

RAPPORT DE STAGE DE 2ÈME ANNEE ORSTOM

effectué à la

Station de Recherches
de Lutte biologique INRA

présenté par

N'DOYE M'Baye

SUJET : Etude de la sensibilité de la pyrale du riz *Chilo suppressalis*
WALKER aux *Fungi Imperfecti*.

Paris, septembre 1974

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Biologie de *Chilo suppressalis*
les oeufs et la ponte
les larves
les chrysalides
les adultes
conclusion

CHAPITRE II : La technique d'élevage de masse de la pyrale du riz en laboratoire

- A. Bref historique de l'élevage du *Chilo suppressalis*
- B. Elevage de la pyrale suivant la méthode GUENNELON-SORIA
 - . Elevage des adultes et ponte
conditions d'incubation des oeufs
durée de vie des adultes
 - . Elevage des larves
le milieu d'élevage
conditions d'élevage des larves
conditions de chrysalidation
- C. Conclusions

CHAPITRE III : Etude de la sensibilité du *Chilo suppressalis* aux *Fungi Imperfecti*

- A. Aperçu bibliographique sur les maladies du *Chilo suppressalis*
- B. Essais préliminaires sur la sensibilité de *Chilo suppressalis* aux Deutéromycètes
 - . Matériel et méthode
 - . Expérimentation et traitement du matériel biologique
préparation de la suspension entomopathogène
traitement du matériel biologique
élevage des insectes traités
analyse des résultats
 - . Résultats préliminaires
- C. La mycose à *Beauveria bassiana*
 - . Historique
 - . Caractéristiques de *Beauveria bassiana*
- D. Influence de la quantité de spores
 - . Action de la nipagine sur la sensibilité des larves à la mycose
 - . Influence de ~~la quantité de spores~~

Conclusion

CONCLUSIONS GENERALES

INTRODUCTION

Les développements intervenus dans la lutte contre les insectes nuisibles et la sensibilisation de l'opinion publique aux problèmes de toxicologie et plus particulièrement à ceux posés par les résidus pesticides, ont rendu très urgente la nécessité de mettre au point de nouveaux moyens de lutte contre les ravageurs des cultures.

Mais, il y a déjà plus d'un siècle, alors que les interventions par des moyens chimiques contre les insectes nuisibles étaient très limités et peu efficaces, les précurseurs de la lutte biologique avaient montré la possibilité d'utiliser les organismes entomopathogènes dans la lutte contre ces ravageurs (METSCHNIKOFF, 1879).

Cependant, l'euphorie provoquée chez les entomologistes par les premières observations devait très vite se transformer en déception après des échecs répétés. Il fallut attendre les années 1950, avec les problèmes posés par l'emploi généralisé de la lutte chimique, pour que les méthodes de lutte biologique regagnent l'intérêt de l'opinion et des pouvoirs publics. C'est en effet au cours de cette période que, dans de nombreux pays (Etats-Unis d'Amérique, Union Soviétique, France), des laboratoires ont été créés pour étudier les possibilités d'utilisation des germes pathogènes contre les insectes ravageurs des cultures.

Le groupe des microorganismes pathogènes pour les insectes est très vaste et très divers. Depuis les premières muscardines observées sur le ver à soie par les sériciculteurs italiens et français, de nombreux autres types de germes ont été recensés et nombre d'entre eux ont été expérimentés avec succès, entraînant souvent leur utilisation sur une grande échelle. L'essentiel des travaux effectués dans ce domaine se trouve dans les synthèses de : ANGUS et HEIMPEL (1959) ; BUCHER (1956) ; FRANZ (1961) ; HURPIN (1961 et 1968) ; FERRON (1967) ; BURGESS et al. (1971).

De par leur importance historique, mais aussi de par le nombre très élevé d'espèces pathogènes connues, et enfin, de par la facilité d'observation de leurs symptômes, les champignons entomopathogènes occupent une place de premier ordre dans ce groupe des microorganismes pathogènes.

Le travail que nous avons effectué à La Minière a consisté en l'étude des conditions d'infection des *Fungi Imperfecti* sur *Chilo suppressalis* (Lépidoptère, *Pyralidae*, *Crambinae*), qui vit en foreur, à l'état larvaire dans la tige du riz (*Oryza sativa*).

Cette céréale qui est la nourriture de base de plus de la moitié de la population du Globe et qui occupe le 1/5 des surfaces céréalières du monde (soit environ 124 millions d'ha) subit de graves dégâts dus à cette pyrale. Les aires de pullulation de celle-ci sont aujourd'hui le lieu d'interventions chimiques d'une rare intensité, mais, malgré le nombre important de ses prédateurs, parasites et pathogènes, la littérature ne signale pas d'utilisation de méthode biologique de lutte contre ce borer.

Le *Chilo suppressalis* a été depuis très longtemps l'objet d'une attention particulière de la part des entomologistes, qui ont déjà précisé les points principaux de sa biologie, de son écologie et de son éthologie (KUWANA, 1929 ; GOMEZ-CLEMENTE, 1948 ; KIRITANI et IWAO, 1964) et qui ont réussi à mettre au point son élevage de masse (KAMNO, 1973 ; ISHII, 1971 ; GUENNELON et SORIA, 1973).

C'est donc en bénéficiant de toutes ces données que nous avons essayé de comprendre quelles conditions favorisent le développement des muscardines de la pyrale du riz.

CHAPITRE I

BIOLOGIE DE *Chilo suppressalis*

Le borer asiatique du riz, *Chilo suppressalis* WALKER, est un ravageur bien connu des riziculteurs. Il est originaire de l'Asie où il cause encore aujourd'hui des dégâts très importants, mais on le trouve également sur tous les continents.

L'abondante littérature qui lui a été consacrée depuis le début de ce siècle (BOUNIAS, 1973), permet d'avoir une bonne connaissance de la biologie, du comportement et de l'écologie de cet insecte.

C'est un Lépidoptère *Pyraloidea*, *Pyralidae*, de la sous-famille des *Crambinae*. Il a fait pendant longtemps l'objet de nombreuses confusions. Aussi le trouve-t-on dans la littérature sous les noms de :

Chilo simplex BUTLER
Crambus suppressalis WALKER
Chilo oryzae FLETCHER

Le nom de *Chilo suppressalis* WALKER, actuellement employé, n'a été définitivement retenu qu'en 1958.

Comme toutes les autres espèces de *Crambinae*, *Chilo suppressalis* est caractérisé par un important développement des palpes chez les adultes des deux sexes. Le dimorphisme sexuel n'apparaissant chez ces derniers qu'au niveau de la coloration et de la taille : les mâles sont brun foncé et généralement plus petits que les femelles colorées d'un jaune-bistre clair.

Chez les chrysalides la séparation des sexes, bien que plus difficile, peut se faire par une simple observation de l'extrémité abdominale, qui présente, selon le sexe, un dessin différent sur les trois derniers segments. Il est évident que la vie endophyte de ce ravageur a rendu très difficiles d'abord l'étude de sa biologie, ensuite la mise au point des méthodes de lutte.

1. Les oeufs et la ponte

Dans la nature, les oeufs sont pondus par ooplaques, d'une cinquantaine d'oeufs en moyenne, sur la face inférieure des feuilles (KUWANA, 1929). Ces oeufs donnent des larves du premier stade une semaine environ après la ponte. Cette durée d'incubation a fait l'objet d'observations assez discordantes. En effet, alors que GOMEZ-CLEMENTE (1948) indique, en Espagne, un temps d'incubation de 10 à 15 jours, KATSUMATA (1934) donne au Japon des durées d'incubation de 8 jours pour les oeufs de première génération et 6 jours pour les oeufs de deuxième génération.

Signalons toutefois que, dans notre élevage artificiel à 25°C, 90 à 100 % d'H.R. et 6 h d'éclaircissement sur 24, nous avons observé des durées d'incubation de l'ordre de 7 jours. Tous les oeufs ont éclos entre 5 et 8 jours.

Selon les indications de KATSUMATA, il est vraisemblable que, dans la nature, la durée d'incubation soit liée non seulement aux différentes générations du borer, mais également à la température et à l'humidité ambiantes.

En ce qui concerne les effets propres à la température sur le développement de l'œuf, HARUKAWA et al. (1931) indiquent qu'au Japon le zéro de développement se situe à 12°C alors que GOMEZ-CLEMENTE (1948) en Espagne donne la valeur de 14°9 qui est très élevée à notre avis. L'optimum de développement est à 25-26°C.

L'humidité est un facteur très important dont l'action est étroitement liée à celle de la température. L'œuf se développe normalement entre 13 et 36°C lorsque l'humidité relative dépasse 70 % (DOKE, 1936).

2. Les larves

Chilo suppressalis est une espèce polyvoltine, présentant en Espagne et au Japon deux générations annuelles et le plus souvent le début d'une troisième. Le développement de la larve est plus ou moins rapide selon la génération considérée. Il est de l'ordre de 36 jours en laboratoire (SATO, 1964) et de 30 à 60 jours dans la nature (GOMEZ-CLEMENTE, 1948) pour la première génération. La deuxième génération se développe dans des délais similaires alors que la troisième, qui hiverne au cinquième stade larvaire, peut avoir un temps de développement de l'ordre de dix mois.

Le nombre de stades larvaires est bien défini (KATSUMATA, 1934) bien qu'il soit très difficile de les différencier. Dans la nature, ce nombre est de 5 à 7 en première génération et de 6 à 9 en deuxième génération.

Au niveau des trois premiers stades, qu'il est très aisé de reconnaître, nous avons relevé dans l'élevage artificiel à 25°C des durées de 6 à 7 jours en moyenne pour chacun de ces stades.

La différenciation des stades peut se faire par la mesure de la taille des capsules céphaliques, mais il semble que la mesure des dimensions des mandibules donne de meilleurs résultats (YAGI et KATSUMATA, 1935).

La température, l'humidité et dans une moindre mesure la lumière, agissent sur la croissance larvaire. Sur milieu artificiel, à la température de 25°C et 100 % d'HR, nous avons obtenu des durées de développement larvaire de l'ordre de 30 à 45 jours.

Le comportement des larves est aléatoire (KUWANA, 1929 ; GOMEZ-CLEMENTE, 1948 ; YAMAZAKI et HATAI, 1960) et leurs réactions très variées (YAMAZAKI et HATAI, 1960 ; FUKAYA, 1955 ; SATO et MORIMOTO, 1962) bien qu'elles vivent toujours en borer dans la tige du riz.

Lorsqu'au laboratoire nous avons élevé des larves sur du riz cultivé en pots, nous avons pu constater qu'au 3ème stade larvaire presque toutes les larves ont quitté les tiges de riz. L'épuisement de la nourriture nous a semblé être le facteur déterminant de ce comportement. Un tel comportement a été observé dans la nature par les auteurs japonais. Signalons enfin l'observation de MORIMOTO (1960) selon laquelle les larves sont grégaires pendant les trois premiers stades et se dispersent aux stades suivants. Ceci nous a amené, tout en tenant compte des indications de GUENNELON (1973) sur la densité optimale des larves dans les boîtes d'élevage, à choisir le nombre de 50 individus par boîte (cf. Chapitre II).

3. Les chrysalides

Les chrysalides se forment dans les tiges, les chaumes ou la paille (KUWANA, 1929 ; MUELLER, 1970), de préférence lorsque le diamètre est voisin de 4 mm (IYATOMI, 1936). La nymphe peut également se faire entre la gaine et la tige (GOMEZ-CLEMENTE, 1948).

Le développement des chrysalides est conditionné par la température et l'humidité, mais il semble selon KUWANA (1929) qu'il soit très lié à la génération. Les chrysalides de première génération donnent des insectes parfaits au bout de 7 à 8 jours alors que les imagos de la deuxième génération ne sortent que deux semaines après la nymphe. GOMEZ-CLEMENTE donne des temps de développement plus longs, respectivement de 10-12 jours pour la première génération et 22 jours pour la seconde.

En ce qui concerne les effets de la température sur le développement des chrysalides, HARUKAWA (1931) puis DOKE (1936) ont montré que le taux d'émergence augmente linéairement entre 15 et 30°C puis baisse rapidement au-dessus de 35°C. Dans ce dernier cas la mortalité est très élevée et les imagos sont souvent déformés.

Nous avons pu élever à la température de 15°C, pendant 30 jours et sans dommage apparent, des chrysalides de *Chilo suppressalis*. Ceci ralentit considérablement le développement. Signalons cependant que lorsqu'on place en pondoir des adultes issus de chrysalides qui ont subi un tel traitement, on constate une baisse très nette de fertilité et de fécondité.

L'humidité ne semble pas avoir une très grande influence sur le développement des chrysalides, mais en élevage artificiel on doit toujours veiller à ce qu'elle dépasse le taux de 70 % d'HR pour assurer à ces dernières les meilleures conditions de croissance.

4. Les adultes

Les papillons s'accouplent dans les heures qui suivent leur éclosion et pondent dans les 24 à 48 heures suivantes. Dans la nature, les adultes de première génération émergent en mai-juin et ceux de deuxième génération en août-septembre au Japon (KUWANA, 1929). En Espagne, GOMEZ-CLEMENTE signale un décalage des sorties, surtout pour la première génération, qui commence à voler dès le mois d'avril. Les adultes ne vivent pas très longtemps ; un maximum de durée de vie de trois semaines est indiqué par KUWANA (1929), mais il semble, selon BALACHOWSKY (1972), que celle-ci est fonction de la température.

Conclusion

Le cycle complet du *Chilo suppressalis* peut varier de 40 à 65 jours lorsqu'il s'effectue sans diapause ; mais lorsqu'intervient cet arrêt de développement, l'évolution de l'oeuf à l'adulte peut durer 300 jours.

La température joue un rôle plus important que l'humidité sur le développement des différents stades. Celle-ci doit cependant se situer à un taux au moins égal à 70 % d'HR. Il est donc nécessaire de conduire l'élevage de masse dans les conditions optimales pour obtenir un cycle suffisamment court et disposer au moment voulu des lots d'insectes nécessaires aux expériences.

Les exigences du borer, telles que nous les avons décrites, recoupent celle du riz qu'il parasite et, nous le verrons ultérieurement, celles de la plupart des *Fungi Imperfecti*.

CHAPITRE II

LA TECHNIQUE D'ELEVAGE DE MASSE DE LA PYRALE DU RIZ EN LABORATOIRE

Nous avons pu constituer une souche de *Chilo suppressalis* à partir d'un élevage entretenu au Laboratoire d'Entomologie de l'IRAT-Nogent, dirigé par M. BRENIERE, et qui est conduit selon la méthode récemment mise au point à la Station de Zoologie INRA d'Avignon (GUENNELON et SORIA, 1973). Nous adopterons, à peu de chose près, cette méthode qui, selon ses auteurs et nos propres constatations, donne d'excellents résultats pour l'élevage de masse de la pyrale du riz.

Cette méthode permet de disposer à tout moment du nombre d'insectes voulu, au stade de développement choisi, condition nécessaire pour l'exécution des tests biologiques.

Nous avons eu à apporter un certain nombre d'adaptations dues aux conditions particulières dans lesquelles nous avons travaillé à La Minière.

A. BREF HISTORIQUE DE L'ELEVAGE DU *Chilo suppressalis*

L'élevage artificiel d'un insecte n'a d'autre but que de pouvoir disposer d'un nombre suffisamment important d'individus de l'espèce considérée afin d'en étudier soit la biologie, l'écologie et l'éthologie, soit les moyens de lutter le plus efficacement possible contre lui tout en étant libéré des contraintes posées par la culture de la plante hôte en toute saison. Les chercheurs japonais ont, dès 1952, essayé de mettre en élevage artificiel le *Chilo suppressalis* pour mieux cerner sa biologie (KANEKO et FUKAZAWA, 1952).

Les premières tentatives ne devaient pas être très concluantes et il fallut attendre les travaux de SATO (1964) pour qu'on arrive à élever correctement la pyrale du riz.

En ce qui concerne l'élevage sur milieu artificiel, les principaux résultats obtenus par les auteurs japonais ont été synthétisés par ISHII (1971) et KAMANO (1973). Il apparaît très clairement que les hydrates de carbone (Saccharose, glucose, fructose) de même que 9 vitamines et 10 acides aminés sont indispensables à la croissance et au développement de la larve. Par contre, les larves peuvent se développer sur un milieu artificiel ne contenant aucun acide gras si celui-ci renferme du cholestérol.

L'orientation générale des recherches est de trouver un milieu le plus simple possible et d'un prix de revient relativement bas, mais qui puisse assurer le maintien de l'élevage pendant de nombreuses générations. C'est ainsi que KAMANO (1973) a mis au point un milieu assez simple additionné de semoule de maïs, ce qui a permis d'avoir des résultats satisfaisants comparativement aux milieux complexes utilisés jusque-là.

B. ELEVAGE DE LA PYRALE SUIVANT LA METHODE GUENNELON-SORIA

1. Elevage des adultes et ponte

Dans la nature les oeufs sont déposés de préférence sur la face inférieure des feuilles. Au laboratoire il est assez facile de faire pondre les papillons sur du papier gaufré. La cage est constituée d'une boîte parallépipédique en matière plastique transparente de 27 x 8 x 13 cm dans laquelle on place un abreuvoir rempli d'une solution de saccharose à 5 % et muni d'un coton dentaire. De plus, les parois de ce pondoir sont tapissées du papier gaufré destiné à recevoir les oeufs.

Nous plaçons 15 à 30 couples de chrysalides sexées, 1 à 2 jours après la nymphose, dans une boîte à pilules que nous introduisons dans le pondoir placé à 25°C, 16 heures de photopériode sur 24 et 80 % à 100 % d'HR. Cette solution évite la manipulation des adultes après l'émergence. En général, un tampon de coton humide est également introduit dans le pondoir pour maintenir l'hygrométrie à un niveau optimal.

Au bout d'une dizaine de jours, on échange le ruban de papier gaufré qui porte les premières pontes. On procédera de même tous les matins jusqu'à la fin de la ponte.

a. Conditions d'incubation des oeufs

Le ruban de papier qui porte les ooplaques est découpé en plusieurs morceaux placés dans une boîte en matière plastique tapissée au préalable d'une rondelle de papier filtre humidifié. Cette boîte est introduite dans une autre plus grande de 100 x 70 cm et le tout hermétiquement fermé. L'incubateur ainsi préparé est placé à 25°C, 80 à 100 % d'HR et 16 h sur 24 de photopériode. Dans ces conditions tous les oeufs éclosent dans un délai de 5 à 7 jours.

b. Durée de vie des adultes

Les adultes qui s'accouplent peu de temps après leur émergence, pondent dans les 24 à 48 heures. Dans les conditions d'élevage que nous avons décrites plus haut, nous avons observé des longévités de 72 heures à 7 jours.

2. Elevage des larves

Le choix de cette méthode est guidé par le souci d'utiliser un milieu simple, facile à préparer et peu coûteux.

a. le milieu d'élevage

Pour élever les larves de *Chilo suppressalis*, GUENNELON et SORIA (1973) se sont inspirés de la technique mise au point par POITOUT et RUEF (1970) pour l'élevage sur milieu artificiel des larves de *Noctuidae*. Il a fallu cependant réduire la teneur en eau du milieu POITOUT pour pouvoir y élever la pyrale du riz. La formule employée se présente donc comme suit :

eau	600 ml
agar	16 g
semoule de maïs	112 g
germe de blé	28 g
levure de bière	30 g
acide ascorgique	4 g
acide benzoïque	1,20 g
nipagine	1 g
auréomycine en poudre	0,1 g

L'agar et 300 ml d'eau sont portés à l'autoclave à 110°C pendant 10-15 mn, le reste des poudres à l'exclusion de l'acide ascorbique thermolabile à plus de 50°C et de l'auréomycine est mélangé aux 300 ml d'eau restant et le tout mélangé au mixer.

L'agar autoclavé est mélangé au reste des produits ce qui abaisse fortement la température. C'est à ce moment seulement qu'on ajoute l'acide ascorbique et l'auréomycine. On coule ensuite le milieu ainsi préparé dans des boîtes en plastique transparent de 80 x 50 cm, sur une hauteur de 1 à 1,5 cm.

Les larves néonates sont mises en élevage sur ce milieu après avoir éliminé l'eau qui se condense sur les parois de la boîte et strié le milieu pour qu'il puisse être facilement entamé.

b. Conditions d'élevage des larves

Les larves sont élevées comme les chrysalides, les adultes et les oeufs à 25°C, 90 à 100 d'HR avec une photopériode de 16 h sur 24. Pratiquement, une fois que les L1 sont placées sur le milieu, l'élevage évolue normalement sans aucune manipulation jusqu'au moment de la chrysalidation. Les larves pénètrent dans le milieu d'où elles ne ressortent que pour se nymphoser. Certaines même "se laissent surprendre" par la nymphose dans les galeries qu'elles ont creusées dans le milieu.

Si pratiquement tous les oeufs d'une même ooplaque éclosent en même temps, les larves issues de cette ponte peuvent évoluer différemment même lorsqu'elles sont élevées dans les mêmes conditions. Ceci fait que la chrysalidation s'étale sur de nombreux jours. Signalons toutefois que les premières chrysalides apparaissent dès le 28ème jour d'élevage des larves.

MORIMOTO (1960) de même que PATHAK (1969) ont indiqué que les larves sont grégaires au cours des trois premiers stades et se dispersent aux stades suivants. L'isolement des larves aux premiers stades tout comme leur regroupement aux derniers, entraîne une forte mortalité. Ces observations nous ont amené contrairement à GUENNELON et SORIA (1973) qui élèvent les larves par groupe de 30 dans les boîtes rondes 80 x 50 cm, à faire des lots de 50 à 70 aux premiers stades et de 25 au maximum aux stades plus avancés. Un tel procédé donne de bons résultats mais nous oblige à manipuler les larves.

c. Conditions de chrysalidation

Les premières chrysalides apparaissent au bout de 28 à 30 jours après la mise en élevage des larves néonates.

Les larves âgées, comme du reste les jeunes chenilles, manifestent un géotropisme négatif très important. De plus on peut remarquer un certain cannibalisme des larves du dernier stade vis à vis des premières chrysalides formées et des larves malades ou blessées.

On place à la partie supérieure d'une boîte ronde (100 x 70 cm) un ruban de papier gaufré et on dépose dans cette dernière la petite boîte de 80 x 50 cm contenant 25 larves âgées. La boîte de nymphose hermétiquement fermée est placée dans les conditions optimales de 25°C, 16 h de photopériode sur 24 et 80 à 100 % HR. Les larves qui grimpent le long de la paroi se nymphosent dans les cannelures du papier. Les chrysalides sont prélevées tous les 2 jours et mises en élevage dans les pondoirs dans les conditions décrites plus haut.

C. CONCLUSIONS

Le cycle complet du *Chilo suppressalis*, élevé dans les conditions que nous avons décrites, est de l'ordre de 45 à 70 jours. Il est par conséquent beaucoup plus long que celui des noctuelles élevées sur le même milieu par POITOUT, GUENNELON et SORIA l'ont déjà constaté.

Nous avons pu maintenir de façon acceptable l'élevage du borer sur milieu artificiel mais nous avons également essayé de l'élever parallèlement sur riz cultivé en pot. Il est bien évidemment plus difficile de maintenir ce dernier élevage du fait d'une forte mortalité larvaire au premier stade et du fait aussi d'un plus grand nombre de manipulations nécessaires.

Le phénomène de consanguinité ne s'est pas posé à nous bien qu'il soit à redouter comme dans tout élevage de masse. KAMNO et FUKAYA (1964) proposent l'élevage de souches parallèles alors que GUENNELON et SORIA (1973) pensent qu'il faut capturer de temps à autre des papillons dans la nature pour maintenir le potentiel génétique de la souche. Nous avons, quant à nous, compte tenu de notre situation particulière, préféré partir d'une souche très importante (environ 5000 larves) pour éviter les accidents de l'inbreeding.

C'est ainsi que nous sommes arrivés à produire la "quantité" d'insectes que nous avons voulu pour entreprendre les tests biologiques sur la pathogénicité des champignons entomopathogènes (Deutéromycètes) pour le *Chilo suppressalis*.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA SENSIBILITE DU *Chilo suppressalis* AUX *Fungi Imperfecti*

A. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES MALADIES DU *Chilo suppressalis*

Comme pour les autres insectes, les pullulations des populations naturelles de la pyrale du riz peuvent être limitées par les parasites et pathogènes qui colonisent le même biotope.

C'est ainsi que des Protozoonoses (NICKEL, 1964), des Viroses (TANADA, 1965), des Bactérioses (HIRANO, 1964 ; YASUMATSU, 1968) et des Mycoses (TATEISHI, 1951 et 1955 ; MORIMOTO, 1959 ; RAO, 1964) ont été signalées sur le *Chilo suppressalis*.

En dehors des mycoses, aucune de ces maladies n'a fait l'objet d'études très approfondies. Et, de toute façon, il n'y a pas encore, du moins à notre connaissance, d'utilisation d'un microorganisme pathogène dans la lutte biologique contre la pyrale du riz.

En ce qui concerne les mycoses, de nombreux exemples ont déjà été signalés surtout par les auteurs japonais qui ont beaucoup étudié le *Chilo suppressalis*. TATEISHI remarque, dès 1951, les attaques d'un *Cordyceps* sur la pyrale du riz et en 1955, celles de l'*Aspergillus flavus* et d'un *Spicaria*. Il semble cependant que les plus grands ravages sont causés aux larves hivernantes du borer par l'*Isaria* \times *farinosa* (KAMANO et INOUE, 1955). Les modalités d'attaque de la pyrale par ce champignon appelé "yellow muscardine disease" sont sous le contrôle de nombreux facteurs parmi lesquels la température (WADA, 1957). TATEISHI et MURATA (1955) ont trouvé que dans la nature l'*Isaria farinosa* pouvait provoquer des épizooties qui entraînent une mortalité de 100 %.

Un rôle important dans la limitation des pullulations du *Chilo suppressalis* est attribué à l'*Oospora destructor* * qui, semble-t-il, résiste bien aux insecticides de synthèse organophosphorés et organochlorés (MORIMOTO, 1959). Cette espèce peut donc être intéressante dans le cadre d'une opération de lutte intégrée.

* Le genre *Isaria* correspond dans la nouvelle classification des Deutéromycètes de SACCARDO au genre *Paecilomyces* (*Isaria farinosa* = *Paecilomyces farinosus*), et dans cette même classification l'espèce *Oospora destructor* devient *Metarrhizium anisopliae*.

En 1964, RAO découvre en Inde, dans la nature, des attaques de *Beauveria bassiana* sur le *Chilo suppressalis*. RAO indique en outre que le *Cordyceps* affecte plutôt le *Tryporyza incertulas*, alors que ce genre fut le premier signalé sur la pyrale.

Signalons enfin l'étude de KOIDSUMI (1957) qui a procédé à des contaminations des larves du borer du riz avec des spores de *Beauveria bassiana* et d'*Aspergillus flavus*. Il a pu montrer que les lipides cuticulaires des larves de *Chilo suppressalis* avaient un effet inhibiteur très net sur la formation et la germination des spores et sur la croissance mycélienne. Une telle idée n'est pas partagée par de nombreux auteurs car nous verrons qu'il est possible de contaminer les larves avec des suspensions de spores par simple pulvérisation.

B. ESSAIS PRELIMINAIRES SUR LA SENSIBILITE DE *Chilo suppressalis* AUX DEUTEROMYCETES

L'élevage du *Chilo suppressalis* tel que nous l'avons décrit plus haut, permet de réaliser les tests biologiques nécessaires en vue de choisir un biotype très virulent pour les études ultérieures.

Il est établi depuis longtemps déjà (PAILLOT, 1933 ; FERRON, 1966 ; VAGO, 1959) que l'infection des insectes par les champignons entomopathogènes se fait essentiellement par voie tégumentaire. Cependant le tégument de l'insecte constitue pour le champignon un obstacle qu'il faut franchir. Les blessures naturelles (VAGO, 1959) comme l'abrasion artificielle du tégument (FERRON, 1966) facilitent l'infection des larves d'insectes par les mycoses. KOIDSUMI (1957) pense que ce sont les lipides cuticulaires qui jouent le plus grand rôle dans la défense de l'insecte contre cette infection.

WADA (1957) et OHO et al. (1961) ont montré que les larves hivernantes (au stade L5) de *Chilo suppressalis* sont très sensibles à l'*Isaria farinosa* et aussi au moment de la prénymphe, du fait de l'état physiologique des larves.

Nous avons essayé de tenir compte de tous ces travaux, en traitant, pendant les essais préliminaires, à la fois des chrysalides et des larves âgées, au dernier stade larvaire L5, L6 ou L7 (les conditions d'élevage de la pyrale ne lui permettent pas d'entrer en diapause).

Nous avons retenu le mode de contamination par pulvérisation du tégument compte tenu des commodités qu'elle présente.

1. Matériel et méthode

Nous traitons à la fois des chrysalides et des larves âgées. Les chrysalides sont prélevées de l'élevage tous les deux jours. Par conséquent les chrysalides utilisées pour l'expérimentation sont âgées de 24 à 48 heures. Les larves, quant à elles, sont choisies en moyenne 30 jours après leur mise en élevage au stade L1. On ne retient que des larves qui sont apparemment dans le même état physiologique et qui n'ont pas encore commencé la mue prénymphe.

Pour ce qui concerne les champignons, nous avons utilisé des souches de la mycothèque de la Station INRA de Lutte biologique de La Minière. Ces souches appartiennent toutes aux espèces suivantes : *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. ; *B. tenella* (DELACR.) SIEM. ; *Paecilomyces farinosus* (DICKS) BROWN et SMITH ; *P. fumoso-roseus* WIZE ; *Spicaria rileyi* FARLOW et *Metarrhizium anisopliae* (METSCH) SOR.

Nous retrouvons ici toutes les espèces dont le parasitisme a déjà été signalé sur le *Chilo suppressalis*. Mais les souches utilisées n'ont pas toutes été isolées de la pyrale du riz tel que le montre le tableau 1. Ces différents biotypes sont multipliés dans les mêmes conditions au laboratoire et la mise en suspension et le traitement ont été effectués au bout du 14ème jour de culture sauf pour les deux souches de *Spicaria rileyi* qui se cultivent mal. Pour ces deux dernières souches il nous a fallu attendre un mois de multiplication pour avoir une suspension titrant plus de 10^7 spores/ml avec un tube à essais.

TABLEAU n° 1 : Biotypes de Deuteromycètes étudiés.

Biotype testé	Hôte	Origine	Date isolement
<u>Beauveria bassiana</u>			
n° 34	<u>Chilo suppressalis</u>	IRAT - Nogent	?
n° 40	"	La Minière	1972
n° 55	<u>Diatraea saccharalis</u>	Cuba	1972
n° 28	Doryphore	Versailles	avril 1971
n° 58	"	Pologne	sept. 1973
n° 32	"	Versailles	mars 1972
<u>Beauveria tenella</u>			
n° 6	<u>M. melolontha</u>	Sarthe	octobre 1964
<u>Paecilomyces farinosus</u>			
n° 15	<u>Cirphis unipuncta</u>	Saint Palais	26 oct. 1973
<u>P. fumoso roseus</u>			
n° 12	<u>Mamestra brassicae</u>	La Minière	décembre 1972
<u>Metarrhizium anisopliae</u>			
n° 71	Doryphore	La Minière	août 1972
n° 60	Noctuelle	?	octobre 1971
<u>Spicaria rileyi</u>			
n° 3	<u>Mamestra brassicae</u>	La Minière	?
n° 1	<u>Prodenia litura</u>	Bouaké	4 juin 1969

2. Expérimentation et traitement du matériel biologique

a. préparation de la suspension entomopathogène

Les spores du champignon multiplié sur milieu synthétique sont récoltées au bout de 14 jours et mises en suspension dans de l'eau à 2 ‰ de novémol. La suspension ainsi préparée est vigoureusement agitée avec des billes de verre pendant une dizaine de minutes pour disperser les spores et homogénéiser le mélange. Le novémol qui est un dialkyl sulfasuccinate de sodium joue ici un rôle de mouillant. Il est sans action insecticide, bactéricide, phytocide ou fongicide.

La suspension-mère étant préparée, on compte le nombre de spores par millilitre de suspension en utilisant l'hématimètre de Malassez. On opère au préalable une dilution par 100 fois de la suspension-mère. Dans ces conditions, le nombre de spores par millilitre de suspension-mère est donné par la formule suivante :

$$N = \frac{\text{nb de germes comptés à la cellule}}{\text{nb de grands carrés comptés}} \times \text{dilution} \times C$$

où $C = 10^5$ = constante de la cellule.

Signalons que le laboratoire s'est doté récemment d'un compteur électronique de particules qui donne directement la quantité de spores par millilitre de suspension, augmentant d'une part la précision des comptages (erreur systématique pouvant atteindre 20 % dans le cas de l'hématimètre et seulement 1 à 2 % à l'aide du compteur électronique) et réduisant considérablement le délai consacré aux comptages, d'autre part.

Connaissant la quantité de spores par millilitre de suspension-mère, il ne reste plus qu'à opérer les dilutions nécessaires pour obtenir des suspensions aux doses voulues.

Nous avons traité les larves et les chrysalides avec trois doses différentes : 10^6 spores/ml, dose faible ; 10^7 spores/ml, dose moyenne ; 10^8 spores/ml dose forte.

b. traitement du matériel biologique

Le traitement par pulvérisation des larves et des chrysalides est effectué à l'aide de la tour mise au point par BURGERJON (1956) (fig. n° 1) pour tester des préparations entomopathogènes principalement à base de *Bacillus thuringiensis* BERLINER. Cette tour répond à des exigences propres aux préparations insecticides biologiques et à leur manipulation. Elle assure une dispersion homogène et laisse un dépôt d'une quantité bien connue (5 mg de produit/cm² pour 10 ml de solution pulvérisée) sur le matériel traité.

La pulvérisation s'effectue par entrainement à l'aide d'un courant d'air comprimé. Le liquide aspiré dans le flacon sort en brouillard du bec pulvérisateur, il est brassé dans l'atmosphère de la tour et vient se déposer sur les larves ou les chrysalides. L'air pollué est ensuite brûlé avant d'être évacué à l'extérieur.

Nous préparons pour chacune des doses ci-dessus indiquées, une suspension de 10 ml avec laquelle nous traitons les larves ou les chrysalides déposées sur le fond d'une boîte de Pétri qui est posée sur le disque rotatif (33 tours/minute).

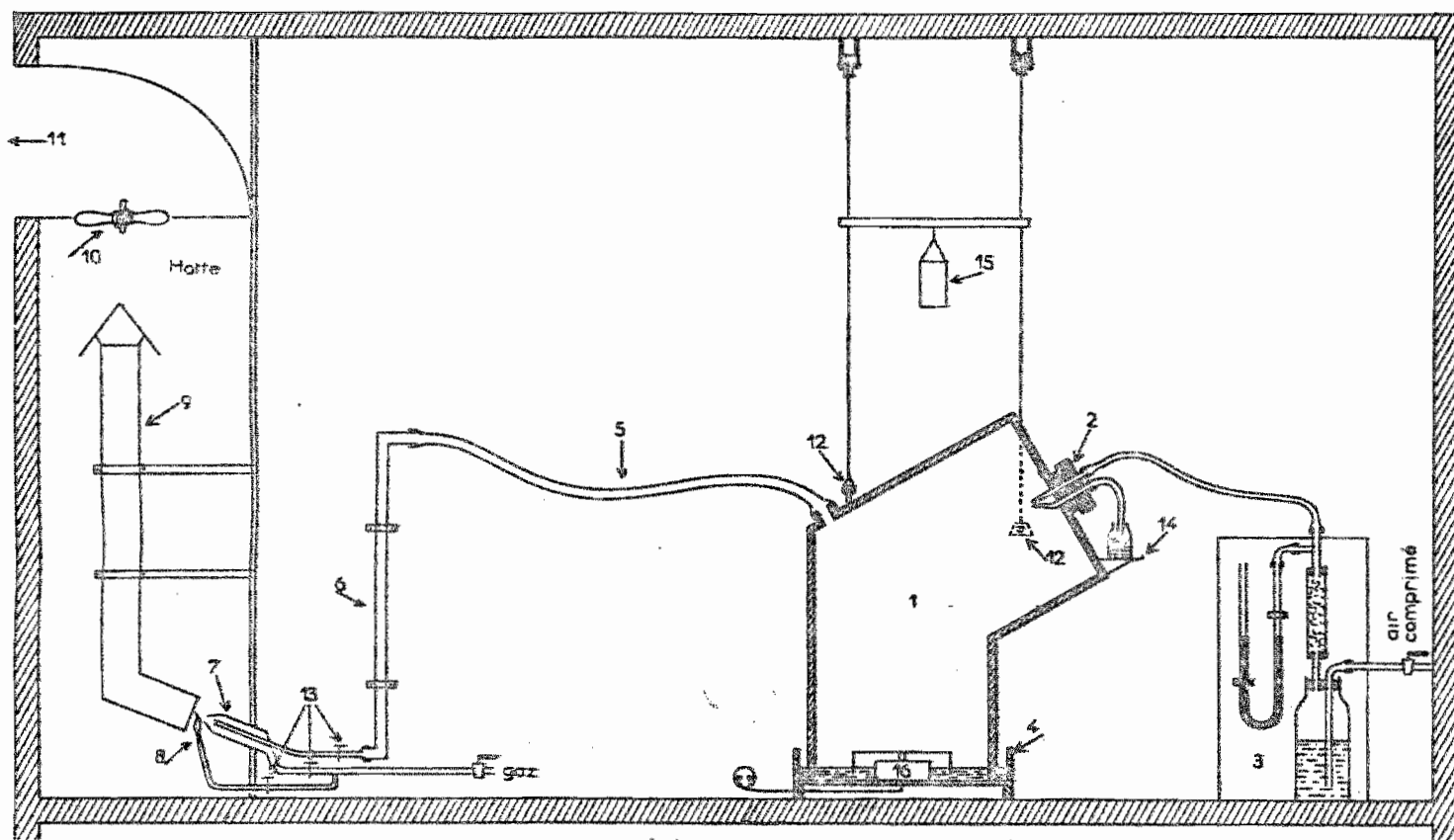


FIG. 1. — Vue schématique de l'installation entière. — 1) Tour en plexiglas Ø/30 cm. (intérieur), 4 mm épaisseur, hauteurs verticales : 476 et 295 mm, hauteurs obliques : 450 et 250 mm. — 2) Bec pulvérisateur ; bouchon en plexiglas pouvant se visser dans la tour ; l'étanchéité est assurée par un joint en caoutchouc. Dans ce bouchon se trouvent deux tubes de verre : l'un laissant passer l'air comprimé et l'autre aspirant le liquide à pulvériser. — 3) Ensemble de filtration de l'air comprimé et manomètre (filtration à travers de l'eau et une colonne de coton hydrophile). — 4) Cuvette remplie d'eau ou d'un bactéricide non volatil et disque rotatif propulsé par un petit moteur électrique. — 5) Tuyau flexible de 20 mm de diamètre intérieur, évacuant l'air pollué et permettant le mouvement de haut en bas et vice-versa de la tour. — 6) Tuyau rigide de 20 mm de diamètre. — 7) Chalumeau à gaz dont le tuyau intérieur de 10 mm de diamètre laisse passer de l'intérieur de la tour l'oxygène nécessaire pour une bonne combustion du gaz et fait brûler en même temps les germes pathogènes. — 8) Veilleuse. — 9) Tuyau de poêle guidant la chaleur dégagée par la flamme. — 10) Ventilateur. — 11) Ouverture faisant communiquer la hotte et l'extérieur. — 12) Crochets de suspension de la tour. — 13) 3 robinets de diverses conduites. — 14) Plateaux permettant de poser le flacon contenant la préparation à pulvériser. — 15) Contrepoids (flacon en polyéthylène rempli de plombs de chasse). — 16) Moteur (tournedisque).

Nous avons donc réalisé tous les tests par contamination directe des larves comme des chrysalides. Les chenilles du dernier stade larvaire prélevées au moment où elles quittent le milieu nutritif d'élevage pour préparer leur chrysalidation ne s'alimentent pratiquement plus et n'entrent donc plus en contact avec la nipagine contenue dans ce milieu.

c. élevage des insectes traités

Les chrysalides traitées sont mises en élevage pendant 48 h. à 20°C, 90-100 % d'HR et 16 h sur 24 de photopériode.

Les larves sont également élevées dans ces conditions et en plus elles sont privées de nourriture pendant 24 heures.

Au bout de ces 48 heures les larves comme les chrysalides sont ramenées aux conditions normales d'élevage à 25°C, 90-100 % d'HR et 16 sur 24 heures de photopériode. Dans ces conditions les premières mycoses commencent à apparaître au bout du 5e-6e jour.

d. analyse des résultats

Il n'est pas facile de déterminer la mort de l'insecte surtout pour les chrysalides. Lorsqu'elles sont en vie, elles répondent aux stimuli par des mouvements de la partie postérieure de l'abdomen ; mais l'intensité des mouvements diminue avec l'âge de la chrysalide. L'absence totale de mouvements ne peut donc pas présupposer la mort chez la chrysalide.

Pour ce qui concerne les larves, le point de vue de BEARD (in SHEPARD, 1960) peut être retenu : "La mort peut être très difficile à déterminer, mais très communément on considère que l'absence de mouvement, particulièrement une réponse négative aux stimuli chimiques et lumineux ainsi qu'à la chaleur, indique la mort." Nous avons pour notre part considéré comme mortes les larves qui ne répondent plus à aucune stimulation tactile et les chrysalides qui, tout en restant immobiles présentent un ratatinement de leur partie antérieure (photo 1) au lieu d'une distension de la partie abdominale (signe de l'émergence imminente du papillon).

Dans aucun des cas étudiés, le traitement n'a provoqué une mortalité immédiate de l'ensemble des insectes du lot. Beaucoup d'insectes sont tués dans les stades qui ont suivi le traitement et nous avons ainsi été amené à continuer la lecture des essais jusqu'à l'émergence des imagos issus des survivants.

Lorsque l'insecte mort est bien tué par le champignon, la mise en incubation du cadavre provoque la sortie du mycélium qui fructifie. Quelquefois, après manifestation des symptômes d'une infection par le champignon (mélanisation), l'individu mort présente un faciès de septicémie. Dans ce cas une observation complémentaire de l'hémolymphe de l'insecte révèle en général la présence de blastospores (formes de multiplication du champignon dans la cavité hoemocélienne) qui attestent le franchissement par le champignon de la barrière tégumentaire. Il y a enfin mort/septicémie, uniquement, lorsqu'on ne peut déceler la présence de ces blastospores sur un cadavre présentant un faciès de septicémie.

Tout ceci atteste la difficulté qu'il y a à déterminer la mort. Mais l'homogénéisation maximale du matériel aussi bien entomologique que fongique, l'utilisation de critères d'étude bien éprouvés et l'emploi de techniques sûres peuvent limiter les erreurs.

3. Résultats préliminaires

Les résultats obtenus après traitement des larves et des chrysalides, tels que les présentent les tableaux 2 et 3 permettent de constater que la réponse du *Chilo suppressalis* aux différentes souches est très variable. Ces résultats sont insuffisants pour le travail ultérieur que nous nous proposons de faire, mais une étude complémentaire permettra de mieux préciser les données brutes que nous avons obtenues.

Il se dégage néanmoins que toutes les souches de *Beauveria bassiana* testées, les 2 souches de *Metarrhizium anisopliae*, ainsi que la souche de *Paecilomyces fumoso-roseus* provoquent une mycose chez *Chilo suppressalis*. La souche de *Beauveria tenella* n° 6, les *Spicaria rileyi* n° 3 et n° 1 et le *Paecilomyces farinosus* n° 15 n'ont pas provoqué d'infection de la pyrale dans les conditions de l'expérience.

Lorsqu'on traite les larves, on observe la mycose non seulement au stade larvaire mais également aux stades nymphal et imaginal. Ces constatations posent le problème de la mortalité différée déjà étudiée par FARGUES (1972) mais aussi celui de la contamination des adultes car le même phénomène est observé lorsqu'on traite des chrysalides (photos 2 - 3 - 4 - 5). Nous ne nous appesantirons pas sur la mortalité différée, mais nous examinerons ultérieurement la contamination des adultes.

Une représentation sous forme d'histogramme des résultats du tableau 2 nous donne (figure 2) la mortalité totale et la mortalité par type de mycose mesurée pour les différentes souches de champignon testées sur larves à la dose de 10^7 spores/millilitre.

Pour ce qui est de la mortalité par mycose, les souches *M. anisopliae* 71 et *B. bassiana* 28 donnent les meilleurs résultats avec 75 % de mortalité. Mais la M.a. 71 permet d'obtenir 95 % de mortalité totale.

Cependant l'examen du tableau 2 montre que la B.b. 28 qui ne donne que 27,5 % de mortalité sur larves au stade larvaire, provoque 30 % de mortalité au stade imaginal alors que la M.a. 71 qui entraîne 40 % de mortalité larvaire ne tue aucun adulte. Ceci veut dire que la mortalité différée est nettement plus forte chez la B.b. 28 ce qui peut jouer dans la nature un rôle important dans la dissémination du germe pathogène. En effet les papillons infectés qui s'envolent vont disperser le champignon et c'est un aspect qui ne doit pas être négligé dans l'écologie du germe pathogène. C'est le facteur essentiel qui nous amènera à préférer la souche B.b. n° 28 au M.a. n° 71. En effet ces deux souches présentent encore la même virulence lorsqu'on traite les chrysalides (85 % de mortalité par mycose) mais dans ce dernier cas la mortalité différée sur adulte provoquée par la B.b. 28 est le double de celle provoquée par le M.a. 71.

La souche ainsi choisie est passée sur insecte pour augmenter la virulence, elle donne la B.b. 28 A. Mais la souche B.b. 28 A que nous avons obtenue se cultive moins bien sur milieu semi synthétique que la B.b. 28 et ceci nous amène à poursuivre nos tests avec la souche *Beauveria bassiana* 28.

Insectes atteints de mycose

Photo n° 1 : Chrysalides momifiées par *Beauveria bassiana* : le mycélium ressort par différents orifices notamment les stigmates



Photo n° 2 : Adulte tué à l'émergence après un traitement de la chrysalide avec *Metarrhizium anisopliae*

Photo n° 3 : Chrysalides momifiées par *Metarrhizium anisopliae* : le champignon a déjà fructifié sur les cadavres



Insectes atteints de mycose



Photo n° 4 : Fructification du *Beauveria bassiana*
sur chrysalide morte de mycose

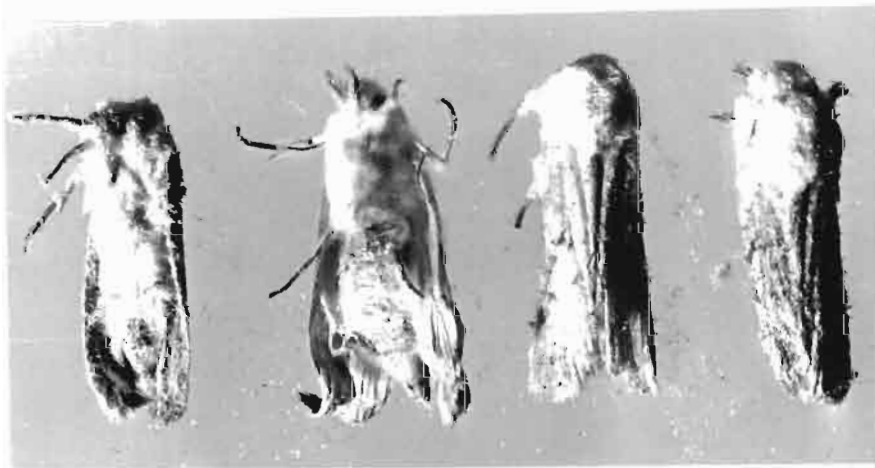


Photo n° 5 : Développement du *Beauveria bassiana*
sur adultes mycosés

TABLEAU n° 2 : Mortalité comparée sur larves en fonction des différentes souches étudiées : résultats exprimés en pourcentage.

Souches	nombre de larves	Mortalité larv.		Nb chrysalis des formées	Mort. nymphale		Nb IP éclos	Mort. imaginale par mycose	Mort. par mycose	Mortalité totale	
		mycose	septicé.		mycose	septicé.					
Beauveria bassiana	40	30	0	36,6	73,4	23,3	16,6	23,3	16,6	40	93,2
" "	55	20	10	0	90	20	5	65	0	30	35
" "	34	20	25	0	75	15	0	60	0	40	40
" "	28	40	27,5	2,5	70	17,5	0	52,5	30	75	77,5
" "	32*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" "	58*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. anisopliae	60	30	60	6,6	33,4	13,3	6,6	13,3	0	73,3	86,5
" "	71	20	40	10	50	25	10	15	0	75	95
Paecilomyces farinosus	15	30	0	40	60	0	20	40	0	0	60
P. fumoso roseus	12	20	25	0	75	25	5	45	15	65	70
Spicaria rileyi	3	20	0	10	90	0	20	70	0	0	30
" "	1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beauveria tenella	6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Souches non essayées sur larves

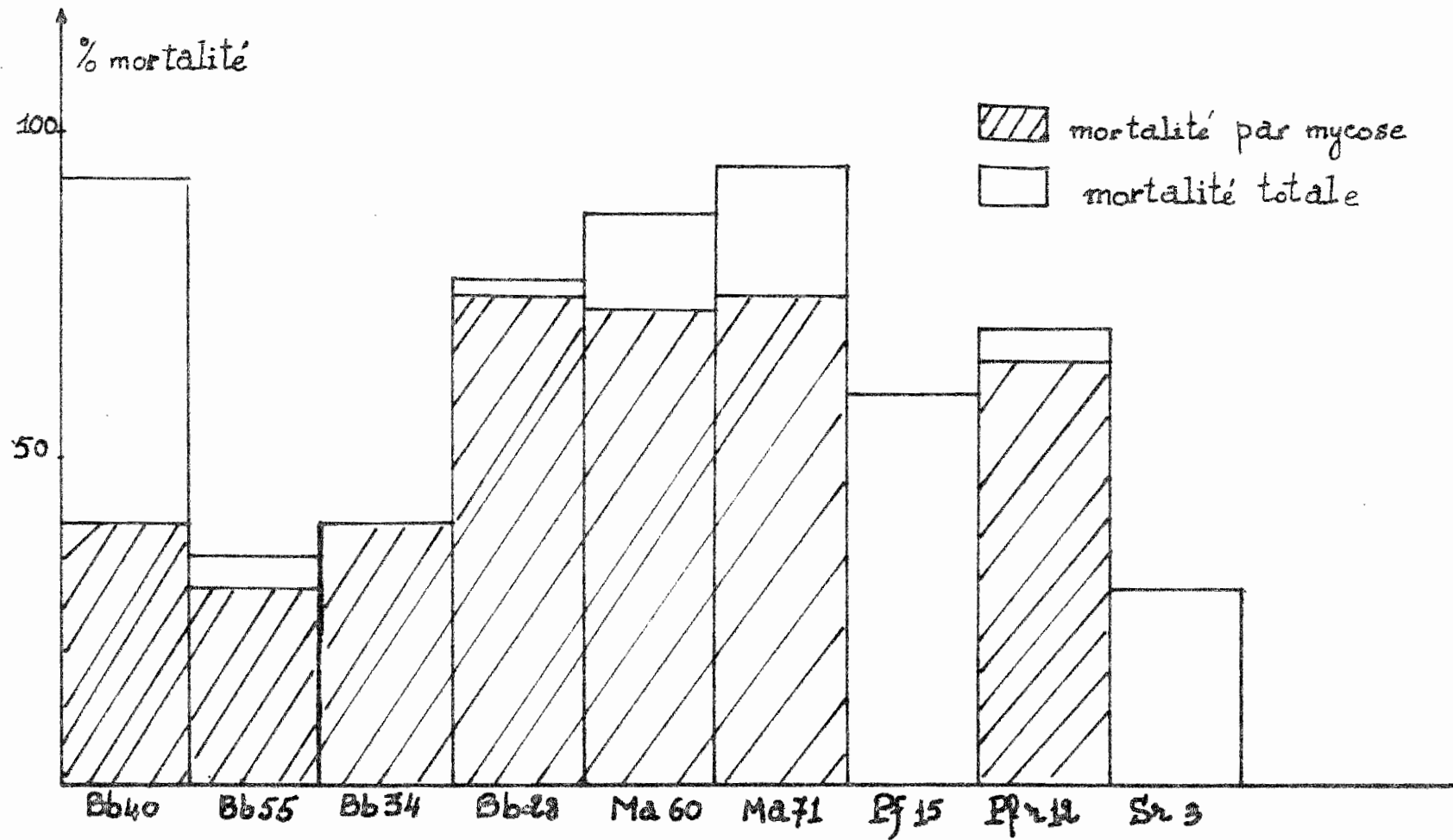


fig. 2 - Mortalités totale et par mycose enregistrées avec différentes sauches de champignon sur larves traitées à 10^7 sp./ml.

TABLEAU n° 3 : Mortalité comparée sur chrysalides en fonction de différentes souches : Pourcentage obtenu aux différents niveaux sur 20 *larves* traitées avec chaque souche.

Souches	Mortalité nymphale		Nb d'IP éclos	Mortalité imaginale par mycose	Mortalité totale par mycose	Mortalité totale
	mycose	septicémie				
B. bassiana 28	25	0	75	60	85	85
B. bassiana 58	30	10	60	40	70	80
B. bassiana 40	5	5	90	65	70	75
B. bassiana 32*	5	15	80	80	85	100
B. bassiana 34	0	0	0	0	0	0
B. tenella 6	0	0	0	0	0	0
Spicaria rileyi 1	0	0	0	0	0	0
Metarrhizium anisopliae 71	55	10	35	30	85	95

* Résultats obtenus avec une suspension titrant 10^8 spores/ml.

C. LA MYCOSE A *Beauveria bassiana*

Les mycoses sont des maladies d'origine cryptogamique. Les champignons entomopathogènes appartiennent tous aux quatre classes suivantes. Phycomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes ou *Fungi Imperfecti* (STEINHAUS, E.A., 1949). La plupart des mycoses sont cependant dûes aux Coelomomyces, Entomophthorales et *Fungi Imperfecti* (HURPIN, 1973). Les spectres d'hôtes de ces groupes sont très variables d'un groupe à l'autre et au sein d'un même groupe, d'une espèce fongique à l'autre, nous venons d'en voir un exemple.

Les mycoses causées par certains Deutéromycètes tels que *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, etc..., sont communément appelées muscardines. Ce nom a été donné à la maladie par les sériciculteurs italiens qui parlaient de "moscardino" et français qui eux parlaient de "muscardine" pour désigner la mycose à *Beauveria bassiana* du ver à soie. Le terme muscardine, désigne aujourd'hui aussi bien le champignon que la maladie.

Avant d'examiner les autres résultats que nous avons obtenus, nous aurons à préciser certains points qui vont nous permettre de mieux connaître l'espèce *Beauveria bassiana* que nous utilisons dans nos tests.

1. Historique

Il n'est pas très étonnant que les muscardines aient été les premières maladies du ver à soie à être connues du fait qu'elles sont très facilement reconnaissables. La momie blanche en laquelle la larve se transforme est très remarquable et les premiers sériciculteurs étaient en mesure d'en détecter très vite la présence. De nombreuses hypothèses ont été émises par BOISSIER des SAUVAGES (1763), NYSTEN (1808), DANDOLO (1825) (cités par STEINHAUS, 1949) pour tenter d'expliquer la maladie.

Il faudra attendre 1835-39 pour que BASSI de LODI démontre que la maladie du ver à soie est due à un champignon qui se multiplie dans et sur le corps de l'insecte. C'est une maladie contagieuse et parasitaire.

BALSAMO a été le premier à décrire ce champignon sous le nom de *Botrytis bassiana*.

BEAVERIE (1911-1914) l'a étudié en la comparant à une autre espèce très proche (*Botrytis effusa*) découverte sur le ver à soie, et a montré que les deux espèces possèdent des propriétés communes et indiqué la nécessité de créer un genre différent pour ces espèces.

En 1912 VUILLEMIN qui, en 1910, s'était occupé de modifier la classification des Hyphomycètes (*Fungi Imperfecti*), créa le genre *Beauveria* en hommage à BEAVERIE et dans lequel l'espèce *bassiana* devenait le type.

C'est pour cela qu'en conformité avec l'usage actuel, le champignon responsable de la muscardine blanche du ver à soie et de près de 500 autres espèces d'insectes est dénommé *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN.

Cette espèce possède donc un spectre d'hôtes très large mais la sensibilité du *Chilo suppressalis* à ses attaques n'a été signalée qu'en 1964 par RAO.

De nombreuses études qui ont déjà été réalisées ont permis de préciser les principales caractéristiques de ce cryptogame.

2. Caractéristiques de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana est certainement l'espèce de champignon entomopathogène la mieux connue. Elle est cosmopolite et s'attaque à un très grand nombre d'espèces d'insectes, nous l'avons déjà signalé.

Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques ont été étudiées aussi bien en culture que dans la nature.

C'est un champignon qui se cultive bien à une température optimale de l'ordre de 25-28°C sur de nombreux milieux artificiels. Il produit une croissance franche, avec formations de spores au bout de 3 à 7 jours (STEINHAUS, 1949). Lorsque la spore est placée dans un milieu humide, elle germe en 24-48 heures et émet un ou plusieurs tubes germinatifs cloisonnés.

L'humidité tout comme la température jouent un rôle important dans le développement du *Beauveria bassiana*.

En étudiant l'effet des facteurs abiotiques sur l'efficacité du *Beauveria bassiana* et du *Metarrhizium anisopliae* comme agents de lutte biologique contre le charançon *Hylobius pales*, WALSTAD et al. (1970) indiquent que ces champignons ont besoin de 92,5 % d'HR au moins à des températures qui se situent entre 15 et 35°C pour que croisse le mycélium et se forment les spores, enfin que celles-ci germent. L'optimum de croissance du mycélium, de germination des spores et de sporulation se situe selon ces mêmes auteurs à 100 % d'HR entre 25 et 30°C. WALSTAD et al. (1970) ont donné une représentation graphique de l'effet de la température sur la germination des spores de *B. bassiana* (voir fig. 3).

Il faut remarquer qu'en 1927, ARNAUD, étudiant les mêmes problèmes, indiquait que le *B. bassiana* se développe entre 6 et 40°C et que son optimum de développement se situe à 27°5.

Dans la nature, la longévité des conidies est plus ou moins limitée par de nombreux facteurs extérieurs notamment la température.

STEINHAUS (1960) pense que cette longévité des conidies dépend aussi bien de la température que des souches du cryptogame.

WALSTAD et al. ont observé l'évolution du pouvoir germinatif des spores dans le temps, en considérant 2 températures différentes (voir figure 4).

Ces conditions de développement du *Beauveria bassiana*, recourent pratiquement celles du *Chilo suppressalis* et c'est sans doute ce qui explique les possibilités de rencontre de l'hôte avec son parasite. Le parasitisme du *Beauveria bassiana* sur la pyrale du riz est donc très possible et nous allons examiner les facteurs qui influent sur la pathogénicité de la souche *Beauveria bassiana* n° 28 sur le *Chilo suppressalis*.

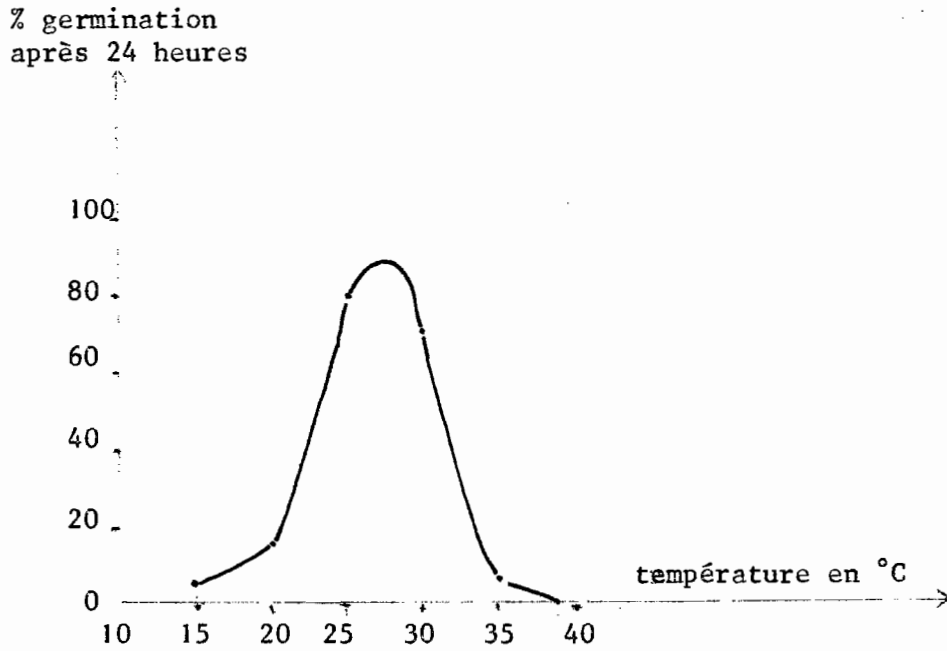


Fig. 3 : Effet de la température sur la germination des spores de *Beauveria bassiana* (d'après WALSTAD et al., 1970)

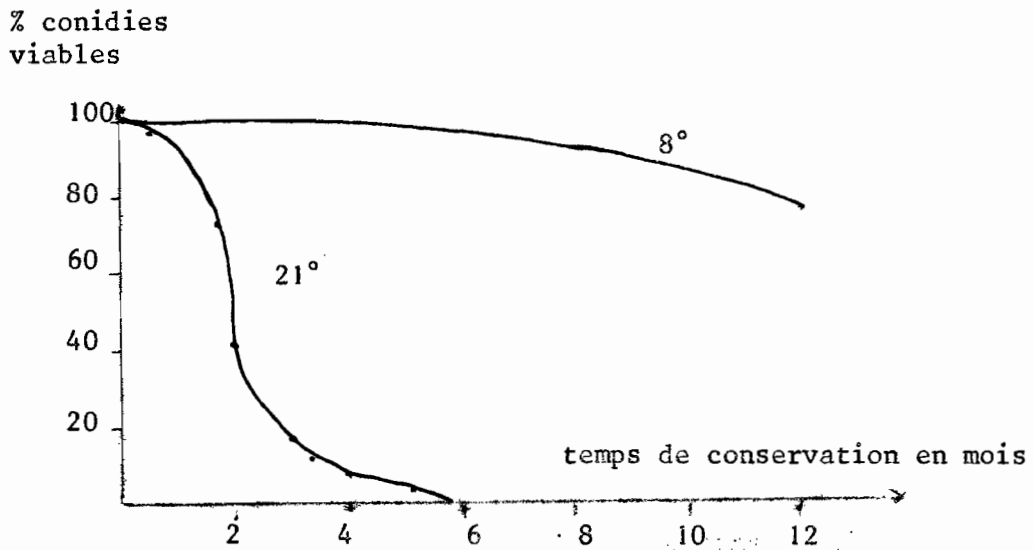


Fig. 4 : Effet de la température de conservation sur la longévité des spores de *Beauveria bassiana* (d'après WALSTAD et al., 1970)

D. INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SPORES

Cette étude a été effectuée à la fois sur larves et sur chrysalides. Le milieu d'élevage des larves contient de la nipagine qui est un fongicide incorporé dans la nourriture de l'insecte pour prévenir une détérioration de celle-ci par des champignons saprophytes. Ce produit est cependant sans action sur la pyrale mais son action vis-à-vis des champignons n'est pas très bien cernée puisque FARGUES (communication personnelle) pense qu'il provoque une réduction de la mortalité larvaire chez certaines *Noctuidae* traitées aux *Fungi Imperfecti* et élevées sur le milieu POITOUT-BUES. Les larves de *Chilo suppressalis* provoquent une infection rapide du milieu artificiel lorsque celui-ci ne renferme pas de la nipagine. Une comparaison entre une boîte de milieu sans nipagine contenant des larves et une autre sans larve montre que c'est la présence des larves qui contamine le milieu et provoque une croissance bactérienne qui le détériore. De toute façon, lorsque les larves sont nourries avec un milieu sans nipagine, on est pratiquement obligé de changer l'aliment toutes les 48 heures.

Nous avons, dans ces conditions, été amenés à mesurer l'effet de la nipagine sur la sensibilité du *Chilo suppressalis* au *Beauveria bassiana*.

1. Action de la nipagine sur la sensibilité des larves à la mycose

Pour réaliser ce test nous avons choisi de faire l'étude avec deux doses différentes (10^7 spores/ml et 10^8 spores/ml) et nous avons traité des larves du dernier stade (L5) juste avant la prénymphose. Les larves traitées ont été maintenues 48 heures en diète alimentaire à 20°C puis élevées à 25°C, 80-100 % d'HR et 16 h/24 de photopériode et normalement alimentées. Nous avons réalisé pour chaque dose, sur chacun des milieux, 6 répétitions de 10 larves.

Le tableau 4 résume les résultats obtenus.

Un rapide calcul statistique, pour comparer les pourcentages de mortalité sur les deux milieux à la dose de 10^8 spores/ml, nous donne un écart réduit de :

$$\xi = \frac{10}{\sqrt{225,7962}} \neq \frac{10}{\sqrt{225}} \neq \frac{10}{15} \neq 0,66$$

Ce chiffre est nettement inférieur à l'écart réduit que donne la table de FISHER-YATES qui est de 1,96 pour une probabilité d'erreur de 5 %. La différence n'est donc pas significative entre l'action des deux milieux d'élevage sur la sensibilité du *Chilo suppressalis* au *Beauveria bassiana*.

On peut également constater sur le tableau 4 une plus forte mortalité par mycose à la dose de 10^7 sur le milieu contenant le fongicide.

Nous pensons que compte tenu de la non signification du résultat obtenu même si à 10^8 spores/ml on obtient une plus forte mortalité par mycose sur le milieu sans nipagine, compte tenu également de la rapidité de détérioration de ce milieu dans les conditions de l'expérimentation et du surcroît de manipulation que cela provoque, il est logique de poursuivre les tests sur milieu artificiel complet pour étudier l'action de la mycose sur les larves.

TABLEAU n° 4 : Sensibilité comparée à la mycose des larves élevées sur deux milieux différents

Milieux	doses	Mort. larvaire		Nb de chrys. formé.	Mort. chrys + prénymphe		Nb IP éclos	Nb IP atteints mycose	Mort. totale mycose	Mortalité totale	% mycose
		mycose	septic.		mycose	septic.					
Milieu normal	1.10^7	8	3	45	15	2	29	16	39	44	65
	1.10^8	4	3	43	20	0	28	20	44	47	78,33
Milieu sans nipagine	10^7	4	0	51	13	0	34	17	34	34	57
	10^8	25	0	28	24	0	7	4	53	53	88,33

2. Influence de la quantité de spores

Lorsqu'on effectue un traitement soit à la tour, soit dans la nature, on provoque une dissémination artificielle des spores. Généralement il faut une grande quantité de spores pour contaminer tous les insectes.

De nombreuses expériences ont été effectuées pour déterminer le nombre de spores nécessaires à l'infection mais pour ce qui est du *Beauveria bassiana* il est assez difficile d'exploiter les résultats obtenus par les différents auteurs. SMITH (1961) cité par FERRON (1970) évalue à 13 conidio-spores de *Metarrhizium anisopliae* l'inoculum nécessaire pour obtenir 50 % de mortalité des chenilles de *Pyrausta nubilalis* en infectant les insectes par injection intrahémocoelienne. Cette technique, en éliminant la barrière tégumentaire, qui joue un rôle important dans la défense de l'insecte vis-à-vis des pathogènes, paraît d'un intérêt très discutable (FERRON et DIOMANDE, 1969)

Nous avons, pour ce qui nous concerne, étudié la dose d'inoculum nécessaire par pulvérisation directe des individus à la tour.

Les tableaux 5 et 6 donnent respectivement les résultats globaux de l'action des différents dosages de spores sur les larves et sur les chrysalides. Indiquons que pour les larves comme pour les chrysalides des lots de 40 individus ont été traités pour chaque dose, et les tests ont été conduits dans les conditions définies dans le paragraphe précédent.

L'examen de ces deux tableaux indique, comme l'ont déjà montré de nombreux auteurs, que la quantité de spores joue un rôle important dans le déclenchement de la mycose chez l'insecte.

Le tableau 5 montre pour ce qui concerne les larves, que la progression de l'effet du champignon est liée à l'importance de la dose. On constate que la mortalité par mycose qui est nulle à la dose 1.10^4 spores/ml ne diffère pas de celle du témoin. La mortalité des larves au stade traité progresse comme la dose de spores. Les résultats obtenus ne permettent pas de définir graphiquement une Dose Léthale 50 % (DL 50) mais le tableau 5 permet de situer cette dernière entre 1.10^7 et $3,3.10^7$ spores/ml. On peut donc dire que pour les larves cette DL 50 nécessite un niveau assez élevé de contamination.

La rapidité du processus infectieux peut aussi dépendre de la quantité de spores. Ceci ne ressort pas du tableau 5 mais des résultats globaux du test. La mortalité différée aux autres stades est plus importante aux doses voisines de la DL 50. FARGUES (1972) indiquait cependant que celle-ci était plus élevée aux faibles doses, sur larves de doryphore. C'est donc un point qui reste à préciser.

Une représentation sous forme d'histogramme (fig. 5) montre plus nettement cet effet de la dose sur le pourcentage de mortalité.

Pour ce qui est des chrysalides, la liaison dose-mortalité est plus nette, et on peut constater que la quantité minimale de spores pouvant provoquer la mycose est inférieure à 10^4 spores/ml. La DL 50 pour les chrysalides se situe entre 1.10^5 et $3,3.10^5$ spores/ml. On observe à la dose 1.10^8 spores/ml, une mortalité par mycose de 95 % et une mortalité totale de 100 %.

La comparaison des deux tableaux souligne, pour les différentes doses, une plus grande sensibilité des chrysalides par rapport aux larves, lorsque ces deux stades sont traités avec le *Beauveria bassiana*. Les larves

TABLEAU n° 5 : Mortalité en fonction de la dose lorsqu'on traite le dernier stade larvaire

Doses spores/ml	Mortal. mycose	larvai. septic.	Nb de chrys. formé.	Mortalité mycose	mortalité nymph. septic.	Nb IP éclos	Nb IP myco-sés	Mort. totale mycose	Mort. totale	% Mycose
Témoin (0)	0	1	39	0	9	30	0	0	9	0
10^4	0	4	36	0	8	28	0	0	12	0
$3,3 \cdot 10^4$	0	13	27	2	2	23	4	6	21	15
10^5	3	4	33	3	2	28	0	6	12	15
$3,3 \cdot 10^5$	0	2	38	1	6	31	0	1	9	2,5
10^6	3	1	36	1	5	30	1	5	11	12,5
$3,3 \cdot 10^6$	4	1	35	1	4	30	3	8	13	20
10^7	3	2	35	10	1	24	2	15	18	37,5
$3,3 \cdot 10^7$	11	1	28	7	0	21	12	30	31	75
10^8	19	5	16	11	2	3	1	31	38	77,5
$3,3 \cdot 10^8$	29	1	10	4	1	5	3	36	38	90

Fig. 5 - Influence de la quantité de spores.

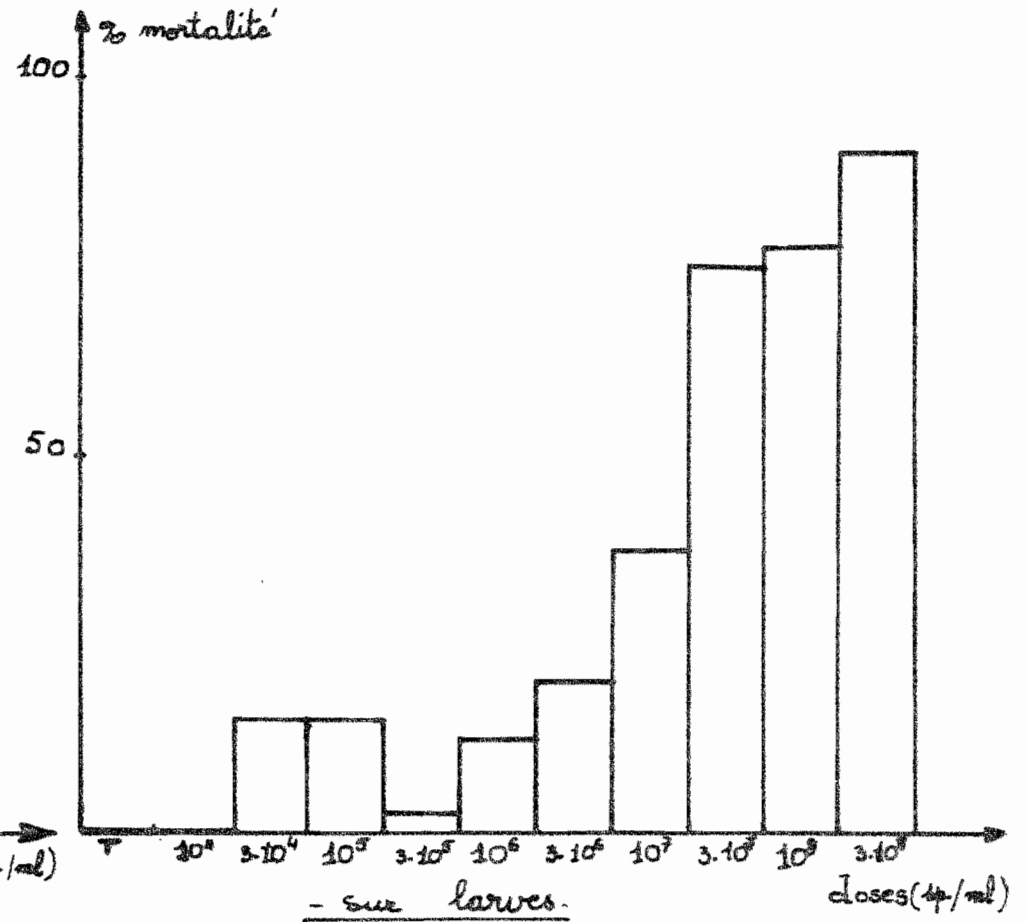
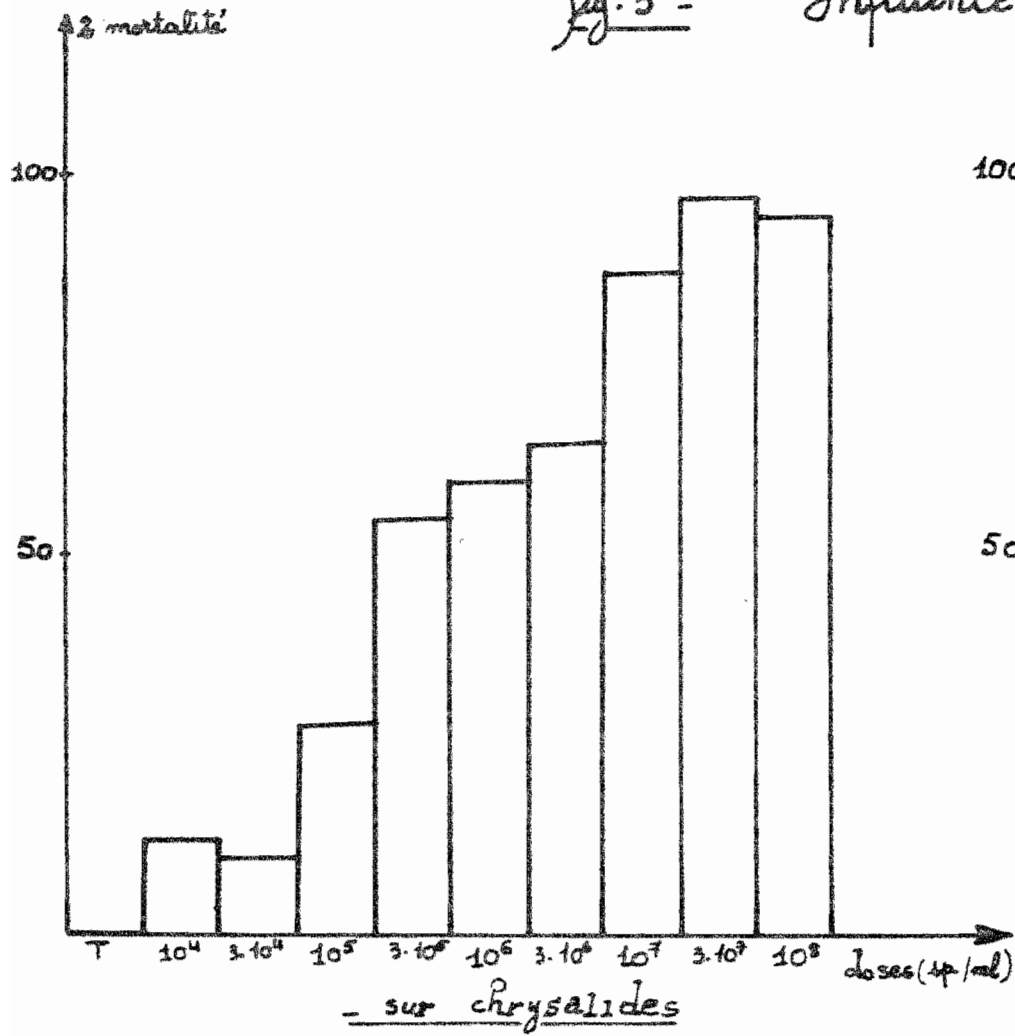


TABLEAU n° 6 : Sensibilité de la pyrale en fonction de la dose après traitement des chrysalides

Doses en nb de spores/ ml	Mortalité nymphale		Nb IP éclos	Mort.ima- ginale par myco.	Mortalité totale par myco.	Mortalité totale	% de mortalité	
	mycose	septicémie					mycose	totale
Témoin (0)	0	0	40	0	0	0	0	0
10 ⁴	0	2	38	5	5	7	12,5	17,5
3,3.10 ⁴	0	3	37	4	4	7	10	17,5
10 ⁵	0	2	38	11	11	13	27,5	32,5
3,3.10 ⁵	1	1	38	21	22	23	55	57,5
10 ⁶	3	0	37	21	24	24	60	60
3,3.10 ⁶	4	2	34	22	26	28	65	70
10 ⁷	5	2	33	30	35	37	87,7	92,5
3,3.10 ⁷	26	0	14	13	39	39	97,5	97,5
10 ⁸	17	2	21	21	38	40	95	100

traitées même avec une suspension titrant $3,3 \cdot 10^8$ spores/ml résistent mieux que les chrysalides traitées à 10^8 spores/ml. Il doit intervenir ici la mobilité des larves (à la recherche d'une cannelure pour effectuer leur chrysalidation) et qui, peut-être, ainsi se débarrassent d'une partie des germes reçus, sinon de la totalité. Les nymphes par contre, restent pratiquement immobiles et gardent la totalité de l'inoculum pathogène projeté sur elles.

Par rapport aux chiffres publiés par différents auteurs sur la quantité de spores nécessaire pour provoquer la mycose, le *Chilo suppressalis* semble être un insecte moyennement sensible au *Beauveria bassiana*, puisqu'il faut des doses de l'ordre de $3,3 \cdot 10^8$ spores/ml pour obtenir une mortalité larvaire égale à 90 % en moyenne. Les chrysalides qui au départ pouvaient être prises pour plus résistantes se sont avérées en fait plus sensibles que les larves.

Conclusion

Cette étude de l'influence de la quantité de spores devra être précisée en définissant la DL 50 pour les larves et la DL 50 pour les chrysalides puisque les deux semblent devoir être différentes. Une étude fine de la tranche $10^7 - 3,3 \cdot 10^7$ spores/ml. pour les larves et $10^5 - 3,3 \cdot 10^5$ pour les chrysalides, permettra d'y parvenir, soit par une méthode graphique, soit par une méthode mathématique.

L'étude du complexe *Beauveria bassiana-Chilo suppressalis* pose de nombreux problèmes que nous sommes encore loin d'avoir tous cernés. Nous n'avons encore qu'un bref aperçu des interactions entre le champignon et son hôte. Nous constatons que l'incorporation à la nourriture de la pyrale d'un fongicide tel que la nipagine n'a pas beaucoup modifié la sensibilité des chenilles au pathogène fongique. L'effet de la valeur de la dose de spores est nettement perceptible aussi bien sur les larves que sur les chrysalides.

CONCLUSIONS GENERALES

Il ne nous a pas été possible d'exécuter en une année d'étude notre programme tel qu'il a été défini "Etude de la sensibilité de la pyrale du riz *Chilo suppressalis* WALKER aux *Fungi Imperfecti*". Il nous faudrait bien davantage de temps ; mais, à l'issue de notre scolarité ORSTOM il nous revient de faire le bilan du travail effectué.

Si le démarrage de l'élevage de la pyrale n'a pas été d'une grande difficulté, la rapidité d'exécution des tests biologiques est souvent limitée par les particularités du matériel que nous manipulons.

Il nous a été possible de constater la sensibilité du *Chilo suppressalis* à différentes souches de Deutéromycètes et de choisir, en fonction de nos premiers résultats une souche efficace pour continuer l'étude.

Le cycle de l'insecte est assez long (une soixantaine de jours environ) il faut élever ce dernier et multiplier le champignon de telle sorte que la coïncidence entre la sporulation du pathogène et le stade de l'insecte soit parfaite.

Le *Chilo suppressalis* est un borer, et lorsqu'une souche virulente sera trouvée, se posera le problème de l'utilisation d'un tel biotype en lutte biologique. Nous avons élevé l'insecte sur riz cultivé en pots au laboratoire, mais une telle opération n'est pas sans difficulté.

Nous nous proposons de poursuivre le travail entrepris dans le cadre d'une thèse de 3e cycle, pour essayer de préciser les questions qui restent en suspens (DL 50, effet de la température, etc.). Les effets du traitement sur la descendance du *Chilo suppressalis* seront abordés dans le cadre de cette étude. En effet il est très probable, lorsqu'une population d'insectes est affectée par une épizootie, ou lorsqu'on procède à des traitements dans la nature ou au laboratoire, que l'agent pathogène puisse avoir, en plus de son action directe sur les individus tués, une action indirecte sur les survivants et sur leur descendance.

Nous traiterons à des doses voisines de la DL 50 et élèverons les survivants pour mesurer l'action du champignon sur ces derniers et sur les trois premières générations suivantes. L'étude de la fertilité et de la fécondité, de la croissance et du développement sera effectué sur les insectes considérés et une exploitation statistique des résultats devra permettre de dégager l'action du champignon sur les survivants et leur descendance.

D'autres questions annexes telles que l'infection des chrysalides, la sensibilité de certains stades (oeufs, L1) seront également examinées.

Il nous restera ainsi à préciser toutes ces questions pour mieux cerner la sensibilité du *Chilo suppressalis* au *Beauveria bassiana*.

Il nous appartient également, à l'issue de notre scolarité ORSTOM, de dégager l'intérêt de la formation que nous avons reçue, de ce qu'elle représente pour nous.

Nous pouvons dire, de façon générale, que notre première année nous a permis d'approfondir nos connaissances entomologiques tropicales par les cours que nous avons suivis à Bondy chez M. ROTH, d'acquérir les techniques fondamentales et les méthodes générales permettant d'aborder un problème scientifique (cf. DEA présenté à Toulouse, Etude écologique sur la répartition altitudinale de la faune entomologique, etc.) et nous aura donc été d'un très grand intérêt.

Le stage de DEA que nous avons effectué à La Minière nous aura permis d'amorcer directement, dès le début de notre 2e année, l'élevage du *Chilo suppressalis*, base du travail que nous présentons ici.

Nous avons acquis des techniques ; nous avons aussi eu, dans le cadre de l'Etude de la sensibilité du borer du riz aux *Fungi Imperfecti*, l'occasion d'aborder spécifiquement une question particulière et l'étudier en laboratoire.

Nous serons évidemment appelés à travailler dans la protection des végétaux, une fois rentrés au Sénégal ; nous ne connaissons pas encore dans quel secteur et à quel niveau nous serons amenés à intervenir ; ceci fait tout l'intérêt de l'éventail des connaissances que nous avons pu acquérir pour l'ensemble des problèmes qui nous intéressent. Nous aurons donc à utiliser la formation que nous avons reçue dans les nécessaires adaptations que nous aurons à faire pour pouvoir intégrer les structures existantes dans notre pays et dans le domaine particulier de l'Entomologie agricole.

Il est évidemment regrettable que l'enseignement spécifiquement ORSTOM, c'est à dire le seul qui intéresse particulièrement les pays chauds, soit si réduit par rapport aux enseignements généraux et nous nous permettons, très respectueusement, de suggérer qu'il serait hautement souhaitable qu'un tel enseignement soit davantage développé dans le sens de l'Entomologie appliquée aux problèmes des pays tropicaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGUS, T.A. and HEIMPEL, A.M., 1960. The bacterial control of insects. Proc. Entomol. Soc. Ontario, 90, 13-21.
- ARNAUD, M., 1927. Recherches préliminaires sur les champignons entomophytes. Ann. Epiphyties, 13, p.1.
- BALACHOWSKY, A.S., 1972. Traité d'Entomologie Appliquée à l'Agriculture. Tome 2, vol. 2, pp. 1214-1223.
- BOUNIAS, M., 1972. La pyrale du riz : *Chilo suppressalis* (Lépidoptère, Pyralidae, Crambinae). Mise au point bibliographique. Rapport multigraphié.
- BUCHER, G.E., 1956. General summary and review of utilisation of disease to control insects. Proc. Intern. Congr. Entomol. (1956) 10th, Montreal, 4, 695-701 (1958).
- BURGERJON, A., 1956. Pulvérisation et poudrage au laboratoire des préparations pathogènes insecticides. Ann. Epiphyties, 4, 677-686.
- BURGES, H.D. et HUSSEY, N.W., 1971. Microbial control of Insects and Mites. Academic Press. London - New York.
- DOKE, N., 1936. Effects of temperatures and humidities on the biology of the rice stem borer (1). Jap. Journ. Appl. Zool., 8 (2), 87-93.
- FARGUES, J., 1972. Sensibilité à *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (*Fungi Imperfecti*, Moniliales) des larves de Doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* SAY (Coléoptère, *Chrysomelidae*) soumises à des doses réduites d'insecticide chimique. Thèse de doctorat de 3ème Cycle Paris, 1972.
- FERRON, P., 1966. Observations écologiques sur la mycose à *Beauveria tenella* (DELACR.) SIEMASZKO des larves de hanneton commun, *Melolontha melolontha*. Thèse de doctorat de 3ème Cycle, Paris, 1966.
- FERRON, P., 1967. Les champignons entomopathogènes. Ann. Epiphyties, 1967, 18 (3) 361-382.
- FERRON, P., 1970. Conceptions et modalités pratiques d'application des préparations entomopathogènes à base de champignons en Agriculture. Symposium d'Amsterdam, 12-13 mars 1970. (O.I.L.B.).
- FERRON, P. et DIOMANDE, T., 1969. Sur la spécificité à l'égard des insectes de *Metarrhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN (*Fungi Imperfecti*) en fonction de l'origine des souches de ce champignon. C.R. Acad. Sci. Paris, 268, 331-332.
- FRANZ, J.M., 1961. Biological Control of pest insects in Europe. Ann. Rev. Entomol., 6, 183-200.
- FUKAYA, M. et KAMANO, S., 1964. Mass rearing of the rice stem borer. IRRI Johns Hopkins Press. Baltimore, Maryland. 1967
- FUKAYA, M., KONO, M., NAKATSUKA, K., 1954. The fundamental study on the forecast of the rice stem borer *Chilo suppressalis*. 16. On the factors concerning the occurrence of the rice stem borer in the first generation. (In Japanese, English summary), Jap. J. Appl. Zool., 19, 101-111.

- GOMEZ-CLEMENTE, F., 1948. Estudio biológico del lepidoptero (*Chilo simplex* BUTLER) en los arrozales valencianos. Bol. Pat. veg. Ent. Agric. 16, 1-22. in Rev. Appl. Entomol. 1952, 40, p. 210.
- GUENNELON, G. et SORIA, F., 1973. Mise au point au laboratoire d'un élevage permanent de la pyrale du riz, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera, Pyralidae) sur milieu artificiel. Ann. Zool. Ecol. Anim., 1973, 5 (4) 533-546.
- HARUKAWA, C., TAKATO, R. et KUMASHIRO, S., 1931. II. Biological studies on the rice stem borer : Effects of constant temperatures on growth and development of the borer (en japonais). Rep. Ohara Inst. Agric. Res., 17, p. 165-183.
(cité par FUKAYA, M. (1964) in Physiology of Rice stem borers, including hibernation and diapause. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1967, 213-227).
- HIRANO, C., 1964. Nutritional relationship between larval of *Chilo suppressalis* WALKER and rice plant with special reference to role of nitrogen in the nutrition of larvae. Bull. Natl. Inst. Agri. Sci. Japan, Ser (C), 17, 103-181.
- HURPIN, B., 1961. La lutte microbiologique contre les insectes. Cahiers des ingénieurs agronomes, 154, 21-27.
- HURPIN, B., 1968. L'emploi des germes pathogènes pour la lutte contre les insectes. Rev. Pathol. comp. Medec. exp., 5, 1, 95-99.
- HURPIN, B., 1973. La spécificité des micro-organismes entomopathogènes et son rôle en lutte biologique. Ann. Zool. Ecol. Anim., 1973, 5 (2), 283-304.
- IYATOMI, K. et YAMASHITA, S., 1936. Notes on the oviposition of *Trichogramma japonicum* Ashm. Kontyû, 11, n° 1-2, p. 146-149, Tokyo 1930. en japonais. Cité par BOUNIAS, 1972.
- ISHII, S., 1971. Nutritional studies of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER, and its mass rearing. Entomophaga, 16 (2), 165-173.
- KAMANO, S., 1973. Studies on artificial diets and laboratory rearing methods suitable for successive generations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER. Bull. Natl. Agr. Sci. ser C, 1973, Plant pathol. Entomol., n° 27, 1-51.
- KAMANO, S., 1971. Studies on artificial diets of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER, Bull. Natl. Inst. Agri. Sci., Tokyo.
- KAMANO, S. et INOUE, H., 1955. On the parasitization of *Isaria farinosa* upon the hibernating rice stem borer. Okyo Kontyn, II, 49-52, Tokyo.
- KATSUMATA, K., 1934. Results of breeding experiments with *Chilo simplex* Bult., especially on the duration of the larval instars and the thermal constant-1 et 2 (en japonais, résumé en anglais dans la R.A.E., P. 374). Journ. Plant. Protec. 21 (2-3), p. 35-48 Tokyo.
- KIRITANI, K. et IWAO, S., 1964. The biology and life cycle of *Chilo suppressalis* WALKER and *Tryporyza (Schoenobius) incertulas* WALKER in Temperate climate areas. Johns Hopkins Press. Baltimore, Maryland, 1967, p. 45-70.

- KOIDSUMI, K., 1957. Antifungal action of cuticular lipid in insects. J. Inst. physiology, 1, 40-51.
- KUWANA, S., 1930a. Important insect pests of rice crop in Japan. Proc. IV Pacific. Sci. Congr. 4, 209-216, Java 1929.
- METSCHNIKOFF, E., 1879. Diseases of the larva of the grain Weevil. Insects harmful to agriculture. Series : Issue III, the grain Weevil). Published by the Commission attached to the Odessa Lemstvo office for the investigation of the problem of insects harmful to agriculture. Odessa 32 p. (cité par FERRON, 1966).
- MORIMOTO, N., 1960. Effect of density of larval population on some characters of larva, pupa and adult in rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Jap. J. Appl. Ent. Zool., 4, 197-202.
- MORIMOTO, N. et SATO, Y., 1962. Synchrony of hatching within an egg mass and its effects on the formation of larval group of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Jap. J. Appl. Ent. Zool., vol. 6, n° 3, sept. 1962.
- MUELLER, K.E., 1970. Field problems of tropical rice (including notes on insect pests and their control). 95 pp. Los Banôs. The International Rice Res. Inst.
- NICKEL, J.L., 1964. Biological control of rice stem borers : A feasibility study. Tech. Bull. n° 2 IRRI. Los Banôs, Laguna, Philippines.
- OHO, N., YASUDA, S. et FUKAYA, M., 1961. Investigations on the yellow muscardine disease of the paddy borers, *Chilo suppressalis* WALKER and *Schoenobius incertulas* in relation to forecasting. Jap. J. Appl. Entomol. Zool. 5, 109-113. (en japonais avec résumé en anglais).
- PAILLOT, A., 1933. L'infection chez les insectes. Immunité et symbiose, pp.55-86.
- PATHAK, M.D., 1969. Insect pests of rice. IRRI, Los Banôs, Laguna, Philippines.
- POITOUT, S. et BUES, R., 1970. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères *Noctuidae* sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. Ann. Zool. Ecol. Anim., 2 (1), 79-91.
- RAO, V.P., 1964. Record of three insect pathogens from the far east. Tech. Bull. of the Comm. Inst. Biol. Control.
- SATO, Y., 1964. A simple technique for mass rearing the rice stem borer on rice seedlings. Jap. J. Appl. Ent. Zool., 8, 6-10. (en japonais résumé en anglais).
- SHEPARD, H.H., 1960. Methods of testing chemicals on insects. vol. 2 BURGESS, Publ. Co, pp. 243.
- SMITH, O.E., 1961. Control of the european corn borer with the fungi *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Diss. IOWA State Univ. Sci. Techn. (d'après Diss. Abstr. 22, 686, cité par FERRON, 1970).
- STEINHAUS, E.A., 1949. Principles of insect pathology, 757 p. Mc GRAW HILL, New York.

- STEINHAUS, E.A., 1960. The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. Journ. Inst. Pathol., 2, 225-229.
- TANADA, Y., 1965. Factors affecting the susceptibility of insects to viruses. Entomophaga 10 (2), p. 139-150.
- TATEISHI, I., MURATA, T. et HISANO, S., 1951. On the parasitism of muscardine to larvae of *Chilo simplex* (en japonais, cité par NICKEL, 1964).
- TATEISHI, I., MURATA, T. et TYOTOKU, N., 1955. On the parasites of the rice stem borer (*Chilo suppressalis*) (en japonais, cité par NICKEL, 1964). KYUSHU, Agr. Res., 16, p. 105.
- VAGO, C., 1959. Enchainement des maladies chez les insectes. Ann. Epiphyties n° hors série, série C, 181 pp.
- WADA, Y., 1957. Experimental studies on the factors affecting the infection of the yellow muscardine fungus to the overwintering rice stem borer. Jap. J. Appl. Ent. Zool., 1, 54-59.
- WALSTAD, J.D., ANDERSON, R.F. et STAMBAUGH, W.J., 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. Journ. Invert. Pathol., 16, 221-226.
- YAGI, M. et KATSUMATA, K., 1935. On the determination of the larval instars of *Chilo simplex* Butl. by the Breadth of the head and mandibles. (en japonais cité par BOUNIAS, 1972). OYO Dobutsugaki Zasshi 7 (1), p. 35-41, Tokyo.
- YAMAZAKI, S. et HATAI, N., 1960. Studies on the behavior of rice stem borer (*Chilo suppressalis*) in regard to some factors concerning insecticidal experiments. Bull. Natl. Inst. Agri. Sci., Sec.C (Phytopathol. Entomol.), 11, 1-36.
- YASUMATSU, K. et TORII, T., 1968. Impact of parasites, predators and diseases on rice pests. Ann. Rev. Entomol., 13, 195-324.