm 4,1$  % ;  $57,8 \pm 11,0$  % et de  $90,0 \pm 10,0$  % pour les doses  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  conidies par insecte, respectivement. Malgré le grand écart observé entre les doses les plus élevées, les taux moyens finaux de mortalité n'étaient pas significativement différents au seuil de 5 % (Figure 5).

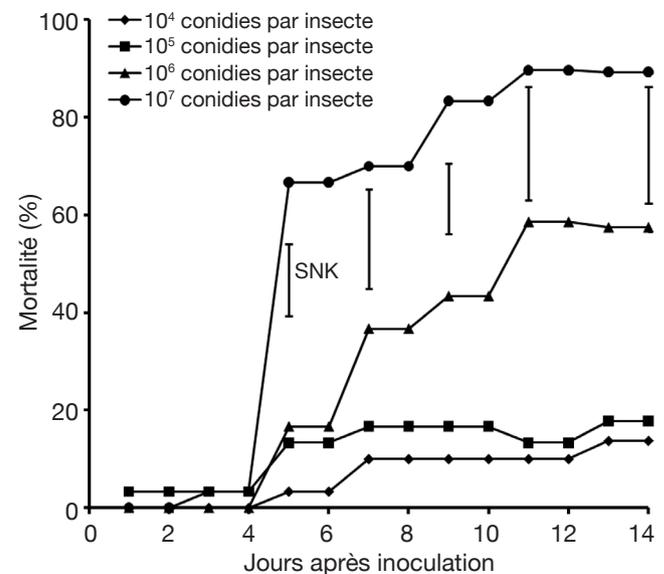
Tout comme pour la souche de *Metarhizium* Met 31, seuls les cadavres issus des doses les plus élevées ( $10^7$  et  $10^6$  conidies par insecte) avaient sporulé, avec 77,8 % pour  $10^7$  conidies par insecte et 4,8 % pour  $10^6$  conidies par insecte (Figure 6).



**Figure 3.** Évolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de *Helicoverpa armigera* après traitement au Met 31 — Temporal evolution of corrected mortality rates after treatment of the fourth stage of *Helicoverpa armigera* with Met 31.



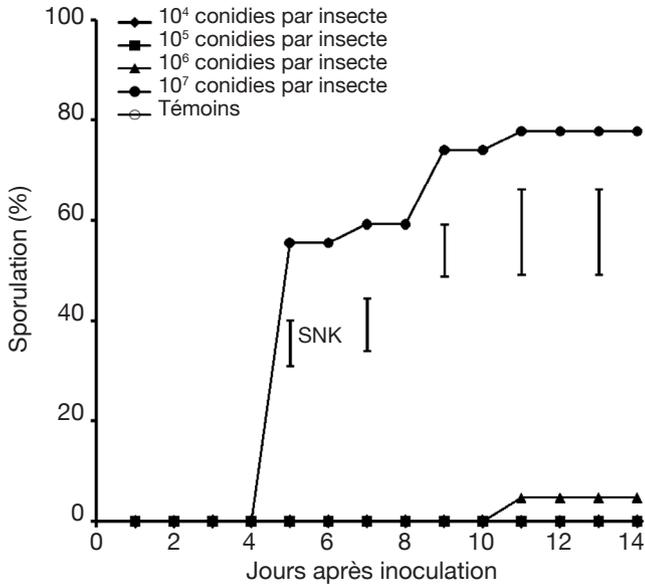
**Figure 4.** Évolution temporelle des taux de sporulation des cadavres après traitement des stades L4 de *Helicoverpa armigera* au Met 31 — Temporal evolution of average sporulation rates after treatment of the fourth stage of *Helicoverpa armigera* with Met 31.



**Figure 5.** Évolution temporelle des taux de mortalité corrigés des larves L4 de *Helicoverpa armigera* après traitement au Bb 11 — Temporal evolution of corrected mortality rates after treatment of the fourth stage of *Helicoverpa armigera* with Bb 11.

### 3.2. Formation des chrysalides, émergence des adultes et oviposition

**Expérimentation I.** Les taux moyens de chrysalides formées ont varié de  $13,3 \pm 6,7$  % ( $10^7$  conidies par insecte) à  $66,7 \pm 14,5$  % (Témoins). Les plus

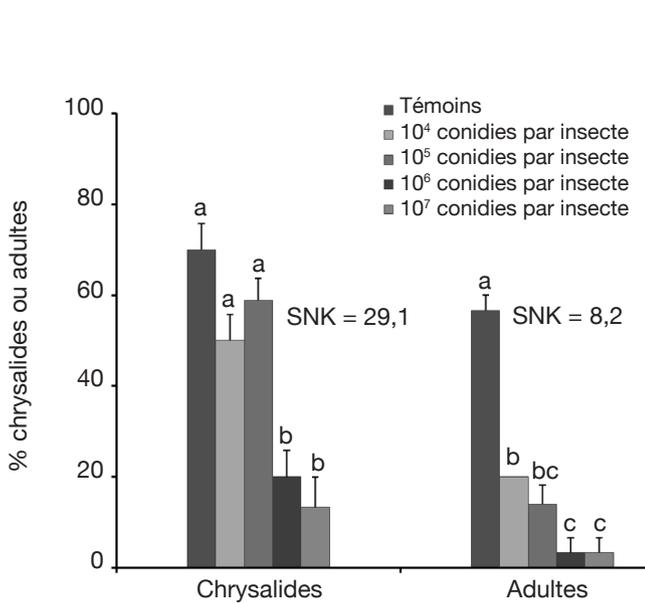


**Figure 6.** Évolution temporelle des taux de sporulation des cadavres après traitement des stades L4 de *Helicoverpa armigera* au Bb 11 — *Temporal evolution of average sporulation rates after treatment of the fourth stage of Helicoverpa armigera with Bb 11.*

faibles taux de formation de chrysalides avaient été enregistrés au niveau des doses les plus élevées ( $10^7$  et  $10^6$  conidies par insecte) avec les plus faibles taux d'émergence des adultes (**Figure 7**). En dehors des témoins, les adultes issus des larves traitées à la souche Met 31 étaient presque tous des mâles malformés (ailes endommagées). Aucune des femelles issues de l'expérimentation I n'avaient pondu d'œuf (**Tableau 2**).

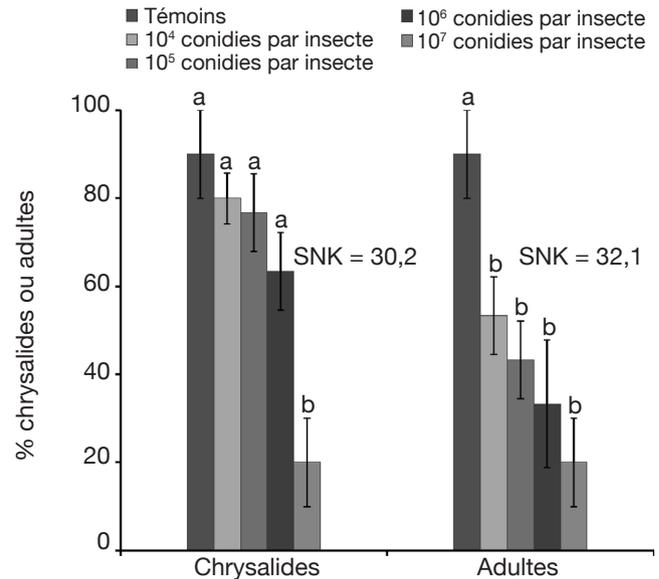
**Expérimentation II**

*Application de M. anisopliae (Met 31).* Avec les larves de stade 4 de *H. armigera*, les taux de chrysalides formées avaient été plus élevés comparativement à ceux obtenus avec le 3<sup>e</sup> stade larvaire. Ces taux étaient de  $90,0 \pm 10 \%$ ,  $80,0 \pm 5,8 \%$ ,  $76,7 \pm 8,8 \%$ ,  $63,3 \pm 8,8 \%$  et  $20,0 \pm 10 \%$  respectivement pour le témoin, les doses  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  conidies par insecte. Seule la plus forte dose,  $10^7$  conidies par insecte, a eu un taux significativement inférieur aux autres (SNK = 30,2) (**Figure 8**). En dehors des témoins, les taux d'émergence étaient similaires pour tous les autres traitements. Le nombre de mâles, de femelles et le nombre d'œufs pondus sont présentés dans le



**Figure 7.** Taux de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L3 de *Helicoverpa armigera* au Met 31 — *Rates of pupae formed and adults emerged two weeks after inoculation of the third stage Helicoverpa armigera with Met 31.*

Les traitements ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (Analyse de variance suivie de SNK) — *Treatments followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (ANOVA, followed by SNK test).*



**Figure 8.** Taux moyen de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L4 de *Helicoverpa armigera* au Met 31 — *Rates of pupae formed and adults emerged two weeks after inoculation of the fourth stage Helicoverpa armigera with Met 31.*

Les traitements ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (Analyse de variance suivie de SNK) — *Treatments followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (ANOVA, followed by SNK test).*

**Tableau 2.** Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves aux champignons entomopathogènes — *Number of adults emerged and laid eggs after inoculation of the larvae with entomopathogenic fungi.*

Expérimentation	Traitements (conidies par insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Mâles malformés	Femelles malformées	Nombre d'œufs pondus
Expérimentation I							
Met 31 sur L3	0	15	8	7	0	0	13
	10 <sup>4</sup>	6	5	1	5	1	0
	10 <sup>5</sup>	4	3	1	0	0	0
	10 <sup>6</sup>	1	1	0	1	0	0
	10 <sup>7</sup>	3	2	1	1	1	0
Expérimentation II							
Met 31 sur L4	0	27	17	10	0	0	590
	10 <sup>4</sup>	16	11	5	9	4	285
	10 <sup>5</sup>	13	10	3	7	2	220
	10 <sup>6</sup>	9	8	1	1	1	62
	10 <sup>7</sup>	6	6	0	6	0	0
Bb 11 sur L4	0	27	16	11	0	0	563
	10 <sup>4</sup>	17	13	4	11	1	310
	10 <sup>5</sup>	13	9	4	7	2	180
	10 <sup>6</sup>	8	7	1	5	1	130
	10 <sup>7</sup>	4	4	0	4	0	0

**tableau 2.** Lorsque les larves du stade 4 avaient été traitées, le nombre d'adultes émergés était plus élevé, mais aussi avec une plus forte proportion de mâles. La dose de 10<sup>7</sup> conidies par insecte n'a enregistré aucune émergence femelle. Tous les adultes émergés au niveau des témoins étaient tous sains et les femelles avaient pondu jusqu'à 590 œufs (**Tableau 2**).

*Application de B. bassiana (Bb 11).* Tout comme pour le *Metarhizium*, les taux de chrysalides formées ont été élevés pour le 4<sup>e</sup> stade comparativement à ceux obtenus avec le 3<sup>e</sup> stade exposé à Met 31. Ils ont varié entre 13,3 ± 3,3 % (10<sup>7</sup> conidies par insecte) et 90 ± 0,0 % (Témoins). La formation des chrysalides et l'émergence des adultes ont été doses dépendantes. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les plus faibles doses (10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> conidies par insecte). Toutes les chrysalides formées au niveau des témoins sont devenues adultes (**Figure 9**). Les mâles étaient en nombre plus important que les femelles (**Tableau 2**). Tout comme pour la souche de *Metarhizium* Met 31, aucune femelle n'a émergé pour la dose de 10<sup>7</sup> conidies par insecte de la souche de *Beauveria* Bb 11.

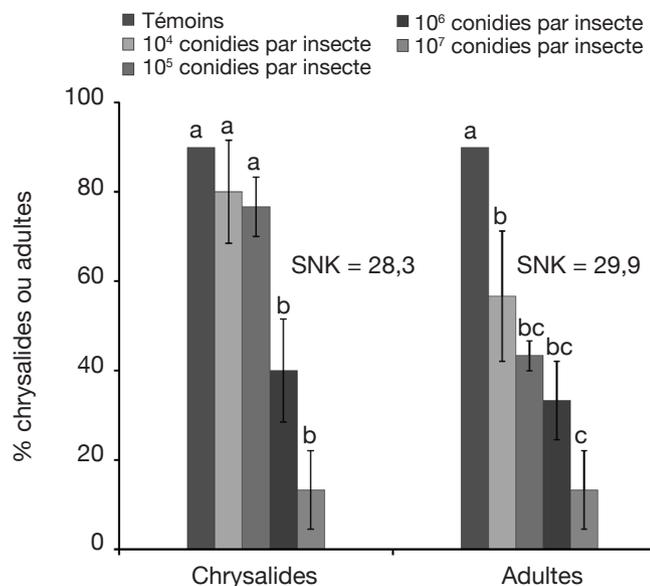
**Estimation de la DL50.** L'analyse de régression de Cox a indiqué que les différentes doses des champignons

utilisés étaient un prédicateur significatif et indépendant de la survie des larves de *H. armigera* testées ( $P < 0,05$ ) (**Tableau 3**) et que le modèle a fourni une bonne régression.

*Les valeurs de B.* Les valeurs de *B* ont montré l'existence d'une relation de dose-réponse. Cette relation a été forte pour la souche de *B. bassiana*, Bb 11, qui a eu une valeur de *B* plus élevée ( $B = 0,440$ ).

### 3.3. Évolution de la DL50 après l'application des champignons

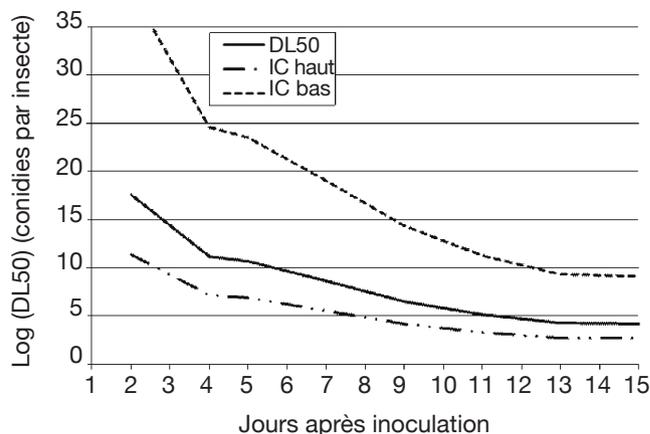
**Application du *Metarhizium* sur les stades 3 et 4 de *H. armigera*.** Les courbes de DL50 des stades 3 et 4 de *H. armigera* sont représentées dans les **figures 10 et 11**, respectivement. L'effet dose-réponse a été significatif pour toutes les souches utilisées et était fonction de la valeur de *B*. Plus *B* était élevé, moins larges étaient les intervalles de confiance. Il fallait 3,47 × 10<sup>18</sup>, 7,40 × 10<sup>10</sup>, 1,60 × 10<sup>10</sup> et 3,72 × 10<sup>8</sup> conidies par insecte pour tuer 50 % des larves de 4<sup>e</sup> stade en, respectivement, 3, 5, 7 et 9 jours, tandis qu'il fallait 3,85 × 10<sup>17</sup>, 4,67 × 10<sup>10</sup>, 4,23 × 10<sup>8</sup> et 3,19 × 10<sup>6</sup> conidies par insecte pour tuer 50 % des larves de 3<sup>e</sup> stade, en respectivement 2, 5, 7 et 9 jours (**Figures 10 et 11**).



**Figure 9.** Taux moyen de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L4 de *Helicoverpa armigera* au Bb 11 — Rates of pupae formed and adults emerged two weeks after inoculation of the fourth stage *Helicoverpa armigera* with Bb 11.

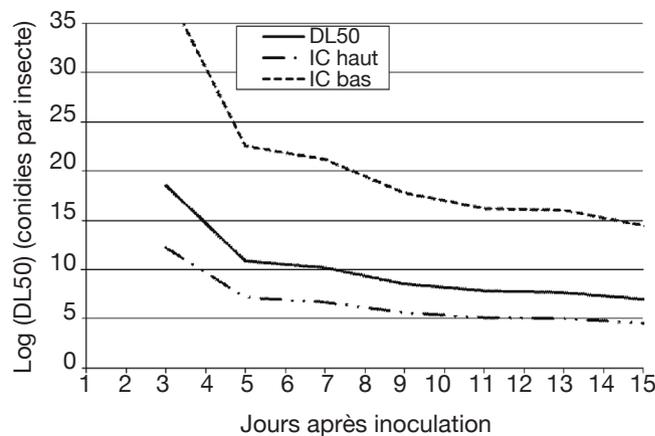
Les traitements ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (Analyse de variance suivie de SNK) — Treatments followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (ANOVA, followed by SNK test).

**Application du *Beauveria* sur les larves de stade 4 de *H. armigera*.** La souche de *Beauveria* a donné la valeur B (0,440) la plus élevée et par conséquent, les valeurs de DL50 les moins élevées. La relation dose-réponse a été très bonne pour Bb 11 (Figure 12). Ainsi, il faut  $4,6 \times 10^7$  conidies par insecte pour tuer 50 % des larves de 4<sup>e</sup> stade en 5 jours, alors qu'il faut  $7,4 \times 10^{10}$  conidies par insecte pour la souche de *Metarhizium*, Met 31. Ceci se remarque également par la diminution de la largeur des intervalles de confiance, comparativement à celle des intervalles de confiance de Met 31.



**Figure 10.** Valeurs des DL50 après traitement des larves L3 de *Helicoverpa armigera* à différentes doses de Met 31 — LD50 values after treatment of the third stage of *Helicoverpa armigera* to various doses of Met 31.

IC : Intervalle de confiance — Confidence Interval.



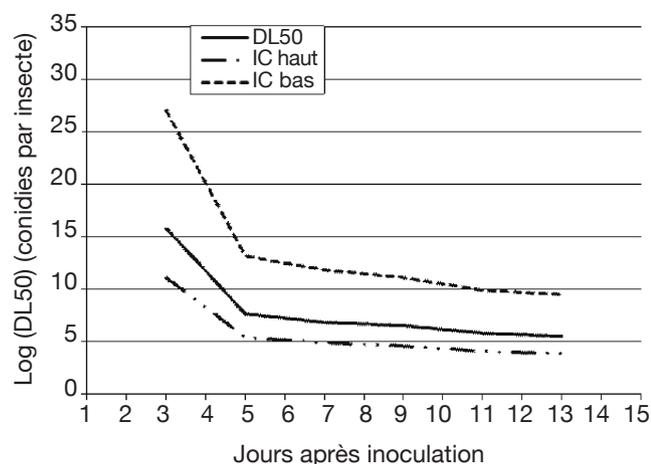
**Figure 11.** Valeurs des DL50 après traitement des larves L4 de *Helicoverpa armigera* à différentes doses de Met 31 — LD50 values after treatment of the fourth stage of *Helicoverpa armigera* to various doses of Met 31.

IC : Intervalle de Confiance — Confidence Interval.

**Tableau 3.** Valeurs des estimations de la valeur de B résultant de la régression Cox pour les souches de *Metarhizium anisopliae* et de *Beauveria bassiana* et les stades larvaires de *Helicoverpa armigera* testés, y inclus les coefficients de Wald — Estimated of B resulting from Cox regression for *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and larval stages of *Helicoverpa armigera* tested, including the Wald coefficients.

Souches de champignons	Stade de <i>Helicoverpa armigera</i>	B	SE	Wald	ddl	Probabilité
Met 31	L3	0,312	0,087	12,844	1	0,000
	L4	0,344	0,091	14,296	1	0,000
Bb 11	L4	0,440	0,093	22,132	1	0,000

B : valeur B de la régression Cox — B value of the Cox regression ; SE : erreur standard — standard error ; Wald : coefficient de Wald — Wald coefficient ; ddl : degré de liberté — degree of freedom.



**Figure 12.** Valeurs des DL50 après traitement des larves L4 de *Helicoverpa armigera* à différentes doses de Bb 11 — LD50 values after treatment of the fourth stage of *Helicoverpa armigera* to various doses of Bb 11.

IC : Intervalle de Confiance — Confidence Interval.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Mortalité et sporulation des cadavres

Les différents résultats obtenus montrent que la mortalité des larves de *H. armigera* est fonction de la quantité de conidies qu'elles reçoivent. Les deux souches de champignons ont été infectieuses pour tous les stades utilisés en adéquation avec les résultats de Kulkarnia et al. (2008). Au stade L3, les doses  $10^6$  et  $10^7$  conidies par insecte pour le *Metarhizium* s'équivalent statistiquement, malgré le taux de mortalité plus élevé enregistré avec la dose de  $10^7$  conidies par insecte. Ce taux de mortalité a été nettement supérieur pour  $10^7$  lorsque ces mêmes doses ont été appliquées sur les stades L4 ; ceci est dû probablement à la taille plus élevée des larves L4, comparativement à celle des L3. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Bateman et al. (1996) qui ont trouvé que l'infection des criquets par les champignons est fonction de leur poids. De même, Gundannavar et al. (2006) ont observé que, après application de différentes concentrations ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^8$  conidies·ml<sup>-1</sup>) de *B. bassiana* sur les larves de *H. armigera*, les jeunes étaient plus sensibles que les plus âgées.

Au-delà de  $10^6$  conidies par insecte, la réponse effet/dose n'est plus perceptible sur les larves L3 et L4 avec, respectivement, le *Metarhizium* et le *Beauveria*, en raison probablement de la grande variabilité dans la mortalité d'une répétition à l'autre. Le nombre de chenilles L3 mortes après inoculation du *Metarhizium* et qui ont sporulé est également fonction de la dose. Il ressort qu'une dose de  $10^6$  conidies par insecte, soit une concentration de  $5 \times 10^8$  conidies·ml<sup>-1</sup> permettra

d'atteindre les mêmes taux de mortalité que  $10^7$  conidies par insecte en deux semaines, vu que l'insecte déjà infecté n'arrive plus à s'alimenter correctement (Thomas et al., 1997). Les cadavres des chenilles L4 issus des faibles doses ( $10^4$ ,  $10^5$  conidies par insecte) n'ont pas sporulé, ce qui serait dû probablement à la faible quantité de conidies reçues par rapport à leur poids.

### 4.2. Formation des chrysalides et émergence des adultes

D'une manière générale, la formation des chrysalides et l'émergence des adultes ont été doses dépendantes, aussi bien pour tous les stades larvaires de *H. armigera* utilisés que pour les champignons testés. Le nombre de chrysalides formées et celui des adultes émergés sont de loin plus faibles pour le stade 3 que pour le stade 4. Ceci serait dû aux forts taux de mortalité enregistrés au niveau des larves de stade 3 et de leurs chrysalides. En effet, au stade 3, les conidies ont beaucoup plus le temps de se développer dans l'organisme de la larve avant sa chrysalidation. De ce fait, même au stade chrysalide, l'infection continue, tel que l'ont souligné Gopalakrishan et al. (1989). Wilson (1983) a noté en Australie des mortalités naturelles de chrysalides de *Heliothis* spp. allant de 15 à 20 % dues au *B. bassiana*. De nos résultats obtenus, il ressort que les chrysalides femelles sont beaucoup plus vulnérables que les chrysalides mâles. Plus la dose est élevée, moins nombreuses sont les femelles qui émergent. De plus, les mâles qui émergent sont malformés (ailes endommagées), limitant ainsi leur déplacement. Ces résultats corroborent ceux de Prasad et al. (2010) qui, après avoir appliqué différentes concentrations (0,1 ; 0,125 ; 0,2 et 0,25  $\times 10^8$  conidies·ml<sup>-1</sup>) de *B. bassiana* sur le troisième stade larvaire de *H. armigera*, ont observé, en dehors des taux élevés de mortalité, des larves à corps gonflé, des larves léthargiques couvertes de mycélium fongique. Ces larves anormales ont été incapables de muer en quatrième stade, ce qui est un résultat intéressant pour la gestion du ravageur avec les biopesticides à base de champignons entomopathogènes.

### 4.3. Modèle de régression de Cox et la DL50

Le modèle de régression de Cox est plus flexible dans l'analyse des essais biologiques de biopesticides que les modèles précédents tels que des analyses de Probit et de Logit. L'analyse de Probit et l'analyse de régression Logit ont trouvé leur large utilisation en modélisant la probabilité d'une réponse par rapport à la dose (Finney, 1971 ; Robertson et al., 1992). Preisler et al. (1989) ont discuté des problèmes liés à l'analyse des données des expériences de temps-dose-réponse et ont conclu que la manière classique de procéder à une

analyse des données indépendantes sur le temps ou la dose est de séparer soit l'effet de la dose ou l'effet du temps des données temps-dose-mortalité utilisées dans les essais biologiques. Ces modèles qui considèrent des effets de temps et de dose semblent être plus appropriés pour évaluer l'efficacité d'un microbe pathogène ou d'un pesticide sur la cible (Robertson et al., 1992). Les modèles de régression de Cox ont bien fonctionné en modélisant des liens existant dans temps-dose-survie des isolats fongiques infectant les larves de *H. armigera* dans ces expérimentations.

Toutes les régressions de Cox, adaptées aux données de survie obtenues à partir des larves L3-L4 traitées avec différentes doses des différents isolats, ont montré des valeurs relativement élevées de *B*. Les ajustements des valeurs de *B* étaient tous significatifs, indiquant que les données montrent une réponse effet/dose significative. Pour la même raison, les courbes de DL50 ne sont pas très raides et leurs intervalles de confiance sont relativement moins grands. Nos résultats sont conformes à ceux de Abebe (2002) qui a utilisé certaines souches de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* virulentes contre les termites.

Nos résultats montrent également que pour un même stade larvaire, le temps mis pour mourir est fonction de la dose appliquée. De même, à un temps donné, la dose à appliquer est fonction du stade larvaire : plus le stade est évolué, plus la quantité de conidies à appliquer sera élevée (*i.e.* à 5 jours, il faut  $4,67 \times 10^{10}$  conidies pour L3 contre  $7,40 \times 10^{10}$  conidies pour L4).

## 5. CONCLUSION

De ces expérimentations, on peut conclure que :

- La réponse effet/dose a été significative pour tous les stades larvaires de *H. armigera* utilisés et pour tous les champignons entomopathogènes utilisés ;
- Des deux stades larvaires de *H. armigera* utilisés, le stade L3 est le plus vulnérable. Les doses  $10^6$  et  $10^7$  conidies par insecte (concentrations de  $5 \times 10^8$  et de  $5 \times 10^9$  conidies.ml<sup>-1</sup>) ont donné des résultats similaires permettant de choisir la moins élevée ;
- Des résultats obtenus, les concentrations de  $10^9$ ,  $10^{10}$  conidies.ml<sup>-1</sup> peuvent être testées en milieu semi-champ et champ afin de déterminer la dose et le volume d'application pour la gestion de *H. armigera* ; en milieu semi-champ et au champ, la probabilité d'atteindre une larve est plus faible compte tenu des barrières (plantes de cotonnier) pour une bonne couverture de l'application.

## Remerciements

Nous remercions l'Ambassade Royale des Pays-Bas près le Bénin qui a financé ce travail. Nous remercions également

les autres membres du Projet « Méthodes Alternatives de Lutte contre les Ravageurs du Cotonnier au Bénin ».

## Bibliographie

- Abbott W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18**, 265-267.
- Abdel-Razek A.S., Abbas M.H., El-Khouly M. & Abdel-Rahman A., 2006. Potential of microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) on two cabbage cultivars under different fertilization treatments. *J. Appl. Sci. Res.*, **2**, 942-948.
- Abebe H., 2002. *Potential of entomopathogenic fungi for the control of Macrotermes subhyalinus (Isoptera: Termitidae)*. PhD thesis: Universität Hannover (Germany).
- Adane K., Moore D. & Archer S.A., 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *J. Stored Prod. Res.*, **32**, 105-113.
- Ascher K.R.S., Eliyahu M. & Nemmy N.E., 1991. Inherent toxicity of the acylureas hexaflumuron and clorfluazuron against larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz*, **98**, 391-397.
- Bassi A., 1835. *Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge I bachi da seta*. Lodi, Italy: Tipografia Orcesi [English translation by Yarrow P.J., 1958. On the mark disease, calcinaccio or muscardine, a disease that affects silk worms. Ainsworth G.C. & Yarrow P.J., eds. *APS Phytopathol. Classics*, **10**, 1-49.
- Bateman R.P., 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook Agric.*, **26**, 13-18.
- Bateman R.P. et al., 1996. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Biocontrol Sci. Technol.*, **6**, 549-560.
- CABI & OEPP, 2003. *Fiche informative sur les organismes de quarantaine : Helicoverpa armigera*, [http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Helicoverpa\\_armigera/F-heliar.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Helicoverpa_armigera/F-heliar.pdf), (06/10/2009).
- Cherry A. et al., 1999. A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Sci. Technol.*, **9**, 35-51.
- De la Rosa W., Alatorre R., Trujillo J. & Barrera J.F., 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee borer (Coleoptera: Scolytidae) *J. Econ. Entomol.*, **90**, 1534-1538.
- Deshpande M.V. et al., 2001. Entomopathogenic fungi as myco-insecticides. In: *National Symposium on Plant Protection Strategies for Sustainable Agri-Horticulture, October 12-13, 2001, Jammu, India*.

- Douro Kpindou O.K., Djegui D.A., Glitho I.A. & Tamo M., 2012. Sensitivity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungi. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, (sous presse).
- Finney D.J., 1971. *Probit analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Godonou I. et al., 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.*, **28**, 220-224.
- Gopalakrishnan C. & Narayanan K., 1989. Studies on the susceptibility of *Heliothis armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch. *Entomon*, **14**, 191-197.
- Gowda J. & Prasad T.N.R., 1992. Occurrence of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on the red gram pod borer *Heliothis armigera* Hüb. *J. Biol. Control*, **6**, 48-49.
- Gundannavar K.P., Lingappa S. & Giraddi R.S., 2006. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. *Kartanaka J. Agric. Sci.*, **19**(4), 952-953.
- James B., Godonou I. & Atcha-Ahowe C., 2009. Promoting biopesticide candidates from experimental to commercial level for sustainable vegetable production. *Pestic. Manage. West Afr.*, **7**, 34-52.
- Johnson D.L. & Goettel M., 1993. Reduction of grasshopper populations following field. Application of the fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Technol.*, **3**, 165-175.
- Kulkarnia S.A. et al., 2008. Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. *Biocontrol Sci. Technol.*, **18**, 809-828.
- Lefebvre C.L., 1931a. Preliminary observations on two species of *Beauveria* attacking the corn borer, *Pyrausta nubilalis* Hübn. *Phytopathology*, **21**, 1115-1128.
- Lefebvre C.L., 1931b. A destructive fungus disease of the corn borer. *Phytopathology*, **21**, 124-125.
- Lomer C.J. et al., 1999. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agric. Forest Entomol.*, **1**, 71-88.
- Lomer C.J. et al., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.*, **46**, 667-702.
- Lujan S., Kongming W. & Yuyuan G., 2001. The pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Helicoverpa armigera* under different temperatures and humidities. *Acta Entomol. Sinica*, **44**(4), 501-506.
- Maddox J.V., 1982. Use of insect pathogens in pest management. In: Metcalf R.L. & Luckmann W.H., eds. *Introduction to insect pest management*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, USA: Wiley, 175-216.
- Parry G., 1982. *Le cotonnier et ses produits*. Collection Techniques agricoles et productions tropicales. Paris : Maisonneuve et Larose.
- Peveling R. & Demba S.A., 1997. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* Gams and rozsygal and toxicity of diflubenzuron, fenitrothion-esfenvalerate and profenofos-cypermethrin to nontarget arthropods in Mauritania. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **32**, 69-79.
- Prasad A. & Syed N., 2010. Evaluating prospects of fungal biopesticide *Beauveria bassiana* (Balsamo) against *Helicoverpa armigera* (Hübner): an ecosafe strategy for pesticidal pollution. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, **1**(3), 596-601.
- Preisler H.K. & Robertson J.L., 1989. Analysis of time-dose-mortality data. *J. Econ. Entomol.*, **82**, 1534-1542.
- Rao N.V., Rao K.T. & Reddy A.S., 1992. A note on the efficacy of insect growth regulators to manage gram caterpillar, *Helicoverpa armigera* Hübner. *J. Insect Sci.*, **5**, 169-171.
- Robertson J.L. & Preisler H.K., 1992. *Pesticide bioassay with arthropods*. London: CRC Press.
- SAS Institute Inc., 2003. *SAS® 9.1 2003. Qualification Tools User's Guide*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Teakle R.E. & Jensen J.M., 1985. *Heliothis punctigera*. In: Singh P. & Moore R.F., eds. *Handbook of insect rearing*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 313-322.
- Thomas M.B., Blanford S. & Lomer C.J., 1997. Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci. Technol.*, **7**, 327-334.
- Vandamme P. & Angelini A., 1966. Complexe pathogène chez *Helicoverpa armigera* Hübner. *Coton Fibres Trop.*, **21**, 333-338.
- Wilson A.G.L., 1983. Abundance and mortality of overwintering and spring emergence of *Heliothis* spp. *J. Aust. Entomol. Soc.*, **22**, 191-199.

(38 réf.)