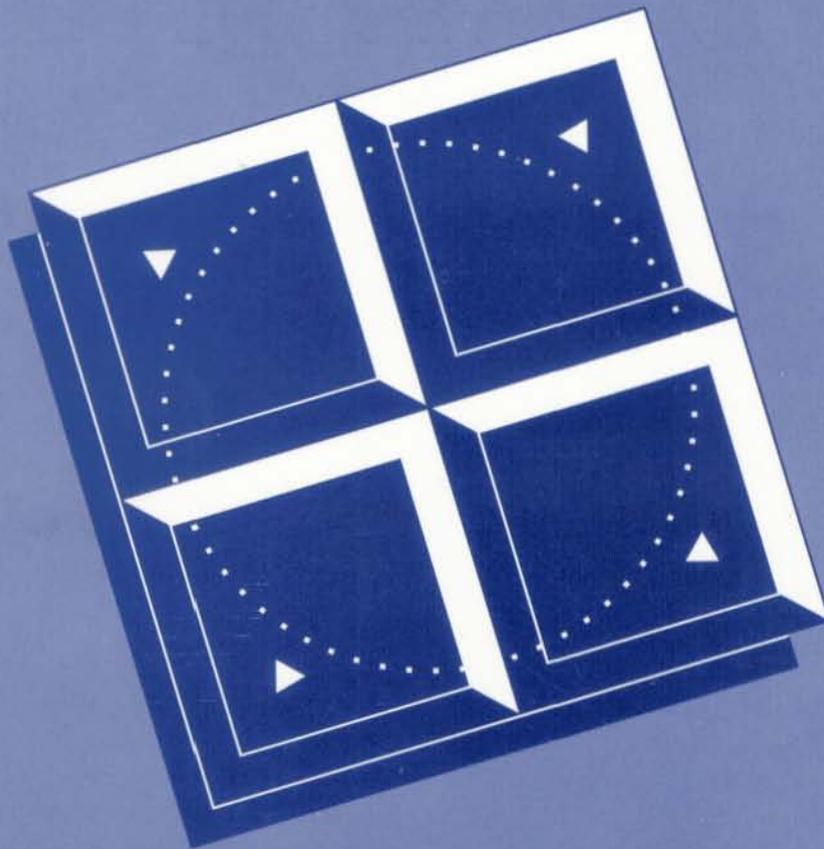


Mémoire de recherche forestière n° 126

**Technique d'élevage
de la pyrale des cônes du sapin
et tests de vulnérabilité au
*Bacillus thuringiensis var. kurstaki***

par R. TRUDEL



Richard TRUDEL est biologiste, diplômé de l'Université Laval depuis 1988. À l'emploi du ministère de Forêts en 1990, il est affecté au laboratoire de microbiologie pour y réaliser des travaux sur l'élevage de différents insectes. En 1994, il effectue un retour aux études à l'Université Laval, qui lui décerne le titre de maître ès sciences en 1996. Il poursuit présentement des études de doctorat à la Faculté de foresterie et de géomatique du même établissement.



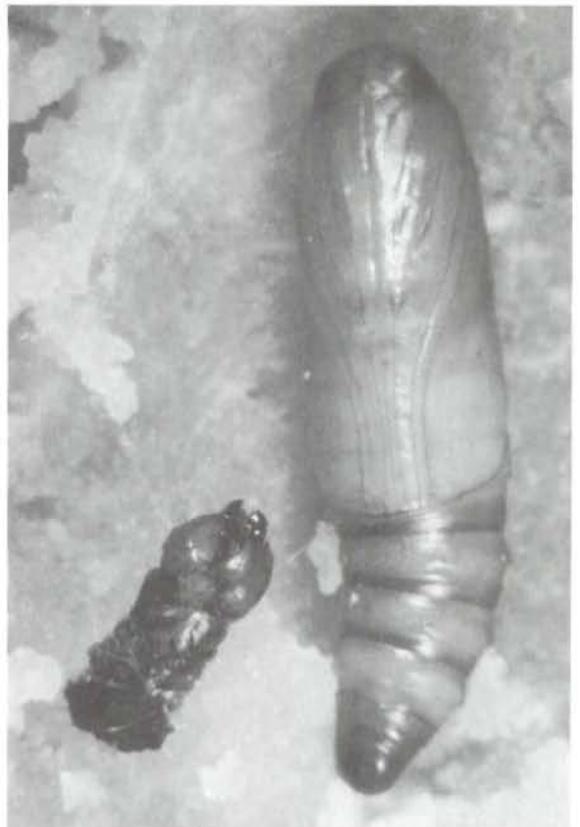
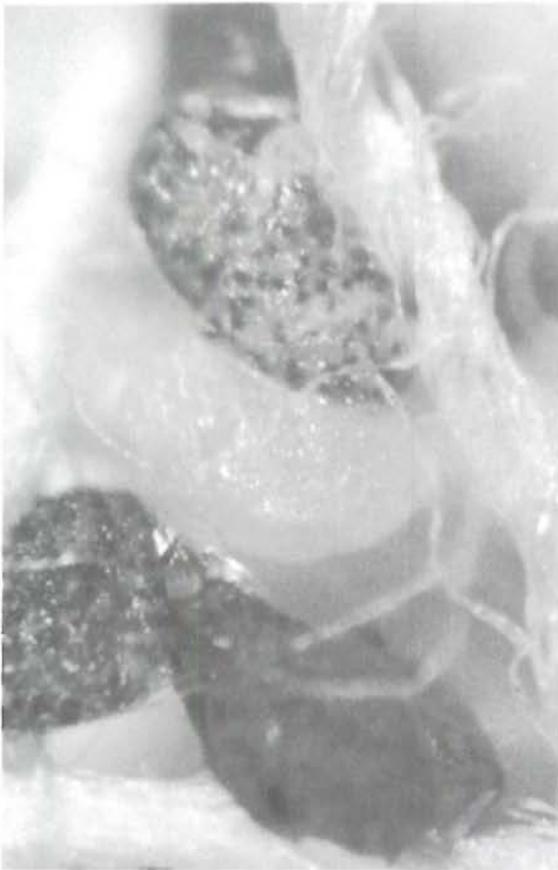
Photo Claude Moffet, RNC-SCF

Depuis de nombreuses années, chacun des Mémoires et des autres rapports publiés par la Recherche forestière est révisé par un comité *ad hoc* d'au moins trois membres recrutés aussi bien à l'intérieur du Ministère que dans le milieu universitaire, la fonction publique du Canada ou les autres milieux de la recherche. Les responsables de la Recherche forestière remercient les scientifiques qui ont accepté bénévolement de revoir le texte présenté ici et de participer ainsi à la diffusion des résultats des recherches menées au Ministère des Ressources naturelles.

Les publications de la Recherche forestière sont produites et diffusées à même les budgets de recherche et de développement, comme autant d'étapes essentielles à la réalisation de chaque projet ou expérience. En conséquence, ces documents sont, par définition, à *tirage limité* et à *diffusion restreinte*. Adresser toute demande à :

Publications
Direction de la recherche forestière
Ministère des Ressources naturelles du Québec
2700, rue Einstein
SAINTE-FOY (Québec)
Canada G1P 3W8

**Technique d'élevage de
la pyrale des cônes du sapin
et tests de vulnérabilité au
*Bacillus thuringiensis var. kurstaki***



De gauche à droite, en haut : oeufs; premier stade larvaire; en bas : quatrième stade larvaire; chrysalide.

**Technique d'élevage de
la pyrale des cônes du sapin
et tests de vulnérabilité au
Bacillus thuringiensis var. kurstaki ***

par

Richard TRUDEL, M.Sc.

Mémoire de recherche forestière n° 126

Gouvernement du Québec
Ministère des Ressources naturelles
Direction de la recherche forestière
1996

* Tiré d'un mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Maître ès sciences forestières.

Ce texte constitue le rapport final du projet de recherche (subvention) n° 0895-2560 : « Étude de la potentialité insecticide du *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contre la pyrale des cônes du sapin ».

TRUDEL, Richard, 1996. Technique d'élevage de la pyrale des cônes du sapin et tests de vulnérabilité au *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Gouv. du Québec, min. des Ress. nat., Dir. de la rech. for. Mémoire de recherche forestière n° 126. **RN96-3103**

ERRATA

page	col.	parag.	ligne	
18	2	2	2	sur la nourriture artificielle contaminée
24	2	1	31-32	...subs- tance...
25	2	1	8	...entomopathogène...

RN96-3103

ISBN 2-550-30920-0

ISSN 1183-3912

Dépôt légal 1997

Bibliothèque nationale du Québec

Bibliothèque nationale du Canada

© 1997 Gouvernement du Québec

Remerciements

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de microbiologie du ministère des Ressources naturelles du Québec : Jean Cabana, Monique Dubé, Monique Pelletier et Céline Blanchette, pour leur implication dans ce projet. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur et à mon codirecteur, Dr Éric Bauce et Dr Claude Guertin, pour le partage de leur connaissance et de leur expertise dans la réalisation de cette recherche. Finalement, je tiens à remercier la Direction de la recherche forestière du ministère des Ressources naturelles du Québec pour son soutien financier, sans lequel cette étude n'aurait pu être réalisée.

Résumé

L'objectif de cette recherche était d'élaborer une technique d'élevage de pyrales des cônes du sapin (*Dioryctria abietivorella*) de façon à développer une colonie de laboratoire exempte de contamination. Cette technique a rendu possible la production en masse d'insectes et la récolte de données sur certains paramètres biologiques de cet insecte. Ces paramètres portent entre autres sur la caractérisation des stades larvaires ainsi que leur nombre, les temps de développement larvaire et la capacité de ponte des femelles. Par la suite, des insectes de différents stades ont été utilisés pour réaliser des épreuves biologiques afin d'évaluer la vulnérabilité de la pyrale au *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). L'utilisation de la concentration létale 50 % (CL-50) comme mesure du potentiel insecticide a permis d'identifier la vulnérabilité de l'insecte à la souche HD-1 (Btk). Ces tests ont été faits sur les premier, troisième et cinquième stades larvaires. Aucune différence significative n'a été observée entre les stades larvaires pour ce qui est de leur vulnérabilité à cette souche de Btk. Grâce à cette étude, il a été possible d'identifier le Btk comme un outil potentiel de lutte contre la pyrale des cônes du sapin.

Mots-clés : pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella*, insecticide biologique, *Bacillus thuringiensis*, élevage d'insectes, vulnérabilité des insectes.

Abstract

Rearing technique of the fir coneworm and vulnerability tests to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. The objective of this project was the development of a rearing technique for the fir coneworm (*Dioryctria abietivorella*) in order to obtain an aseptic laboratory colony. This technique made possible mass production and collection of biological data on this insect. Some of the parameters measured during this part of the research were the characterization of the different instars and the number of moults, larval development times, and female egg laying capacity. Different instars were then used in bioassays to evaluate the vulnerability of the fir coneworm to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). The utilization of the lethal concentration 50% (LC-50) made possible the identification of the insect vulnerability to the HD-1 strain (Btk). These tests were conducted with first, third, and fifth instars and no significant differences were observed between the different instars for insect sensibility to Btk. The realization of this study demonstrated that the utilization of Btk (HD-1) could be effective for the control of *D. abietivorella* populations in seed orchards.

Key words : fir coneworm, *Dioryctria abietivorella*, biological insecticide, *Bacillus thuringiensis*, insect rearing, insect vulnerability.

Table des matières

Remerciements	v
Résumé	vi
<i>Abstract</i>	vi
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xiii
Introduction	1
Chapitre premier	
Revue de littérature	3
1.1 Pyrale des cônes du sapin	3
1.1.1 Description du cycle vital et des stades de développement	3
1.1.2 Hôtes et dégâts	4
1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.2.1 Historique	4
1.2.2 Description de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.2.3 Mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.3 Vergers à graines	5
1.3.1 Description	5
1.3.2 Sélection des arbres et localisation des sites	6
1.3.3 Traitements pour promouvoir la floraison	6
1.3.4 Influence de l'induction florale et des différents traitements sur les populations d'insectes	7
1.3.5 Méthodes de lutte contre les insectes nuisibles employées dans les vergers à graines	7

Chapitre deux		Conclusion	25
Méthode pour l'élevage de <i>D. abietivorella</i>	9	Recommandations	27
2.1 Introduction	9	Références	29
2.2 Matériel et méthodes	9		
2.2.1 Constitution de la colonie	9		
2.2.2 Préparation de la nourriture artificielle	10		
2.2.3 Cages d'accouplement et de ponte pour les adultes	10		
2.2.4 Oeufs	10		
2.2.5 Larves	11		
2.3 Résultats et discussion	11		
2.3.1 Accouplement des adultes et ponte des femelles	11		
2.3.2 Éclosion et développement larvaire	13		
2.3.3 Taux de survie	15		
Chapitre trois			
Épreuves biologiques avec le <i>Bacillus thuringiensis</i>	17		
3.1 Introduction	17		
3.2 Matériel et méthodes	17		
3.2.1 Préparation des larves pour les épreuves biologiques	17		
3.2.2 Préparation de la nourriture artificielle	17		
3.2.3 Préparation de la solution-mère du standard HD-1 et de ses dilutions	18		
3.2.4 Incorporation des dilutions dans la nourriture artificielle	18		
3.2.5 Introduction des larves sur la nourriture artificielle contaminée	18		
3.2.6 Calcul de la CL-50	19		
3.2.7 Analyse statistique	19		
3.3 Résultats	19		
3.3.1 CL-50 des larves de stade 1	19		
3.3.2 CL-50 des larves de stade 3	19		
3.3.3 CL-50 des larves de stade 5	19		
3.3.4 Comparaison des CL-50 des différents stades testés	19		
3.4 Discussion	19		

Liste des tableaux

Tableau 1	Composition de la nourriture artificielle de la pyrale des cônes du sapin.	10
Tableau 2	Données sur le développement de <i>D. abietivorella</i> dans des conditions artificielles	14
Tableau 3	Taux de survie de <i>D. abietivorella</i> dans des conditions artificielles	14
Tableau 4	Exemple de préparation des dilutions de <i>Bt</i> et évaluation de la concentration correspondante en grammes de <i>Btk</i> par millilitre de nourriture artificielle	18

Liste des figures

Figure 1	Identification du sexe des chrysalides de pyrale des cônes du sapin	11
Figure 2	Cage pour la pyrale des cônes du sapin servant à l'accouplement et à la ponte	12
Figure 3	Évaluation de la CL-50 du <i>Btk</i> souche HD-1 chez le premier stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin	20
Figure 4	Évaluation de la CL-50 du <i>Btk</i> souche HD-1 chez le troisième stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin	21
Figure 5	Évaluation de la CL-50 du <i>Btk</i> souche HD-1 chez le cinquième stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin	22
Figure 6	Comparaisons des CL-50 moyennés en fonction des différents âges larvaires	23

Introduction

La pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella* (Grote), est un insecte qui occasionne des problèmes récurrents dans les vergers à graines au Canada et dans les états américains limitrophes. On le retrouve principalement sur l'épinette blanche, *Picea glauca* (Moench) Voss, l'épinette noire, *P. mariana* (Mill.) B.S.P., le sapin beaumier, *Abies balsamea* (L.) Mill., le pin blanc, *Pinus strobus* (L.) et le pin gris, *P. banksiana* (Lamb.) (Hedlin *et al.* 1980, Turgeon 1994). De plus, il existe une certaine confusion concernant l'identification de cet insecte, du fait que plusieurs autres insectes de la même famille, dont *Dioryctria abietella* (D. & S.), ont été confondus avec *D. abietivorella* (Hedlin *et al.* 1980, Turgeon et De Groot 1992). Pendant les bonnes années de production semencière, plus de la moitié des cônes produits peuvent être endommagés par cet insecte (MFO 1991). Durant les périodes épidémiques, il peut complètement détruire les cônes des arbres d'une région donnée, spécialement durant les années de faible floraison (Ruth 1980). De plus, les méthodes employées afin d'accroître la production semencière peuvent favoriser la prolifération des populations de pyrales des cônes du sapin. Certaines pratiques, comme la fertilisation (Shaw *et al.* 1978, Jackson et Hunter 1983, Burgess *et al.* 1995), la taille des racines et l'annelage du tronc ou des branches (White 1984), occasionnent des modifications physiologiques entraînant l'augmentation de l'azote disponible dans les tissus de la plante hôte. L'alimentation des insectes à partir d'une source nutritive riche en azote a pour effet d'augmenter leur taux de survie, d'accroître leur fécondité et aussi de diminuer leur temps de développement (White 1984, Mattson et Scriber 1986, Loader & Damman 1991, Bidon 1993).

Jusqu'à présent, on n'avait élaboré aucune méthode d'élevage en laboratoire qui permettait le développement de colonies de pyrales des cônes du sapin. L'élaboration d'une méthode d'élevage de cet insecte permettrait d'obtenir une population homogène, où les problèmes liés à son identification

seraient éliminés. De plus, la production d'insectes dans des conditions de stérilité offrirait la possibilité de développer des colonies d'insectes exemptes de contamination. Des méthodes d'élevage de ce genre ont été développées par le passé pour des insectes comme la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Robertson 1985) et *Dioryctria amatella* (Hulst) (Fatzinger 1981). La mise au point d'un moyen de lutte contre *D. abietivorella* permettrait de réprimer les populations de cet insecte et, par le fait même, limiterait leurs dégâts. Connaissant l'effet pathogène du *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) contre certains lépidoptères (Aronson *et al.* 1986, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991, Gill *et al.* 1992), on pourrait donc le tester contre la pyrale des cônes du sapin. Cette bactérie Gram-positive synthétise, durant sa phase de sporulation, un cristal qui contient entre autres une protoxine (endotoxine delta) (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Raymond *et al.* 1989, Gill *et al.* 1992), qui a un effet insecticide spécifique contre certaines larves de lépidoptères.

Le premier objectif de la présente recherche consistait à développer une méthode d'élevage de pyrales des cônes du sapin dans des conditions aseptiques, afin de produire des quantités massives d'insectes. Grâce aux connaissances acquises sur la biologie de cet insecte, il serait possible d'adapter une méthode permettant le développement des larves et favoriser l'accouplement et l'oviposition des femelles sur des substrats artificiels respectifs. Le second objectif était de vérifier le potentiel insecticide du *Btk* contre la pyrale des cônes du sapin. Du fait que cet entomopathogène est efficace contre plusieurs autres lépidoptères, il serait donc possible de mesurer la vulnérabilité de la pyrale au *Btk*. Des méthodes standards d'épreuves biologiques ont donc été utilisées afin de vérifier le potentiel insecticide de cet entomopathogène. La concentration létale 50 % (CL-50) a servi d'outil pour quantifier la virulence du *Btk* de souche HD-1.

Chapitre premier

Revue de littérature

1.1 Pyrale des cônes du sapin

1.1.1 Description du cycle vital

Le cycle vital de la pyrale des cônes du sapin semble être variable et n'est pas très bien documenté (Hedlin *et al.* 1980, Ruth 1980, Sweeney 1994). Il y a beaucoup de confusion dans la littérature concernant la biologie de *D. abietivorella*. Certains auteurs affirment que la pyrale des cônes du sapin est bivoltine (Fogal 1979) tandis que d'autres évaluent le développement de l'insecte à une génération par année (Martineau 1985, Ives et Wong 1988). Selon Rose et Lindquist (1994), il y aurait une génération par année au Canada mais avec de multiples chevauchements de stades, ce qui permettrait de constater la présence de l'insecte dans les cônes du printemps jusqu'à l'automne. *D. amatella*, espèce du même genre qu'on trouve dans le nord de la Floride, peut avoir jusqu'à quatre générations par année (Fatzinger et Merkel 1985). La controverse existe aussi quant au stade durant lequel la pyrale effectue sa dormance. La pyrale des cônes du sapin passe l'hiver, soit sous la forme d'oeufs selon Keen (1958) et Hedlin *et al.* (1980), soit au 1^{er} ou 2^e stade larvaire selon Martineau (1985), soit au stade de pupes ou de prépupe selon Fogal (1976) et Ives et Wong (1988). Cette confusion est vraisemblablement liée au fait que plusieurs autres insectes du même genre, dont *D. abietella*, ont été confondus avec *D. abietivorella* (Hedlin *et al.* 1980, Turgeon et De Groot 1992).

Les oeufs de *D. abietivorella* ont une forme ovale et mesurent environ 1 mm de longueur par 0,65 mm de diamètre (Hedlin *et al.* 1980, Ruth 1980, Martineau 1985). Juste après la ponte, les oeufs sont de couleur jaunâtre, mais seuls les oeufs fertilisés virent au brun-rougeâtre après 24 heures d'incubation (Lyons 1957,

Stevens *et al.* 1988). Les oeufs sont pondus individuellement ou en groupe de deux ou trois sur les cônes, sur les branches ou sur les vieilles aiguilles (Lyons 1957, Ruth 1980, Martineau 1985). Selon Stevens *et al.* (1988), les larves mettent environ 10 jours à éclore.

C'est pendant le stade larvaire que la pyrale des cônes du sapin cause le plus de dégâts (Turgeon et De Groot 1992). Le développement larvaire de *D. abietivorella* passe par cinq stades (Martineau 1985). Les jeunes larves ont d'abord la tête brun foncé et le corps de couleur ambré, mais à la fin du cinquième stade, le corps est plus foncé et marqué de rangées de points bruns dans la région dorsale (Ives et Wong 1988). Les larves de 5^e stade peuvent atteindre une longueur de 18 à 20 mm (Hedlin *et al.* 1980, Ives et Wong 1988, Rose et Lindquist 1994).

À leur plein développement, les larves se laissent choir sur le sol où elles tissent un cocon de soie dans lequel elles se transforment en chrysalide (Martineau 1985). Ces dernières sont de couleur ambre à brun-rougeâtre et mesurent environ 10 mm de long (Hedlin *et al.* 1980).

Les ailes antérieures du papillon de la pyrale des cônes du sapin sont de couleur gris-bleu traversées de lignes en zigzag alors que les ailes postérieures sont de couleur gris pâle; l'insecte a une envergure d'environ 25 mm (Mackay 1943, Munroe 1959, Hedlin *et al.* 1980). Les adultes sont actifs principalement durant les périodes d'obscurité (scotophase). La ponte des oeufs a lieu également durant la scotophase (Fatzinger 1981). Il semble que les adultes de la pyrale réagissent aux monoterpènes des cônes de leur hôte (Asher 1970). Ainsi, les substances volatiles des conifères pourraient être considérées comme les compo-

santes responsables de la stimulation à l'oviposition (Fatzinger et Merkel 1985). Fatzinger et Merkel (1985) ont observé que l'oviposition des femelles de *D. amarella* était positivement corrélée avec la teneur en monoterpène et la densité du bois.

1.1.2 Description des dégâts

La larve de pyrale des cônes du sapin est de type exococonophytique, c'est à dire qu'elle se développe dans les cônes, mais une fois à maturité, elle en sort (Turgeon 1994). Cet insecte détruit les cônes en creusant des galeries et laisse à leur entrée un amas d'excréments (Turgeon et De Groot 1992). En l'absence de fleurs, la pyrale des cônes du sapin s'alimente d'aiguilles et de la partie interne de l'écorce des branches (Hedlin *et al.* 1980, Ruth 1980, Martineau 1985). Cet insecte est rarement abondant, mais pendant les périodes épidémiques, il peut complètement détruire les cônes des arbres d'une région donnée, spécialement durant les années de faible production (Ruth 1980). Il y a de grands risques qu'une population de pyrales des cônes du sapin se développe dans les vergers à graines où la production de cônes est importante (Hedlin *et al.* 1980, Ruth *et al.* 1982). Une plus forte concentration de *D. abietivorella* a été observée dans un verger à graines de pins rouges, lesquels avaient produit des quantités considérables de cônes durant trois années consécutives, comparativement à d'autres conifères de la même région dont la production semencière avait été sporadique (Mosseler *et al.* 1992).

1.2 *Bacillus thuringiensis*

1.2.1 Historique

Le *Bacillus thuringiensis* (Ber.) est une bactérie sporulante qui provoque la mort chez certains insectes (Hulme *et al.* 1983, Aronson *et al.* 1986, Charmillot et Pasquier 1992). Cette bactérie a été isolée pour la première fois par Ishawata en 1905 au Japon à partir de vers à soie, *Bombyx mori* (L.), et a été alors nommée *Bacillus sotto* (Prasad et Shethna 1976, Dubois et Lewis 1981, Hulme *et al.* 1983). Ce n'est que vers 1915 que Aoki et Chigasaki ont observé que les cultures sporulantes de *Bacillus sotto* étaient plus efficaces que des cultures végétatives pour provoquer la mort chez *B. mori* (Prasad et Shethna 1976). C'est à la même période en Allemagne que Berliner a isolé cette bactérie (*Bacillus thuringiensis*) à partir de la pyrale méditerranéenne de la farine, *Anagasta kühnii* (Zeller) (Prasad et Shethna 1976, Dubois et Lewis 1981, Hulme *et al.* 1983). Au milieu des années 1950, il a été convenu que le *Bacillus sotto* d'Ishawata et le *Bacillus thuringiensis* de Berliner étaient, en fait, la même espèce (Fast 1974).

1.2.2 Description de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie de forme allongée présente dans la microbiocénose du sol (Hulme *et al.* 1983, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991). Cette bactérie peut se déplacer à l'aide de flagelles péritriches (Dubois et Lewis 1981). Elle se subdivise en plus de 30 groupes sérologiques, appelés sérotypes ou sérovars (Dubois et Lewis 1981, Barjac et Frachon 1990, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991). Le sérotype est défini par la composition de l'antigène flagellaire (antigène H) compris dans les cellules végétatives (Dubois et Lewis 1981, Barjac 1981, Barjac et Frachon 1990). L'antigène H permet une classification stable et fiable des différents sérotypes de Bt (Barjac 1981, Barjac et Frachon 1990). Les méthodes plus récentes de classification du Bt utilisent une technologie permettant de déterminer l'empreinte génétique des différents sérovars en se basant sur la caractérisation de l'ADN (Brousseau *et al.* 1993). Les variétés de Bt actuellement connues se classent aussi selon leur toxicité pour différents ordres d'insectes (van Frankenhuyzen et Ortiz 1991). Cette toxicité provient de la production de plusieurs facteurs entomopathogènes. L'exotoxine alpha, soluble dans l'eau et sensible à la chaleur, peut être produite par d'autres bactéries que le Bt (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981). Cette toxine a été identifiée comme l'enzyme lécithinase C et son effet insecticide a été observé chez *Plutella maculipennis* (Dubois et Lewis 1981). L'exotoxine beta, émise durant la phase végétative de plusieurs souches de Bt (Angus 1962, Huber et Lüthy 1981), est hautement toxique pour les diptères (Dubois et Lewis 1981). Cette protéine, soluble dans l'eau et non sensible à la chaleur, peut aussi être toxique aux vertébrés lorsqu'injectée par voie péritonéale et peut avoir des effets tératogéniques chez les insectes. L'utilisation de préparations de Bt dotées de cette toxine est interdite au Canada (Dubois et Lewis 1981). Pour sa part, le *louse factor*, exotoxine soluble dans l'eau et non sensible à la chaleur, est produit par des souches qui ne fabriquent pas d'exotoxine beta. Cet agent est très toxique aux insectes hématophages de l'ordre des Anoplura (puces) (Dubois et Lewis 1981). L'endotoxine delta, aussi appelée cristal ou corps parasporal dans sa phase inactive, est insoluble dans l'eau et sensible à la chaleur (Angus 1962). Cette protéine ne peut être solubilisée qu'en milieu alcalin, spécialement en présence d'acide thioglycolique (Angus 1962). Le cristal de forme bipyramidale (Prasad et Shethna 1976, Huber et Lüthy 1981) chez la souche HD-1 est synthétisé à la fois à partir de constituants de la cellule végétative et de ceux présents dans le milieu de croissance (Angus 1962) pendant la phase de sporulation (Prasad et Shethna 1976, Huber et Lüthy 1981, Raymond *et al.* 1989, Gill *et al.* 1992). Cette protéine a un spectre d'action dont

la toxicité se limite aux insectes de l'ordre des lépidoptères, des diptères et des coléoptères (Dubois et Lewis 1981, Aronson et al 1986, Gill *et al.* 1992). La variété *kurstaki* possède une toxine pathogène pour les lépidoptères (Aronson *et al.* 1986, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991). Cette toxine est le principal agent actif causant la maladie puis la mort chez les lépidoptères (Ebersold *et al.* 1979, Calabrese *et al.* 1980, Percy et Fast 1983). Le degré de toxicité de l'endotoxine delta dépend de la capacité de l'insecte à fragmenter le cristal dont les fractions produisent l'effet toxique (Dubois et Lewis 1981, Gill *et al.* 1992). Le site actif se trouve à l'extrémité aminée de la protoxine (Aronson *et al.* 1986, Raymond *et al.* 1989, Gill *et al.* 1992). Il n'existe actuellement aucune donnée dans la littérature prouvant que cette endotoxine puisse avoir des effets adverses sur les insectes non ciblés, autres que les lépidoptères, ou sur les vertébrés (Dubois et Lewis 1981, Bauer 1995). La spore (endospore) de *Bt*, constituée de matériel cytoplasmique et nucléaire condensé, assure la survie de la bactérie lorsque les conditions du milieu ne sont pas favorables à sa croissance (Angus 1962). Avant la découverte de l'endotoxine delta, la spore était considérée comme le principal agent infectieux (Dubois et Lewis 1981), jusqu'à ce qu'on découvre à sa surface des protéines homologues à l'endotoxine delta (Fast 1977, Dubois et Lewis 1981, Aronson *et al.* 1986). Chez certaines sous-espèces de *Bt* dotées d'un mince exosporium, le dépôt de protoxines à la surface de la spore lui confère une certaine toxicité (Aronson *et al.* 1986).

1.2.3 Mode d'action du *Bacillus thuringiensis*

La spore et le cristal doivent d'abord être ingérés pour permettre l'activation de la toxine (Dubois et Lewis 1981, van Frankenhuyzen 1994). Dans la plupart des cas, le cristal est dissous par l'action combinée d'un pH alcalin et des protéases présentes dans le liquide stomacal (Angus 1962, Huber et Lüthy 1981, Gill *et al.* 1992). Le pH de l'estomac de *C. fumiferana*, qui entraîne la dissolution du cristal, varie entre 7,18 et 9,25 au cours de son développement larvaire (Heimpel 1956). Ce sont deux sérines protéases qui sont responsables de solubiliser le cristal, ce qui provoque le clivage des ponts disulfites au niveau de la protéine (Huber et Lüthy 1981). Les protoxines produites vont par la suite se fixer aux sites récepteurs spécifiques présents sur la membrane épithéliale du tube digestif de l'insecte (Gill *et al.* 1992). Selon Ebersold *et al.* (1977), la spore ne joue qu'un rôle pathogène secondaire en envahissant l'hémolymphe de l'insecte à la suite de la destruction de l'épithélium gastrique par l'endotoxine delta. Par contre, Hulme *et al.* (1983) mentionnent que les protéines qui recouvrent l'exosporium de certains *Bt* peuvent aussi affecter les cellules épithéliales du tube digestif. Une

fois liées aux sites récepteurs, les toxines agissent sur la perméabilité des cellules de l'épithélium stomacal, ce qui provoque leur gonflement puis leur éclatement (Ebersold *et al.* 1977, Ebersold *et al.* 1979, Dubois et Lewis 1981, van Frankenhuyzen 1994). Une paralysie du système digestif s'en suit, ce qui incite l'insecte à jeûner (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Gill *et al.* 1992). La paralysie de la larve serait consécutive à un changement drastique du pH de l'hémolymphe (alcalin) dû aux dommages subis par l'épithélium stomacal (Angus 1962, Gill *et al.* 1992). Il peut arriver que le contenu gastrique se répande dans l'hémolymphe; chez les insectes les plus susceptibles, la mort s'en suit après quelques heures (Dubois et Lewis 1981, Hulme *et al.* 1983). Les spores présentes dans l'hémolymphe vont germer et se multiplier, pour provoquer une septicémie puis la mort de l'insecte (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Hulme *et al.* 1983). L'efficacité du *Bt* dépend de la qualité et du type de protéines contenues dans le cristal, de la capacité de l'insecte à le fragmenter en fractions toxiques dispersées dans le lumen stomacal et, enfin, de la capacité de la spore à germer et envahir l'hémolymphe (Dubois et Lewis 1981). Certaines substances phagostimulantes ajoutées au *Bt* peuvent augmenter l'efficacité insecticide du produit lors des arrosages. Le fait d'ajouter du sucrose à l'entomopathogène stimule l'appétence de l'insecte et favorise ainsi l'efficacité du produit (Bell et Romine 1980, Farrar et Ridgway 1994).

Des souches asporulantes (bactéries sans spore) de *Bt* ont été produites afin de prévenir les effets possibles de l'insecticide sur l'environnement. Il est d'ailleurs possible d'obtenir des souches mutantes de *Bt* asporogènes capable de produire de grandes quantités d'endotoxines delta, sans former de spores dormantes; pour y arriver, on utilise comme agent mutagène le sulfonate d'éthyle méthane (Wakisaka *et al.* 1982). Surany (1970) a démontré que les toxines produites par ces souches asporulantes sont dotées de qualités insecticides substantiellement améliorées.

1.3 Les vergers à graines

1.3.1 Description

Les vergers à graines sont des plantations d'arbres issus d'une greffe ou de semis d'arbres sélectionnés. Ces plantations sont situées à l'écart afin de prévenir la pollinisation par des individus non désirables et aménagées pour une production rapide et abondante de semences améliorées en vue des reboisements (Lamontagne et Corriveau 1982). Il existe deux types de vergers au Québec: les vergers de clones, qui utilisent des essences qui fructifient à un âge assez avancé, et les vergers de semis, qui utilisent des essences qui fructifient abondamment et à un âge

relativement jeune, soit de 8 à 10 ans (Lamontagne 1992). Les vergers de clones sont établis généralement avec des plants greffés dont les greffons ont été prélevés sur des arbres sélectionnés. Dans le cas des vergers de semis, environ 350 descendances provenant d'autant d'arbres sélectionnés y sont représentées (Lamontagne 1992).

L'implantation d'un verger clonal passe par les étapes suivantes: la sélection d'arbres, la multiplication de ces arbres par greffage, le choix du site, la préparation du site, le choix et l'installation du dispositif de plantation, la plantation et l'aménagement du verger. Pour ce qui est des vergers de semis, les étapes sont les mêmes sauf que le greffage est remplacé par la culture en récipient de semis provenant des semences récoltées sur les arbres sélectionnés (Rainville *et al.* 1990).

1.3.2 Sélection des arbres et localisation des sites

La sélection des arbres consiste à parcourir des peuplements naturels ainsi que de vieilles plantations afin d'identifier les meilleurs phénotypes (Lamontagne 1992). Les caractéristiques recherchées, en grande partie héréditaires, sont principalement la croissance, la forme rectiligne du tronc, la production de semences, la rusticité et la résistance aux insectes et aux maladies (Lamontagne 1992). Grâce à la sélection, les semences produites dans ces vergers devraient présenter un gain génétique en volume que l'on estime à environ 5 à 10 % par rapport aux semences récoltées en dehors des vergers (Lamontagne 1988).

Il est très important de localiser le verger dans une région favorable au développement des fleurs (Lamontagne 1978b, Pharis *et al.* 1986, Lamontagne 1992). La contamination par le pollen est grandement diminuée lorsque le verger à graines est localisé entièrement hors de l'aire de distribution de l'espèce (Lamontagne 1992). Le fait de localiser une essence hors de son aire de distribution peut par contre favoriser les problèmes entomologiques. La texture et la structure du sol ont par ailleurs une influence sur la croissance des plants à cause de leur effet sur le drainage et la capacité de rétention d'eau dans le sol (Lamontagne 1978b, Lamontagne 1992). Les conditions édaphiques idéales pour un verger à graines consistent en une couche de 30-45 cm de glaise sableuse surmontant un sous-sol friable composé de sable glaiseux (Lamontagne 1978b). Il faut éviter d'établir un verger à graines dans une région où des facteurs limitatifs comme les rongeurs, les insectes, les maladies ou le climat peuvent nuire au développement normal des plants (Lamontagne 1978b).

1.3.3 Traitements pour promouvoir la floraison

L'utilisation de fertilisants augmente habituellement la production de cônes dans les vergers à graines. La production de fruits et de graines demande des quantités importantes de carbohydrates et d'azote, lesquels sont favorisés par la fertilisation au moyen de produits azotés (Koslowski *et al.* 1991). L'application de fertilisant a pour effet d'augmenter la quantité d'acides aminés totaux, principalement l'arginine, et des composés guanidino. Ces composés préviennent l'état de latence au site d'élaboration des cônes, favorisent le développement des primordia et inhibent la différenciation des bourgeons végétatifs (Maretzki *et al.* 1969). La fertilisation combinée avec d'autres traitements augmente d'autant la floraison (Lamontagne 1978a).

Chez les conifères, les gibberlines ont un rôle hormonal lié au développement de la plante et à la différenciation des fleurs. Elles agissent sur la germination, l'élongation des pousses, la croissance cambiale ainsi que sur la différenciation sexuelle (Pharis et Kuo 1977). Ces hormones peuvent être utilisées par application topicale, par injection méristématique ou par vaporisation sur le feuillage (Bonnet-Masimbert et Zaerr 1987). L'utilisation de l'acide gibbéréllique combiné à des traitements culturaux appropriés favorise la croissance ainsi que la production des cônes (Owens *et al.* 1985; Ross 1985; Webber *et al.* 1985). L'acide naphthalène acétique est aussi reconnu comme étant une substance pouvant promouvoir la production de cônes (Bonnet-Masimbert et Zaerr 1987). Cette auxine est souvent utilisée conjointement avec l'acide gibbéréllique afin d'en augmenter son effet. L'éthylène, gaz produit par des tissus végétaux endommagés, semblerait aussi être impliqué dans l'induction florale (Kozlowski *et al.* 1991).

L'annelage du tronc ou des branches est considéré comme un traitement cultural qui permet d'améliorer la production florale chez certaines espèces de conifères (Bonnet-Masimbert et Zaerr 1987, Kozlowski *et al.* 1991). De plus, on peut obtenir de meilleures réactions lorsque le traitement s'effectue au printemps et pendant une période de faible production semencière (Ebell 1971). L'annelage augmente la teneur en amidon dans les tissus des pousses durant l'éclatement des bourgeons et pendant le développement précoce du bourgeon reproductif (Ebell 1970). La taille des racines peut elle aussi avoir un effet sur le processus végétatif et reproductif chez certaines espèces de conifères, spécialement dans les vergers à graines (Bonnet-Masimbert et Zaerr 1987). Ce traitement provoque aussi une baisse du

potentiel hydrique, ayant pour effet de ralentir significativement l'activité mitotique, la croissance apicale et le développement des bourgeons végétatifs terminaux (Owens *et al.* 1985).

1.3.4 Influence de l'induction florale et des différents traitements sur les populations d'insectes

La production de cônes chez les résineux est souvent précédée par une période de stress, occasionné principalement par un déficit hydrique et des températures chaudes (White 1984, Mattson et Haack 1987a). Ces stress subis par la plante ont pour effet de modifier le métabolisme de l'azote de sorte que la teneur en protéines diminue alors que celles des acides aminés libres dans les tissus augmente (Mattson et Haack 1987b). Cette modification est en partie le résultat de l'hydrolyse des protéines, observée par une augmentation de l'activité enzymatique, et aussi dû à la réduction de la croissance de la plante (Mattson et Haack 1987b). L'azote ainsi accumulé dans le phloème devient donc disponible pour être transporté aux sites de différenciation des primordia, ce qui favorise le taux de succès de formation des fleurs (White 1984).

Les vergers à graines sont des sites où la production florale est souvent induite artificiellement. Les traitements utilisés, comme la taille des racines et l'annelage du tronc et des branches, ont pour effet de provoquer un stress chez la plante, occasionnant ainsi des modifications physiologiques (White 1984) équivalentes au stress hydrique. La fertilisation azotée (par exemple NH_4NO_3) et l'utilisation d'hormones comme la $\text{GA}_{4/7}$ peuvent aussi stimuler l'induction florale, sans préjudice à la plante. Les individus ainsi traités ont une teneur élevée en azote dans leurs tissus et sont donc prédisposés à fleurir. Les vergers à graines sont des sites propices à la prolifération de la pyrale des cônes du sapin et d'autres insectes ravageurs. Les insectes qui s'alimentent sur des arbres à fort contenu en azote se développent plus rapidement (Bidon 1993), ont des taux de survie plus élevés (Cates *et al.* 1987) et ont une meilleure capacité reproductive (Rhoades 1983, Mattson et Haack 1987a). Ce phénomène s'explique par la grande capacité des insectes à absorber l'azote, principalement sous forme d'acides aminés, au niveau de leur système digestif (Brodbeck et Strong 1988). Le succès qu'obtiennent les insectes à se développer dans un verger à graines est aussi intimement lié à la présence de fleurs. Bauce et Carisey (1996) ont observé que la floraison du sapin baumier favorise le développement des populations de *C. fumiferana* lorsque l'insecte se trouve en phase endémique. Le pollen contenu dans les cônes mâles constitue une

bonne source d'acides aminés, de protéines, de vitamines et de sucres solubles pour les insectes (Bauce et Carisey 1996).

1.3.5 Méthodes de lutte contre les insectes nuisibles employées dans les vergers à graines

Les méthodes de lutte actuellement employées dans les vergers à graines font appel à des insecticides chimiques. Ce sont principalement des insecticides systémiques qui sont utilisés dans la lutte contre les ravageurs des cônes. Ce type de produit a l'avantage de se disperser dans les tissus de l'arbre hôte (Stein *et al.* 1993). Il n'y a que deux insecticides homologués qui peuvent être utilisés dans de telles conditions: le diméthoate et le carbofurane en granulés peuvent être utilisés respectivement au Canada et aux États-Unis (Fogal et Plowman 1990, Stein *et al.* 1993).

Le diméthoate est appliqué par pulvérisation sur le feuillage ainsi que sur les cônes. L'efficacité de ce produit peut varier selon l'essence hôte mais, en moyenne, on note une réduction de 82 à 100 % du nombre de cônes endommagés chez l'épinette noire et l'épinette blanche (Fogal et Plowman 1990). Stein *et al.* (1993) ont observé une réduction de 14 à 25 % des dégâts causés par les insectes à la suite de l'utilisation du diméthoate sur des douglas taxifoliés. Ce produit, utilisé à des concentrations élevées, est phytotoxique: il provoque le brunissement des aiguilles (Fogal et Plowman 1990).

Le carbofurane peut être appliqué au sol sous forme granulaire ou liquide. Le traitement au carbofurane s'avère efficace l'année de l'application et l'année suivante. Il ne persiste pas dans le sol plus de deux ans suivant le traitement (Fogal *et al.* 1993). Dans des vergers d'épinettes noires, Fogal *et al.* (1993) ont observé que le carbofurane n'était pas efficace l'année du traitement mais seulement l'année suivante. Stein *et al.* (1993) n'ont noté aucune différence significative entre une population témoin et des douglas taxifoliés traités par une injection de carbofurane de 0,875 g au moyen de capsules. Selon Fogal *et al.* (1993), le nitrate d'ammonium aurait le potentiel d'augmenter l'efficacité du carbofurane et réduirait la perte de feuillage associé à l'utilisation de ce produit insecticide. Le carbofurane, spécialement sous forme granulaire, est toxique pour les oiseaux (Fogal *et al.* 1988) et son utilisation exige des mesures adéquates de protection de l'environnement.

Dans une étude effectuée par Stein *et al.* (1993), des traitements au diméthoate et au carbofurane sur des douglas taxifoliés se sont avérés inefficaces pour réduire les dégâts causés par *D. abietivorella*. Par contre, Haverty *et al.* (1986) ont observé une diminution de 30 % des dégâts causés par *D. abietivorella*, comparé à une parcelle témoin où aucun traitement n'a été appliqué, après avoir effectué des traitements au sol avec du fenvalérate dans un verger de pins blancs de l'ouest, *Pinus monticola* (Douglas). Une seconde application la même année a permis une augmentation significative de la production de 31,3 à 56,0 graines par cône, comparativement au bloc non traité (Haverty *et al.* 1986).

D'autres produits, comme le dicrotophos, l'oxydéméton-méthyle, l'acéphate, le formotion et le phorate sont des insecticides chimiques actuellement étudiés dans le but d'identifier un produit ayant un pouvoir insecticide adéquat contre les ravageurs des vergers à graines (Fogal et Lopushanski 1989, Fogal et Plowman 1990, Stein *et al.* 1993).

Chapitre deux

Méthode pour l'élevage de *D. abietivorella*

2.1 Introduction

La pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella* (Grote), est un insecte qui occasionne des problèmes récurrents dans les vergers à graines. Les dommages causés par cet insecte sont d'autant plus importants qu'ils affectent le potentiel reproducteur des arbres qu'on y cultive. De plus, la probabilité pour une population de pyrales des cônes du sapin de se développer dans un verger à graines est grande, puisque la production de cônes y est généralement soutenue (Hedlin *et al.* 1980, Ruth 1980).

Très peu d'information sur la biologie et le cycle vital de *D. abietivorella* a été publié au Québec. Cette pyrale est particulièrement difficile à étudier puisque les larves passent la majeure partie de leur vie dans les cônes (Rappaport et Volney 1989). L'élaboration d'une méthode d'élevage en laboratoire permettrait l'établissement d'une colonie d'insectes, à partir de laquelle il serait possible d'obtenir des informations pertinentes sur la biologie de *D. abietivorella*.

À partir d'insectes récoltés sur le terrain, une colonie de laboratoire de *D. abietivorella* a été mise sur pied. Une modification de la recette de nourriture artificielle de McMorran (1965) a été fournie aux insectes comme substrat alimentaire. L'élaboration du dispositif d'élevage a été inspirée de résultats provenant de Fatzinger (1981) obtenus à partir d'un élevage de *Dioryctria amatella* (Hulst).

Pendant les différents stades larvaires, on a mesuré le nombre de mues, la largeur des capsules céphaliques et le temps de développement pour chaque stade, de la larve de premier stade jusqu'à la chrysalide. De plus, des données ont été prises sur la

fécondité des femelles et sur les taux de survie tout au long du développement de *D. abietivorella*. Parmi les insectes produits dans cet élevage de laboratoire, une partie de la colonie a été utilisée pour effectuer les tests de vulnérabilité au *Btk* (v. chapitre trois).

2.2 Matériel et méthode

2.2.1 Constitution de la colonie

La colonie de laboratoire a été constituée durant l'été 1992 après la récolte de 400 cônes dans lesquels nous présumons la présence de l'insecte. Les cônes ont été récoltés dans un verger à graines d'épinettes blanches de 8 ans, situé dans la municipalité de Sacré-Coeur-de-Charlevoix (48° 14' N, 69° 48' O), à environ 400 km à l'est de Québec. Les cônes recueillis montraient des déformations et avaient quelques écailles décolorées. Afin de permettre à l'insecte de compléter son développement larvaire dans des conditions semi-artificielles, les cônes ont été disposés dans des contenants de carton (15 cm de diamètre sur 20 cm de haut) par groupes de 25, puis placés dans un incubateur à 25°C, avec une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16:8 (lumière:obscurité, L:O) h. Lorsque les pyrales ont atteint le 4^e ou le 5^e stade, les larves ont été extraites des cônes. Notons qu'à cet âge il est plus facile de localiser les insectes sans les blesser en disséquant les cônes. Par la suite, les insectes ont été placés individuellement dans des godets (Soló Company, Urbana, IL) contenant de la nourriture artificielle (Tableau 1) pour éviter le cannibalisme et leur permettre de compléter leur développement jusqu'à la chrysalide. Les contenants présentant des signes de contamination étaient automatiquement éliminés.

Tableau 1. Composition de la nourriture artificielle de la pyrale des cônes du sapin

Groupe		Quantité
I	Eau déionisée	1000 ml
	Caséine sans vitamine	35 g
	Alphacel	5 g
	Mélange de sels	10 g
	Saccharose	35 g
	Germe de blé	44 g
	Chlorure de choline	1 g
	Acide ascorbique	4 g
	Méthyle paraben	1,5 g
	Agar	16,6 g
	Acide sorbique	1,5 g
II	Solution A de vitamine ^a	5 ml
	Solution B de vitamine ^b	5 ml
	KOH 4M	5 ml
III	Formaline 10 %	2 ml
	Auréomycine	5,5 ml

^a La solution A de vitamines contient 50 mg d'acide folique et 100 mg de riboflavine pour 100 ml d'eau.

^b La solution B de vitamines contient 20 mg de niacine, 200 mg de pentothénate de calcium, 50 mg de thiamine HCL, 50 mg de pyrodoxine HCL, 4 mg de biotine, et 0,4 mg de vitamine B₁₂ pour 100 ml d'eau.

2.2.2 Préparation de la nourriture artificielle

La recette utilisée pour préparer la nourriture artificielle pour la pyrale des cônes du sapin est une modification de celle de McMorran (1965), conçue pour la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Tableau 1). La préparation de la nourriture artificielle s'est faite dans une marmite à parois pressurisées (modèle TDB/7-40, Groen). L'eau est d'abord versée dans la marmite puis amenée à une température de 50° C. Il faut mettre ensuite l'agitateur en marche continue puis ajouter graduellement les éléments du groupe I. Les ingrédients sont par la suite chauffés à 100° C, à une pression de 15 livres au pouce carré (15 PSI = 103,4 kPa), pendant 15 minutes. La préparation est ensuite refroidi à 60° C, et les ingrédients des groupes II et III sont ajoutés dans la marmite. Il faut bien mélanger (au moins 5 minutes) et maintenir à une

température de 57° C jusqu'à son utilisation. La nourriture artificielle est par la suite versée dans des contenants de 30 ml (Solo Company, Urbana, IL). Lorsqu'elle est solidifiée, on y vaporise une solution fongistatique (Grisdale 1984) composée de 250 ml d'alcool éthylique 95 %, de 3,8 g d'acide ascorbique, et de 1,5 g de méthyle paraben (méthyl-*p*-hydroxybenzoate) afin de limiter la croissance éventuelle de champignons.

2.2.3 Cages d'accouplement et de ponte pour les adultes

On a d'abord déterminé le sexe des chrysalides, à l'aide d'un microscope binoculaire (40 X), selon la technique décrite par Guy *et al.* (1985) basée sur l'observation des 8^e et 9^e segments sterno-abdominaux (Figure 1). Les pupes, 50 mâles et 50 femelles, ont été placées au fond d'une cage d'accouplement. Cette dernière consiste en un contenant de carton de forme cylindrique (Figure 2) et sert aux insectes adultes de site d'accouplement et de ponte. Un morceau d'étamine (« coton à fromage ») double épaisseur (30 cm de long sur 15 cm de large) est suspendu au centre de la cage pour servir aux femelles de site d'oviposition. Un autre morceau d'étamine sert de couvercle et est maintenu en place par un élastique. Deux fioles de 1,5 ml obstruées par une boule de coton sont installées sur les parois de la cage et servent à distribuer du sucrose.

La solution de sucrose 10 % est composée de 100 g de sucrose et de 1,25 g de méthyle paraben dilués dans 1 litre d'eau (Leppla *et al.* 1984). Cette solution a pour fonction de nourrir l'insecte durant sa phase adulte.

Dix cages témoins contenant trois mâles et une femelle sont utilisées pour documenter la ponte des femelles. Toutes ces cages ont été placées dans un incubateur à 22° C, à 60 % d'humidité relative et avec une photopériode de 12:12 (L:O) h pour une période de deux semaines. La période de ponte terminée, la quantité de chrysalides non viables est évaluée et par la suite les adultes sont éliminés.

2.2.4 Oeufs

Les oeufs pondus sur les tissus d'étamine sont récoltés à deux reprises, soit une semaine après le début de l'accouplement et à la fin de la période de ponte (deux semaines). Après leur récolte, les oeufs sont placés dans un sac de plastique puis maintenus à une température de 7° C pendant une durée maximale d'une semaine. La désinfection des oeufs se fait dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 2-3 minutes et le rinçage s'effectue avec de l'eau stérile pendant une minute (Leppla *et al.* 1984).

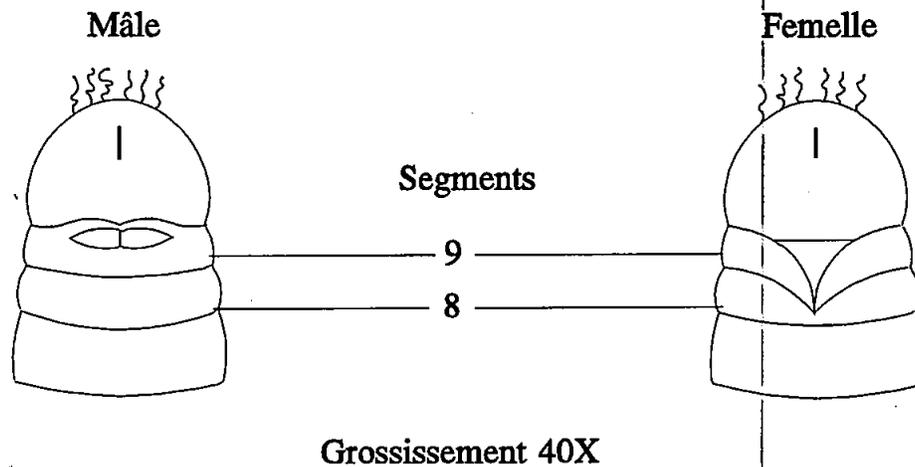


Figure 1. Identification du sexe des chrysalides de la pyrale des cônes du sapin, selon Guy *et al.* (1985).

Durant l'incubation, les oeufs sont disposés dans des plats de plastique (10 cm de largeur par 4 cm de hauteur), lesquels sont recouverts d'une mousseline maintenue en place par un couvercle ayant une large ouverture en son centre (trou de 8 cm de diamètre). Les oeufs sont placés en incubateur à 27 °C, à 80 % d'humidité relative et avec une photopériode de 16:8 (L:O) h.

2.2.5 Les larves

Après leur éclosion, les jeunes larves sont placées individuellement, à l'aide d'un écouvillon stérile, dans de petits godets de 30 ml (Solo Company, Urbana, IL) contenant de la nourriture artificielle. Les contenants sont fermés par un couvercle de plastique préalablement perforé (deux ou trois petits trous) pour en permettre l'aération. Les godets sont disposés sur des plateaux grillagés puis placés dans un incubateur à 25 °C à 60 % d'humidité relative et avec une photopériode de 16:8 (L:O) h. Tous les jours, des données sont prises sur le développement et le taux de survie de l'insecte. Des mesures sur la largeur des capsules céphaliques sont effectuées à tous les stades larvaires à l'aide des capsules rejetées lors de la mue. Ces mesures ont été prises au moyen d'un micromètre adapté à l'oculaire d'un microscope binoculaire, à un grossissement de 100 X. Après 10 jours, les larves

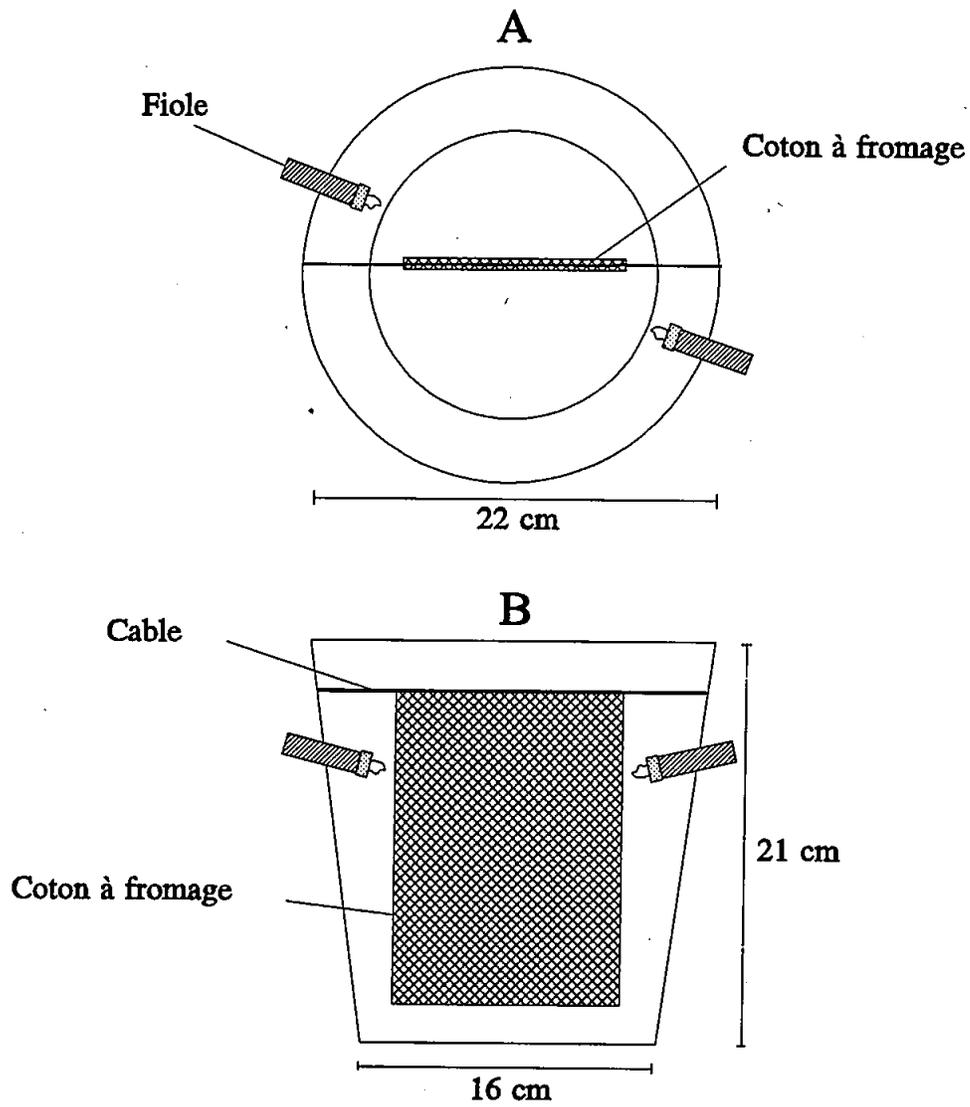
sont transférées sur de la nourriture artificielle fraîche afin de leur permettre de compléter leur développement jusqu'au stade de la chrysalide. Les chrysalides sont extraites des godets, puis identifiées selon leur sexe et pesées.

2.3 Résultats et discussion

Quatre-vingt-neuf larves ont été extraites des cônes et ont servi de colonie de départ pour l'élevage en laboratoire. Après l'élimination de quelques individus contaminés et avec un certain pourcentage de mortalité, 64 insectes sont parvenus au stade adulte.

2.3.1 Accouplement des adultes et ponte des femelles

Les activités de l'adulte liées à sa reproduction ont eu lieu durant la période d'obscurité (scotophase). L'accouplement s'est produit de 36 à 48 heures après l'émergence des adultes. La ponte, quant à elle, a débuté environ 24 heures après l'accouplement et pouvait durer jusqu'à deux semaines. Les femelles ont pondu un nombre moyen de $24,68 \pm 2,02$ oeufs (moyenne \pm écart type, ET, $n = 50$ femelles) lorsqu'il y avait 50 couples par cage. Une des femelles témoins utilisées pour documenter plus spécifiquement leur capacité de ponte a pondu un nombre total de 104 oeufs. Le nombre moyen d'oeufs pondus pour les



Légende: A - vue du dessus

B - vue en coupe longitudinale

Figure 2. Cage pour la pyrale des cônes du sapin servant à l'accouplement et la ponte.

fémmes placées individuellement est de $37,54 \pm 8,64$ oeufs ($n = 10$ femelles). Les oeufs ont été pondus en grande partie (75 %) sur le morceau d'étamine utilisé comme couvercle. Une partie des oeufs a été pondue sur le morceau d'étamine suspendu au centre de la cage. Quelques oeufs ont aussi été pondus sur l'extrémité des distributeurs de sucrose.

À la suite d'une étude sur les rythmes d'activités liés à l'accouplement et à l'oviposition de *D. amatella*, Fatzinger (1981) a observé que l'activité locomotrice de l'insecte commence 25 minutes après le début de la scotophase, que la période d'appel des femelles commence 8 heures après le début de l'obscurité et, enfin, que l'accouplement se produit dans l'heure qui suit. La ponte s'effectue également durant la période d'obscurité (Fatzinger 1981). Les observations sur *D. abietivorella* quant à ses activités nocturnes ressemblent beaucoup à celles qui concernent *D. amatella*, d'où l'importance d'offrir à l'insecte une période d'obscurité suffisamment longue (12 heures) afin de lui permettre d'effectuer ses activités reproductives.

Les données enregistrées sur la ponte des femelles ont démontré qu'il est possible d'avoir plus de succès puisqu'une des femelles testées a pondu plus de 100 oeufs. Même avec une production moyenne de 25 oeufs par femelle, il a été possible de faire fonctionner cet élevage efficacement en utilisant 10 cages, pour finalement obtenir 12 500 oeufs par génération. Lyons (1957) a observé que les femelles de *Dioryctria disclusa* (Heinrich) pouvaient pondre de 10 à 55 oeufs, mais que très peu pouvaient en pondre plus de 100. Des observations de Fatzinger (1981) sur la ponte de *D. amatella* ont révélé que les femelles pouvaient pondre un nombre moyen de $95,4 \pm 12,6$ oeufs (moyenne \pm ET) en utilisant un substrat d'oviposition naturel.

Les femelles ont semblé préférer pondre sur les surfaces horizontales plutôt que sur les surfaces verticales. Un comportement semblable a été noté chez des femelles de *D. disclusa* où des oeufs ont été trouvés sur des branches et sur de vieilles aiguilles, lesquelles sont disposées horizontalement (Lyons 1957, Mattson 1986). Ruth (1980) et Rappaport et Volney (1989) ont cependant observé la présence d'oeufs de *D. abietivorella* sur des écailles de cônes de douglas taxifolié, qui eux sont en position verticale dans l'arbre. Dans des conditions d'élevage, il est donc préférable d'utiliser des substrats de ponte horizontaux et verticaux dans le but d'optimiser la ponte et de maximiser la récolte d'oeufs. De plus, il est conseillé d'utiliser un substrat de ponte comme l'étamine car, dans la nature, les femelles pondent leurs oeufs dans des anfractuosités (Ruth *et al.* 1982).

Des études électrophysiologiques ont montré que les femelles de *C. fumiferana* sont dotées, au niveau de leur proboscis, de sensilles gustatives qui servent à choisir un site de ponte (Rivet et Albert 1990). En outre, les adultes de pyrale réagissent aux monoterpènes des cônes de leur hôte (Asher 1970). Des substances volatiles de même nature pourraient donc servir à stimuler l'oviposition (Fatzinger et Merkel 1985); ces derniers auteurs ont d'ailleurs observé que l'oviposition des femelles de *D. amatella* est positivement corrélée au contenu en monoterpènes et à la densité du bois.

2.3.2 Éclosion et développement larvaire

Les larves de premier stade étant récoltées un fois par jour, elles pouvaient rester un maximum de 24 heures sans nourriture. Le taux de succès d'éclosion des oeufs est donc sous-estimé du fait que les jeunes larves, en l'absence de nourriture, s'alimentaient d'oeufs présents sur l'étamine. Malgré ce fait, le taux de succès d'éclosion des oeufs a été évalué à 60 %, en comparant le nombre de larves de stade 1 obtenues au nombre d'oeufs avant l'incubation. Le développement larvaire comprend cinq stades; dans 25,6 % des cas cependant, il y a eu un 6^e stade larvaire. Les mesures de largeur des capsules céphaliques pour les mâles et les femelles des différents stades sont présentées au Tableau 2. Les durées de développement larvaire pour les mâles et les femelles, de la larve de premier stade jusqu'à la chrysalide, sont respectivement de $22,54 \pm 0,56$ jours et de $22,80 \pm 0,80$ jours. Les poids moyens des chrysalides mâles et femelles de *D. abietivorella* sont respectivement de $62,96 \pm 1,07$ mg et de $61,42 \pm 1,68$ mg. Il n'y a pas de différence significative entre les mâles et les femelles en ce qui concerne la largeur des capsules céphaliques, les durées de développement et le poids des chrysalides ($P > 0,05$, test de Waller-Duncan) (SAS Institute 1985). Aucune diapause n'a été nécessaire à *D. abietivorella* dans ces conditions d'élevage (Trudel *et al.* 1995).

Le temps de développement de *D. amatella*, de la larve de premier stade jusqu'à la pupaison, est de $28,1 \pm 0,5$ jours et compte cinq stades larvaires (Fatzinger 1981). Ne connaissant pas les facteurs abiotiques entourant le développement larvaire de l'insecte, il est un peu difficile de comparer. Malgré tout on retrouve le même nombre de stades larvaires et des durées de développement semblables. Lyons (1957) a mesuré la largeur des capsules céphaliques des différents stades larvaires de *D. disclusa* et celles-ci se rapprochent appréciablement de nos résultats (stade 1 = 0,26 mm; stade 2 = 0,40 mm; stade 3 = 0,57 mm; stade 4 = 0,92 mm; stade 5 = 1,44 mm).

Tableau 2. Données sur le développement de *D. abietivorella* dans des conditions artificielles

Stade de développement	Sexe ^a	n	Capsule céphalique	Jour ^b
			Largeur (mm ± SEM ^a)	Moyenne ± ET
Stade 1	M	37	0,2517 ± 0,0015	0
	F	25	0,2525 ± 0,0016	0
Stade 2	M	37	0,3760 ± 0,0051	4,19 ± 0,09
	F	24	0,3844 ± 0,0052	4,08 ± 0,10
Stade 3	M	37	0,6115 ± 0,0128	6,97 ± 0,18
	F	24	0,6158 ± 0,0162	6,60 ± 0,17
Stade 4	M	37	1,0193 ± 0,0269	9,78 ± 0,27
	F	24	0,9802 ± 0,0396	9,84 ± 0,30
Stade 5	M	37	1,5521 ± 0,0373	13,19 ± 0,25
	F	22	1,4747 ± 0,0482	12,84 ± 0,30
Stade 6	M	29	1,7069 ± 0,0152	17,90 ± 0,28
	F	25	1,7133 ± 0,0139	17,71 ± 0,61
Chrysalide	M	37	**	22,54 ± 0,56
	F	25	**	22,80 ± 0,80

^a Il n'y a pas de différence significative entre les mâles et les femelles en ce qui concerne les largeurs de capsules céphaliques et les temps de développement (test de Waller-Duncan, $P > 0,05$).

^b Nombre de jours après l'éclosion de la larve de premier stade.

Tableau 3. Taux de survie de *D. abietivorella* dans des conditions artificielles

Période de développement		% de survie (± ET)
du	au	(n = 3) ^a
1 ^{er} stade	3 ^e stade	67,9 ± 1,3
3 ^e stade	5 ^e stade	96,3 ± 3,0
1 ^{er} stade	Chrysalide	59,7 ± 2,5
Chrysalide	Adulte	84,9 ± 2,5
1 ^{er} stade	Adulte	51,3 ± 2,2

^a Moyenne de trois générations (F₆) : F₆ n = 40 larves; F₇ n = 72 larves; F₈ n = 115 larves.

2.3.3 Taux de survie

Les taux de survie de *D. abietivorella* selon les différents stades de développement sont présentés au Tableau 3. Le fait que les insectes soient élevés individuellement optimise la survie, puisque lorsque les insectes sont en groupe de deux ou trois, il y a considérablement de cannibalisme. C'est entre le premier et le troisième stade larvaire que l'on trouve le plus bas taux de survie avec $67,9 \pm 1,3 \%$ ($n =$ trois générations), tandis que le plus haut taux de survie se retrouve entre le stade 3 et le stade 5 avec $96,3 \pm 3,0 \%$ ($n =$ trois générations).

Le comportement agressif de *D. abietivorella* a été observé par Rappaport et Volney (1989). Elles ont constaté que des larves pouvaient s'alimenter de stades immatures de *Contarinia oregonensis* Foote. Il est donc fortement recommandé d'élever la pyrale des cônes du sapin individuellement afin d'assurer une meilleure survie des insectes. Les résultats d'élevage de *D. abietivorella* obtenus après plus de trente générations d'insectes se comparent à ceux obtenus au moyen d'autres méthodes reconnues (Robertson 1985).

Chapitre trois

Épreuves biologiques avec le *Bacillus thuringiensis*

3.1. Introduction

La pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella* (Grote), est un insecte qui réduit considérablement le rendement des vergers à graines en détruisant de grandes quantités de cônes. La mise au point d'un moyen de lutte contre *D. abietivorella* permettrait de contenir les populations de cet insecte de façon à réduire les pertes.

Grâce à la mise au point d'une méthode d'élevage efficace de la pyrale des cônes du sapin, on a pu obtenir une grande quantité d'insectes dans des conditions d'aseptie (v. chapitre deux). Une partie des insectes a servi au maintien de la colonie, tandis que l'autre a été utilisée pour tester le pouvoir insecticide du *Btk*. Connaissant l'effet pathogène du *Btk* (sérotypage H-3a:3b) contre les lépidoptères (Aronson *et al.* 1986, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991), on l'a donc utilisé contre la pyrale des cônes du sapin. Le pouvoir insecticide du *Btk* a déjà été démontré pour trois insectes de la famille des Pyralidae: *Plodia interpunctella* (Hübner) (McGaughey et Johnson 1994, Tabashnik et McGaughey 1994), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Bartelt *et al.* 1990, Ehora *et al.* 1994, Gillespie *et al.* 1994, McGuire *et al.* 1994) et *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Moar *et al.* 1995).

Des méthodes standards d'épreuves biologiques ont été utilisées afin de vérifier le potentiel insecticide de cet entomopathogène contre la pyrale (Laboratoire de microbiologie du MRN). La concentration létale 50 % (CL-50) a été utilisée comme outil pour évaluer la vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin à la souche HD-1 du *Btk*. Cette étude a été effectuée sur des pyrales de 1^{er}, 3^e et 5^e stade larvaire afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les différents stades testés concernant la vulnérabilité de l'insecte au *Btk*.

Les informations obtenues devraient permettre d'élaborer une méthode de lutte afin de contenir les populations de pyrales des cônes du sapin en-deçà d'un seuil limite de tolérance.

3.2. Matériel et méthode

3.2.1. Préparation des larves pour les épreuves biologiques

Pendant la période précédant leur utilisation, les larves sont maintenues sur une nourriture artificielle (voir section 3.2.2) à une température de 25 °C, à une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16:8 (L:O) h. La durée de cette période dépendra du stade désiré pour effectuer les épreuves biologiques: une période de 7 jours ou de 14 jours suivant l'éclosion du 1^{er} stade est nécessaire pour obtenir des larves de 3^e stade ou de 5^e stade. Lors d'épreuves biologiques utilisant des larves de stade 1, ces dernières sont placées directement sur leur traitement respectif après leur éclosion.

Les épreuves biologiques ont été effectuées sur quatre à cinq générations pour chacun des stades testés. Trois réplicats ont été réalisés par génération sur trois jours consécutifs, ce qui donne un nombre maximal de 15 répétitions par stade. Ces travaux ont nécessité l'utilisation de 15 750 larves de tous les stades pendant la période expérimentale.

3.2.2. Préparation de la nourriture artificielle

La préparation de la nourriture artificielle est décrite au chapitre deux, section 2.2.2. Les éléments du groupe III, soit la formaline 10 % et l'auréomycine, ne sont pas ajoutés à la nourriture artificielle parce qu'ils pourraient avoir des effets sur les résultats de CL-50. Ces effets peuvent être variables selon l'âge des larves (Beegle 1985, Beegle 1990). Il a été

démontré que certains antibiotiques, dont l'auroéomycine, pouvaient inhiber la croissance du *Bt* (Ignoffo 1963, Beegle *et al.* 1981).

3.2.3. Préparation de la solution-mère de l'étalon HD-1 et de ses dilutions

Les préparations de solution mère ont été faites à partir d'une poudre étalon de HD-1 dont le potentiel a été évalué à 16 000 UI/mg (USDA, North. Reg. Res. Cen., Peoria, Illinois). Cent mg de l'étalon HD-1 sont d'abord pesés, puis déposés dans une bouteille à dilution de lait stérile contenant 100 ml d'eau déionisée. Il faut par la suite bien agiter la suspension, puis la placer dans un bain à ultra-sons pendant 5 minutes.

Une série de six dilutions est ensuite préparée en utilisant de l'eau déionisée; chacune doit être équivalente à 75 % de la dilution précédente (en commençant par la moins concentrée). Le volume total des différentes dilutions doit être de 10 ml (Tableau 4). Tous ces volumes sont mesurés à l'aide d'une pipette de précision avec embout stérile et sont effectués sous une hotte à flux laminaire.

3.2.4. Incorporation des dilutions dans la nourriture artificielle

La nourriture artificielle, préparée comme le décrit la section 3.2.2, est agitée de façon constante et maintenue à une température de 55 °C au moyen d'un bain-marie à thermostat. Cent trente millilitres de nourriture artificielle ainsi qu'un volume de 10 ml

provenant de la dernière dilution de la solution-mère sont versés dans un micro-mélangeur, qu'on met en marche à vitesse réduite, augmentée graduellement jusqu'à la vitesse maximale. Il faut laisser fonctionner le mélangeur à sa vitesse maximale pendant une minute. Par la suite, le contenu du mélangeur est versé dans 50 contenants de 30 ml (Solo Company, Urba, IL) disposés sur un plateau grillagé. Ces étapes sont répétées pour toutes les autres dilutions, jusqu'à la plus concentrée. Pour ce qui est du témoin, 10 ml d'eau déionisée sont ajoutés aux 130 ml de nourriture artificielle. Afin de permettre au substrat de se solidifier, une période d'une heure est nécessaire avant d'introduire les insectes sur la nourriture artificielle contaminée.

3.2.5. Introduction des larves sur la contaminée

Les larves de pyrales sont déposées individuellement à l'aide d'une pince molle stérile dans chacun des 50 contenants disposés sur le plateau grillagé. Chaque plateau correspond à une dilution ou à un témoin. Les contenants sont par la suite recouverts d'un couvercle de plastique perforé (un à deux trous). Les plateaux sont placés dans un incubateur à une température de 25 °C, une humidité relative de 60 %, avec une photopériode de 16:8 (L:O) h. Ils sont examinés après 7 jours d'incubation et les larves mortes sont dénombrées pour chacune des dilutions. La larve est diagnostiquée morte si, après qu'on l'ait touchée, il n'y a aucune réaction.

Tableau 4. Exemple de préparation des dilutions de *Bt* et évaluation de la concentration correspondante en μg de *Btk* par ml de nourriture artificielle

Dilution n°	Volume de la solution-mère (ml)	Volume d'eau déionisée (ml)	Volume total de la dilution (ml)
1	0,840	9,16	10,0
2	0,630	9,37	10,0
3	0,470	9,53	10,0

Calcul de la concentration (dilution 1 ou D₁) :

* Solution-mère (SM) de départ	100 mg <i>Bt</i> → 100 ml H ₂ O = 1 mg <i>Bt</i> / ml H ₂ O
* Prélèvement d'un volume que l'on complète à 10 ml	0,84 ml de SM + 9,16 ml H ₂ O = 10 ml de D ₁ ↓ 0,84 mg <i>Bt</i> → 10 ml (D ₁) = 0,84 mg <i>Bt</i> / 10 ml H ₂ O
* Incorporation de la dilution dans la nourriture artificielle	0,84 mg <i>Bt</i> / 10 ml + 130 ml de nourriture artificielle = 0,84 mg <i>Bt</i> / 140 ml de nourriture artificielle
* Réduction pour obtenir la concentration finale	0,84 mg / 140 ml → 0,006 mg / ml → 6,0 μg <i>Bt</i> / ml de nourriture artificielle.

3.2.6. Calcul de la CL-50

Afin de déterminer la CL-50 du standard HD-1, il faut connaître le nombre de larves mortes ainsi que le nombre total de larves utilisées pour chacune des dilutions. Par la suite, il faut évaluer à quoi correspondent les dilutions en terme de concentration, dont les unités sont des μg de *Btk*/ml de nourriture artificielle (Tableau 4). Un logiciel informatique utilisant la méthode *Logit* (Berkson 1953) fait le calcul de la CL-50 en utilisant le nombre de larves mortes pour une concentration de *Btk* donnée. La méthode *Logit* effectue une analyse de régression basée sur un modèle logarithmique.

3.2.7. Analyse statistique

Afin de s'assurer de l'homogénéité des résultats de CL-50 au sein des différentes générations pour un stade donné, des analyses de variance utilisant la procédure *PROC GLM* de *SAS* (*SAS Institute* 1985) ont été effectuées. D'autres analyses statistiques faisant appel à des tests de comparaisons multiples (Waller-Duncan) ont été réalisés sur les résultats de CL-50 des différents stades, dans le but de vérifier si le niveau de vulnérabilité à l'entomopathogène varie selon l'âge larvaire. Le niveau de rejet pour toutes les analyses statistiques a été établi à $\alpha = 0,05$.

3.3. Résultats

La vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin au *Btk* a été observée dès les premières épreuves avec l'entomopathogène. Les larves mortes étaient gonflées et avait cessé leur développement. La mortalité larvaire augmentait de façon logarithmique en fonction des concentrations de *Btk* utilisées. À l'opposé, les larves témoins introduites sur de la nourriture saine se sont développées normalement et de très faibles taux de mortalité ont été observés.

3.3.1. CL-50 des larves de stade 1

Les résultats de la CL-50 des larves de stade 1 sont présentés à la Figure 3. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes générations en ce qui concerne les CL-50 des stades 1 ($P = 0,2664$). La CL-50 du *Btk* pour ce stade est de $5,33 \mu\text{g}/\text{ml}$ de nourriture artificielle et la pente de la courbe est de (moyenne \pm écart type) $3,90 \pm 0,38$. Les insectes ayant survécu aux traitements avec le *Btk* étaient très peu mobiles et avaient à peine atteint le stade 2. La majorité des larves utilisées comme témoins sur de la nourriture saine s'étaient développées jusqu'au 3^e stade larvaire après 7 jours. Le taux de mortalité des larves témoins variait de 2 à 8 %.

3.3.2. CL-50 des larves de stade 3

La Figure 4 présente les résultats de la CL-50 des larves de stade 3. Aucune différence significative n'a été observée entre les générations en ce qui concerne les CL-50 de ce stade ($P = 0,1473$). Une CL-50 de $4,75 \mu\text{g}$ de *Btk* par ml de nourriture artificielle a été obtenue avec une pente de $3,14 \pm 0,32$. Les pyrales ayant survécu aux différentes concentrations de *Btk* étaient inertes et avaient à peine atteint le stade 4. La plupart des larves utilisées comme témoin étaient rendues au 5^e stade larvaire après 7 jours. Le taux de mortalité des larves témoins était inférieur à 2 %.

3.3.3. CL-50 des larves de stade 5

Les résultats de la CL-50 du *Btk* utilisant des larves de stade 5 sont présentés à la Figure 5. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes générations concernant les CL-50 des stades 5 ($P = 0,3345$). La CL-50 du *Btk* est de $4,17 \mu\text{g}$ par ml de nourriture artificielle et la pente de la courbe est de $3,03 \pm 0,29$. Les larves ayant survécu aux traitements avec le *Btk* étaient très peu mobiles et la métamorphose au stade de chrysalide n'était observée que très rarement. Lors de la lecture après 7 jours, la plupart des larves utilisées comme témoins s'étaient développées jusqu'au stade de la chrysalide. Le taux de mortalité des larves témoins était nul.

3.3.4. Comparaison des CL-50 des différents stades testés

L'analyse statistique des résultats de CL-50 du *Btk* n'a permis d'observer aucune différence significative quant à la vulnérabilité de l'insecte à l'entomopathogène en fonction des stades testés ($P = 0,0706$) (Figure 6). De plus, on observe une diminution des taux de mortalité du témoin avec l'augmentation de l'âge larvaire.

3.4. Discussion

Les épreuves biologiques réalisées avec la pyrale des cônes du sapin ont montré que la souche HD-1 de *Bt* sérovar 3a, 3b, *kurstaki* est toxique pour *D. abietivorella*. Il a été possible de diagnostiquer les effets de l'entomopathogène par des observations qualitatives des larves de différents stades ayant ingéré du *Btk* : l'interruption du développement chez la larve serait provoquée par le jeûne de l'insecte dû à la paralysie de son système digestif (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Gill *et al.* 1992); cette paralysie serait attribuable au changement drastique du pH de l'hémolymphe (alcalin) à la suite des dommages encourus à l'épithélium stomacal (Angus 1962, Gill *et al.* 1992); le

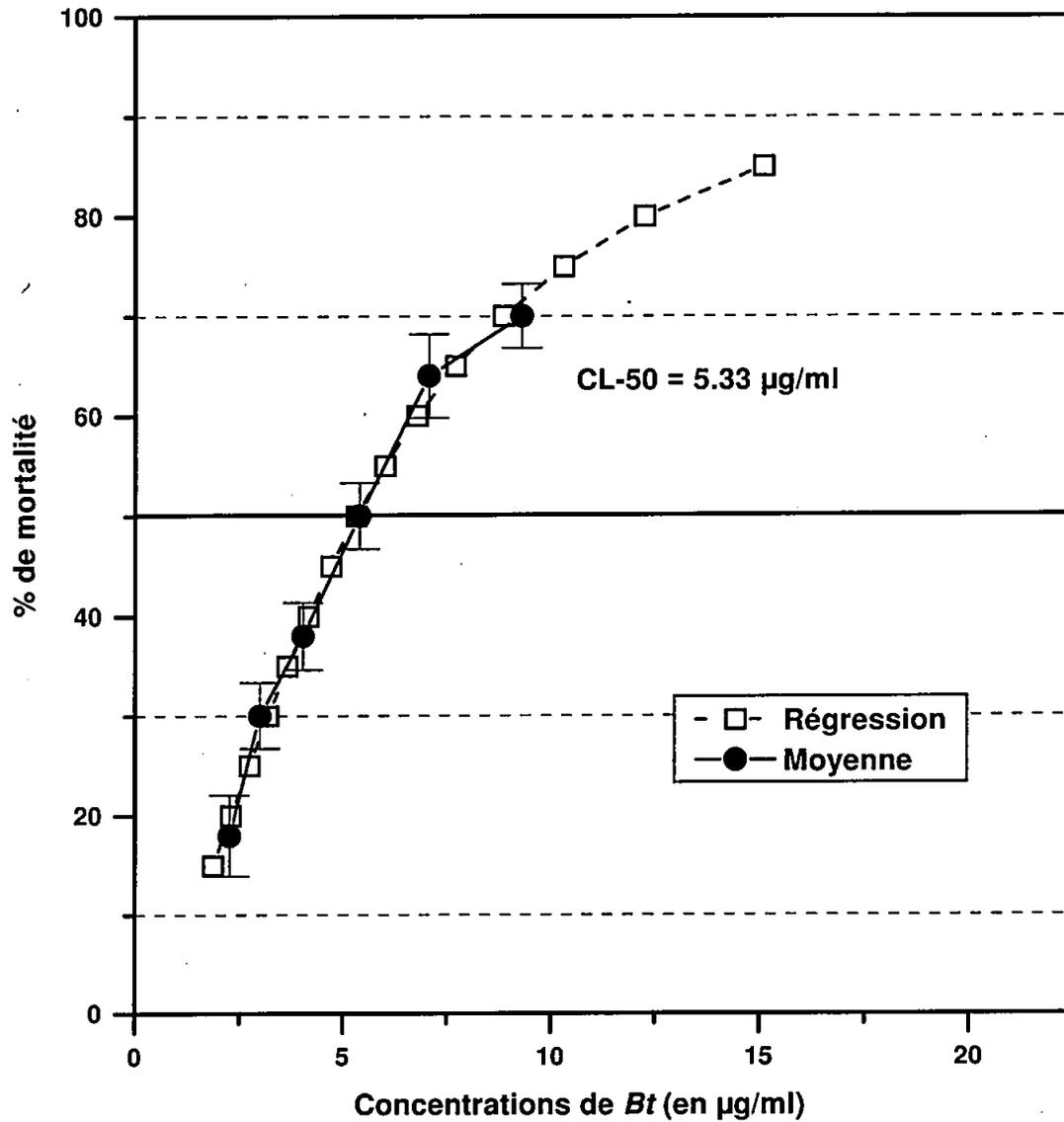


Figure 3. Évaluation de la CL-50 du *Btk* souche HD-1 chez le premier stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin ($n = 14$).

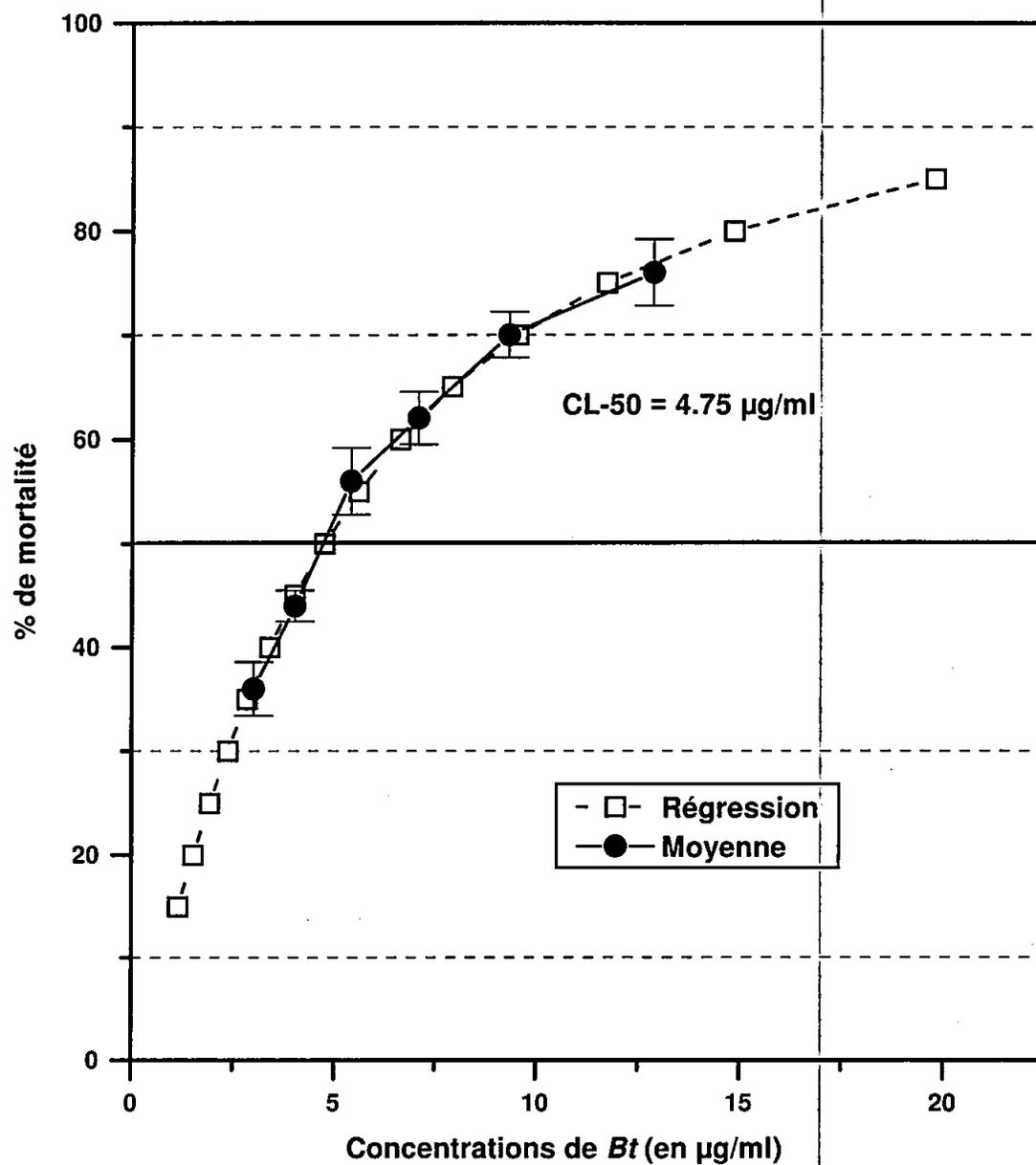


Figure 4. Évaluation de la CL-50 du Btk souche HD-1 chez le troisième stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin ($n = 14$).

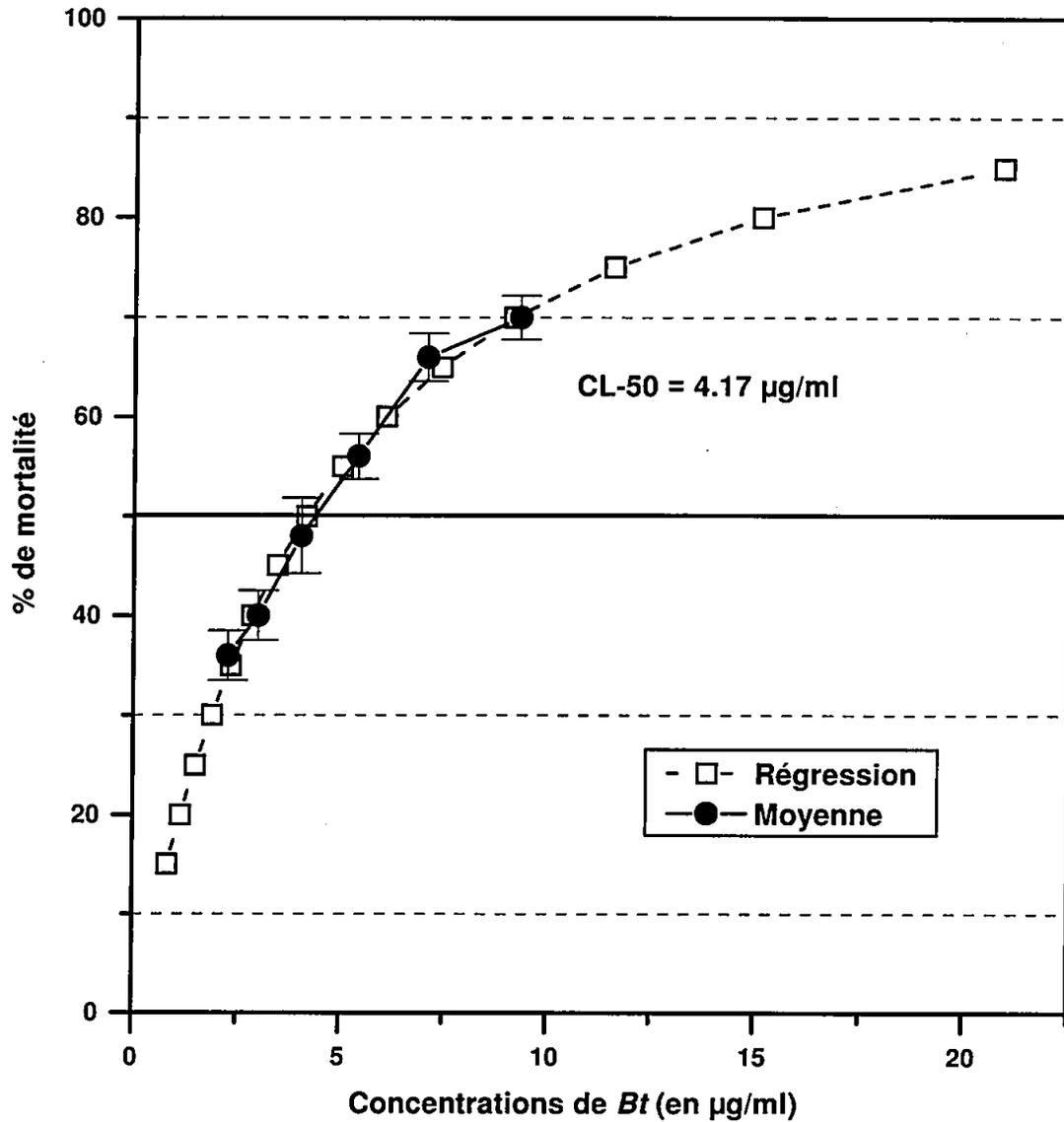


Figure 5. Évaluation de la CL-50 du *Btk* souche HD-1 chez le cinquième stade larvaire de la pyrale des cônes du sapin ($n = 12$).

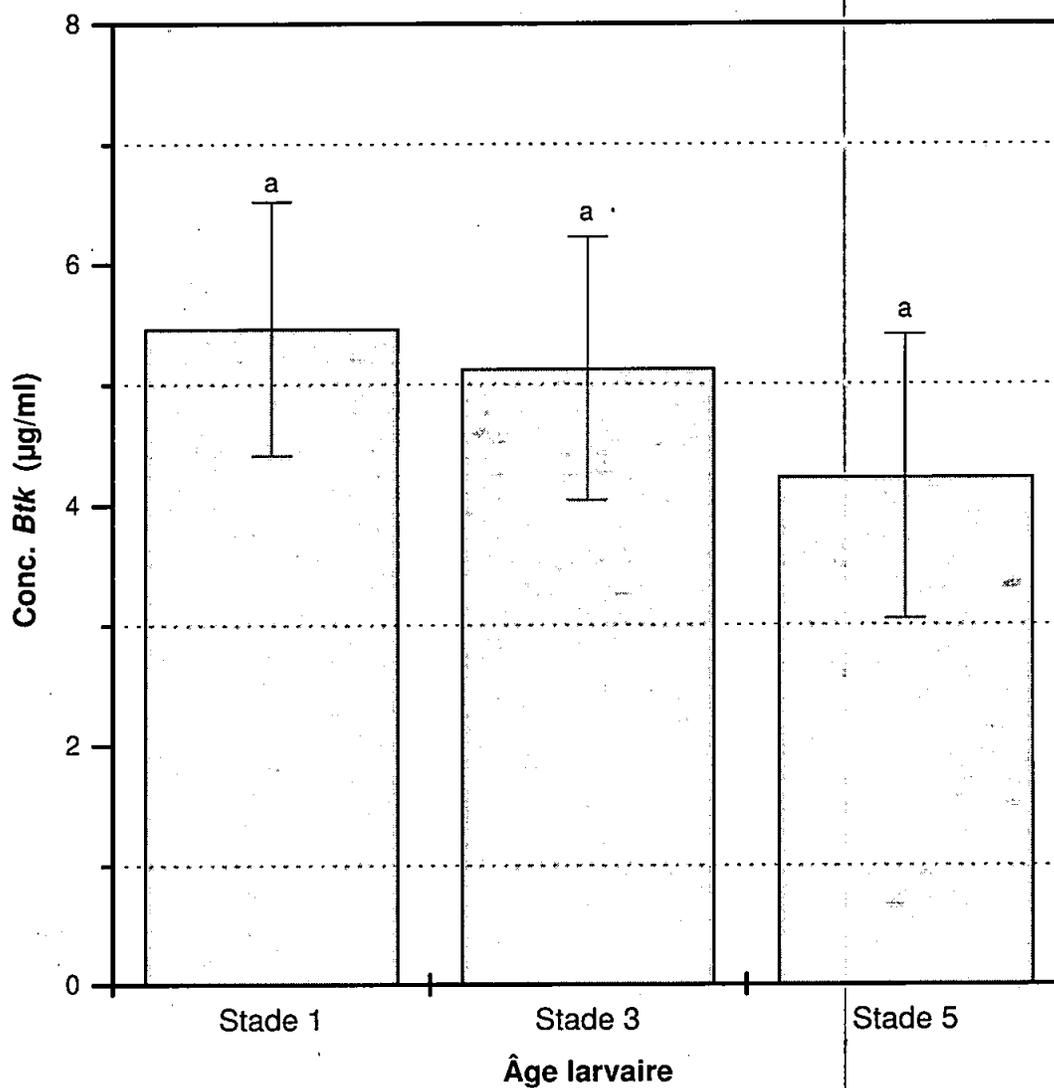


Figure 6. Comparaison des CL-50 moyennes en fonction de différents âges larvaires (Moyenne \pm I.C. 95 %)

gonflement de la larve ainsi que sa coloration noirâtre seraient le résultat de la multiplication et de la germination des spores de *Btk* dans l'hémolymphe. Cet envahissement de l'hémolymphe par les spores de *Btk* aurait provoqué une septicémie, puis la mort chez l'insecte (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Hulme *et al.* 1983).

Les symptômes ont été les mêmes peu importe le stade larvaire étudié. Il en a été de même pour les résultats de CL-50 du *Btk* en fonction des différents stades testés. Beegle *et al.* (1981) ont obtenu des résultats similaires de CL-50, avec des larves de fausse arpenreuse du chou, *Trichoplusia ni* (Hübner), âgées de 1 et 4 jours, lors d'épreuves biologiques avec la souche HD-1-S 1971. On remarque également une légère augmentation (non significative) de la sensibilité de la pyrale au *Btk* avec l'augmentation de l'âge larvaire (Figure 6). La plupart des travaux de recherche sur le potentiel insecticide du *Btk* ont démontré le contraire, soit une diminution de la sensibilité de l'insecte avec l'augmentation de l'âge larvaire (Beegle *et al.* 1981). Par contre, Beegle (1990) a observé une tendance similaire à nos résultats en ce qui concerne le *Dipel WP F-1980* sur des larves de fausse arpenreuse du chou. Les résultats de CL-50 pour des larves néonates (stade 1) et pour des larves de 4 jours (stade 3) étaient respectivement de (moyenne \pm DS) 16 300 \pm 594 UI/mg et 11 500 \pm 675 UI/mg (Beegle 1990).

Lors des calculs de CL-50 à l'aide de la méthode *Logit* (Berkson 1953), les taux de mortalité du témoin sont considérés dans la procédure statistique (Abbott 1925). S'il y a plus de mortalité dans le témoin, le calcul de la CL-50 en sera affecté à la hausse puisqu'il évalue une proportion de la mortalité qui serait attribuable à des causes naturelles et non pas des effets de l'entomopathogène. Nos résultats ont démontré que le taux de mortalité chez le témoin diminuait en fonction de l'augmentation de l'âge larvaire. De plus, ce phénomène a été observé lors de l'élevage de l'insecte dans des conditions d'aseptie, puisque les taux de mortalité les plus élevés se retrouvent entre le stade 1 et le stade 3 et les moins élevés entre le stade 3 et le stade 5 (chapitre deux, tableau 3). La faible variation de la CL-50 entre les stades larvaires pourrait donc être attribuée aux différents taux de mortalité du témoin observés lors des épreuves biologiques.

L'effet pathogène du *Btk* a été observé chez plusieurs autres insectes de l'ordre des lépidoptères (Aronson *et al.* 1986, van Frankenhuyzen et Ortiz 1991, Gill *et al.* 1992). Plus spécifiquement, la toxicité du *Btk* a été étudiée chez des insectes de la famille des Pyralidae, dont *Plodia interpunctella* (Hübner) (McGaughey et Johnson 1994, Tabashnik et McGaughey 1994), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Bartelt *et al.* 1990, Ehora *et al.* 1994, Gillespie *et al.* 1994, McGuire *et al.* 1994) et *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Moar *et al.* 1995). Des résultats de CL-50 similaires ont été obtenus au moyen d'épreuves biologiques utilisant des larves de *E. lignosellus* (Moar *et al.* 1995). Une CL-50 moyenne de 4,83 μ g de *Btk* par g de nourriture artificielle a été observée après l'utilisation de la souche HD-1 de *Btk* sur des larves néonates (Moar *et al.* 1995). Une fois converti en μ g/g, le résultat de la CL-50 moyenne sur des larves de stade 1 de *D. abietivorella* donne 5,1 μ g de *Btk* par g de nourriture artificielle. Des travaux réalisés sur des larves de *O. nubilalis* ont démontré que l'ajout d'un phagostimulant (*Coax*) à une dose de 400 UI/mg de *Btk* (granules) a permis d'obtenir un taux de mortalité de 80 %, comparativement 27 % pour une formulation sans phagostimulant (Bartelt *et al.* 1990). L'ajout de cette substance phagostimulante permettrait de réduire de 75 % le volume utilisé sans affecter la mortalité larvaire (Gillespie *et al.* 1994). Le *Coax* est un phagostimulant d'origine commerciale qui contient du sucrose, de l'huile de graine de coton et de la farine de graine de coton (Bell et Romine 1980). Des substances semblables pourraient être développées par des recherches sur les préférences alimentaires de *D. abietivorella* au moyen de tests électrophysiologiques. Il serait donc possible d'améliorer davantage la performance du pathogène contre la pyrale des cônes du sapin par l'ajout de ces substances à une formulation de *Btk* donnée.

Cette seconde partie de l'étude a permis de montrer que le *Btk* est efficace et qu'il pourrait être expérimenté sur le terrain contre la pyrale des cônes du sapin. Les tests effectués en laboratoire ont démontré que la vulnérabilité de l'insecte à l'entomopathogène est le même tout au long de son développement larvaire. Les résultats obtenus en laboratoire fixent les premiers jalons d'une stratégie de lutte biologique contre *D. abietivorella* afin de protéger adéquatement la production semencière des vergers à graines.

Conclusion

Les vergers à graines sont au début de la chaîne de production d'arbres destinés au reboisement. Ils sont le résultat de sélections d'arbres dans le but de produire des semences d'essences forestières génétiquement améliorées. Ces vergers ont nécessité d'importants investissements pour leur établissement, leur entretien ainsi que leur développement tout au long de leur vie. Afin de maximiser leur productivité, il est nécessaire de lutter contre les insectes des cônes et des graines (Fogal *et al.* 1993). À cette fin, on doit d'abord connaître la biologie des insectes si on veut contenir efficacement leur population de manière à rentabiliser la production semencière.

La pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella* (Grote), fait partie des insectes menaçant la rentabilité des vergers à graines en détruisant des quantités importantes de cônes. Les populations de cet insecte risquent fort de se développer dans les vergers à graines, car la production de cônes y est plus importante et plus soutenue qu'en forêt naturelle. L'élaboration d'une méthode d'élevage pour *D. abietivorella* offre la possibilité de récolter des données fondamentale sur sa biologie et son cycle vital. La durée de développement, la détermination des stades

larvaires ainsi que la fécondité des femelles de *D. abietivorella* sont des informations indispensables à la mise en place d'une stratégie de lutte biologique visant à minimiser les dégâts causés par ce ravageur. De plus, la production massive de pyrales dans des conditions d'axénie a permis de réaliser des épreuves biologiques afin de tester en laboratoire un entomo-pathogène efficace.

Actuellement au Canada, aucun produit n'a encore été homologué pour lutter contre *D. abietivorella*. Des études antérieures ont pourtant démontré l'efficacité du *Btk* contre plusieurs autres lépidoptères, dont la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Cette bactérie entomopathogène contient en effet une toxine qui provoque la mort de certains types d'insectes. Grâce à cette étude, il a été possible de mesurer la vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin au *Btk*. Les épreuves biologiques effectuées sur des larves de stades 1, 3 et 5 nous permettent d'affirmer que le *Btk* est efficace à n'importe quel stade larvaire. D'ores et déjà, il est possible d'élaborer une méthode de lutte contre la pyrale des cônes du sapin, à l'aide du *Btk*, qui nous permettra de réduire les dégâts causés par cet insecte.

Recommandations

La pyrale des cônes du sapin est une menace à la rentabilité des vergers à graines, au Québec et à travers le Canada. Le fait d'avoir très peu d'informations sur sa biologie, ses performances en fonction de ses hôtes et son cycle vital nous laisse sans moyen pour contrer les méfaits de cet insecte. Les études réalisées au cours de cette recherche ont permis d'identifier un outil de lutte potentiellement efficace contre la pyrale des cônes du sapin.

Des travaux de recherche ultérieurs axés sur l'écologie alimentaire de la pyrale seront nécessaire au développement et à l'application d'une stratégie de lutte contre *D. abietivorella*. Ces informations nous renseigneront sur les ressources alimentaires de la pyrale des cônes du sapin en absence de cônes, ainsi que sur ses performances en association avec ses diverses sources nutritives. De plus, il serait intéressant de comparer les performances de pyrales après leur développement sur différentes essences de conifères utilisées dans les vergers à graines. La réalisation de cette étude permettrait d'identifier les sites propices à l'expansion de l'insecte en fonction de l'essence utilisée. Des mesures pourraient donc être prises afin d'effectuer des suivis appropriés selon le niveau de risque pour l'établissement de populations de *D. abietivorella*.

Des études sur la phénologie de la pyrale des cônes du sapin en fonction du climat québécois devraient être entreprises afin de bien connaître le cycle vital de l'insecte. Par la suite, il serait possible de savoir pendant quelle période de l'année les larves sont actives et à quel stade elles passent l'hiver. Les connaissances que nous auront acquises sur la phénologie de l'insecte nous permettront de mieux diriger nos interventions dans le but de réprimer efficacement les populations de pyrales des cônes du sapin.

Les problèmes entourant l'identification de l'espèce pourraient être résolus par l'utilisation d'outils faisant appel à la biologie moléculaire. Les sondes moléculaires permettraient le dépistage de la pyrale des cônes du sapin par la caractérisation de ses empreintes génétiques, rendant ainsi possible une identification précise.

À l'aide de ces informations, il serait possible d'élaborer un dispositif de surveillance et de contrôle afin d'éviter la croissance des populations de pyrale des cônes du sapin dans les vergers à graines et, par le fait même, optimiser le rendement de ces derniers.

Références

- Abbott, W.S., 1925. *A method of computing the effectiveness of an insecticide*. J. Econ. Entomol. 18 : 265-267.
- Angus, T.A., 1962. *The biochemistry and mode of action of Bacillus thuringiensis (Berliner) and its varieties*. Dep. For., Ins. Pathol. Res. Inst., Sault-Sainte-Marie, Ont., Canada, No. 37, Coll. Int. Pathol. Insectes, Paris, 1962.
- Aronson, A.I., W. Beckman et P. Dunn, 1986. *Bacillus thuringiensis and related insect pathogens*. Microbiol. Rev. 50 : 1-24.
- Asher, W.C., 1970. *Olfactory response of Dioryctria abietella (Lepidoptera : Phycitidae) to slash pine cones*. Ann. Entomol. Soc. Am. 63 : 474-476.
- Barjac, H. de, 1981. *Identification of H-serotypes of Bacillus thuringiensis*. Dans : H.D. Burges [éd.]. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, New York : 35-43.
- Barjac, H. de, et E. Frachon, 1990. *Classification of Bacillus thuringiensis strains*. Entomophaga 35 : 233-240.
- Bartelt, R.J., M.R. McGuire et D.B. Black, 1990. *Feeding stimulant for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additive to starch-based formulation for Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 19 : 182-189.
- Bauce, É. et N. Carisey, 1996. *Larval feeding behaviour affects the impact of staminate flower production on the suitability of balsam fir trees for spruce budworm*. Oecologia 105 : 126-131.

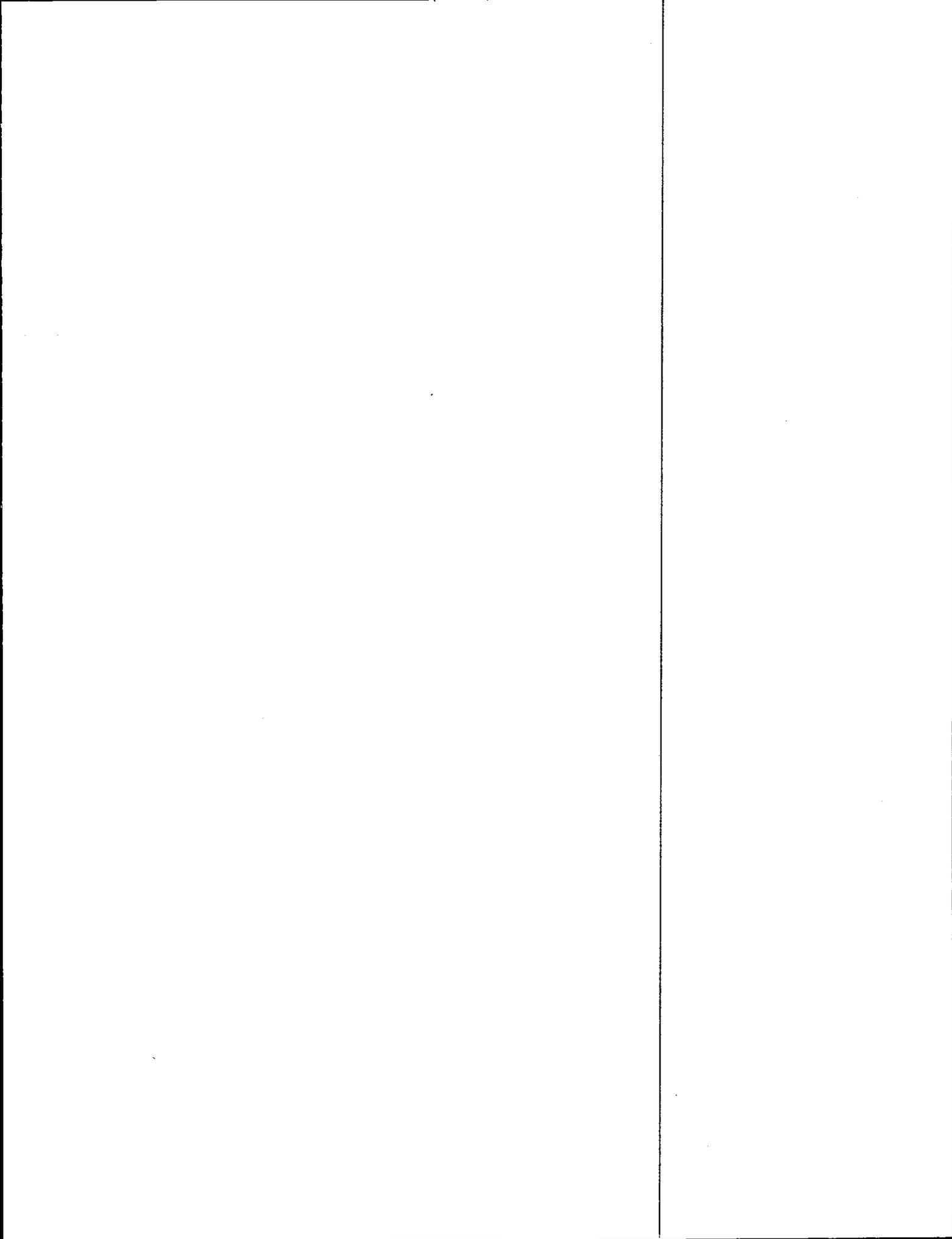
- Bauer, L.S., 1995. *Resistance : a threat to the insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis*. Flo. Ent. 78 : 414-443.
- Beegle, C.C., 1985. *The bioassay of Bacillus thuringiensis based preparation: historical perspectives and current status*. USDA-ARS, Ins. Pathol. Res. Unit, Brownsville, Texas.
- Beegle, C.C., 1990. *Bioassay methods for quantification of Bacillus thuringiensis δ -endotoxine*. Dans : L.A. Hickie et W.L. Fitch [éd.]. *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Washinton, DC. : 14-21.
- Beegle, C.C., L.C. Lewis, R.E. Lynch et A.J. Martinez, 1981. *Interaction of larval age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 37 : 143-153.
- Bell, M.R. et C.L. Romine, 1980. *Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using Bacillus thuringiensis and nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant*. J. Econ. Entomol. 73 : 427-430.
- Berkson, J., 1953. *A statistically precise and relatively simple method of estimating the bioassay with quantal response, based on the logistic function*. J. Amer. Statist. Ass. 48 : 565-589.
- Bidon, Y., 1993. *Influence des sucres solubles et de l'azote sur la croissance, le développement et l'utilisation de la nourriture par la tordeuse des bourgeons de l'épinette, Choristoneura fumiferana (Clem.)*. Mémoire de M.Sc., Université Laval, Québec, Canada.
- Bonnet-Masimbert, M. et J.B. Zaerr, 1987. *The role of plant growth regulator in promoting of flowering*. Plant Growth Regulation 6 : 13-35.
- Brodbeck, B. et D. Strong, 1988. *Amino acid nutrition of herbivorous insects and stress to host plants*. Dans : P. Barbosa et J. C. Schultz [éd.]. *Insect outbreaks*. Academic Press, San Diego, Californie. 578 p. : 347-364.
- Brousseau, R., A. Saint-Onge, G. Préfontaine, L. Masson et J. Cabana, 1993. *Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify Bacillus thuringiensis serovars and strains*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 114-119.
- Burgess, D., J.A. Baldock, S. Wetzell et D.G. Brand, 1995. *Scarification, fertilisation and herbicide treatment effectd on planted conifers and soil fertility*. Plant and Soil 168-169 : 513-522.
- Calabrese, D.M., K.W. Nickerson et L.C. Lane, 1980. *A comparison of protein crystal subunit sizes in Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 26 : 1006-1010.
- Cates, R.G., C.B. Henderson et R.A. Redak, 1987. *Responses of the western spruce budworm to varying levels of nitrogen and terpenes*. Oecologia 73 : 312-316.
- Charmillot, P.-J. et D. Pasquier, 1992. *Efficacité comparée d'une préparation à base de Bacillus thuringiensis Berliner sur les vers de la grappe Lobesia botrana Den et Schiff et Eupoecilia ambiguella Hb*. Bull. Soc. Entomol. Suisse 65 : 141-147.
- Dubois, N.R. et F.B. Lewis, 1981. *What is Bacillus thuringiensis*. J. Arboriculture 7 : 233-240
- Ebell, L.F., 1971. *Girdling: its effect on carbohydrate status and on reproductive bud and cone development of Douglas fir*. Can. J. Bot. 49 : 453-466.
- Ebersold, H.R., P. Lüthy et M. Mueller, 1977. *Changes in the fine structure of the gut epithelium of Pieris brassicae induced by δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis*. Bull. Soc. Entomol. Suisse 50 : 269-276.
- Ebersold, H.R., P. Lüthy, P. Geiser et L. Ettliger, 1979. *The action of the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis : an electron microscope study*. Experientia 34 : 1672.
- Ebora, R.V., M.M. Ebora et M.B. Sticklen, 1994. *Transgenic potato expressing the Bacillus thuringiensis CryIA(c) gene effects on the survival and food consumption of Phtorimea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae) and Ostrinia nubilalis (Lepidoptera : Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. 87 : 1122-1127.
- Farrar, R.R. et R.L. Ridgway, 1994. *Comparative studies of the effects of nutrient-based phagostimulants of six lepidopterous insect pests*. J. Econ. Entomol. 87 : 44-52.
- Fast, P.G., 1974. *Bacillus thuringiensis. Its history and mode of action*. Dev. Ind. Microbiol. 15 : 195-198.

- Fast, P.G., 1977. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: on the relative roles of the spores and crystals in toxicity to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Ent.* 109 : 1515-1518.
- Fatzinger, C.W., 1981. *Activity rhythms, influence of host plant on mating and oviposition, and rearing of the southern pine coneworm (Lepidoptera: Pyralidae)*. *Fla. Entomol.* 64 : 506-515.
- Fatzinger, C.W. et E.P. Merkel, 1985. *Oviposition and feeding preferences of the southern pine coneworm (Lepidoptera: Pyralidae) for different host-plant materials and observations on monoterpenes as an oviposition stimulant*. *J. Chem. Ecol.* 11 : 689-699.
- Fogal, W.H., 1979. *Bionomic sketches of insects and fungal pests of cones and seeds of forest trees in Canada east of the Rockies*. Petawawa For. Exp. Sta., Can. For. Serv., Ckalk River, Ont., Inf. Rep. PS-X-72. 17 p.
- Fogal, W.H. et S.M. Lopushanski, 1989. *Stem incorporation of systemic insecticides to protect white spruce seed trees*. *For. Chron.* 65 : 359-364.
- Fogal, W.H. et V.C. Plowman, 1990. *Systemic insecticides for protecting northern spruce and pine seed trees*. *For. Can. Inf. Rep.* PI-X-92. 16 p.
- Fogal, W.H., S.M. Lopushanski, D.A. MacLeod et D.A. Winston, 1988. *Soil incorporation of carbofuran for protecting black spruce seed trees from insects*. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 119 : 69-78.
- Fogal, W.H., S.M. Lopushanski, H.O. Schooley et D.A. Winston, 1993. *Reproductive development and insect damage on white and black spruce seed trees treated with ammonium nitrate and carbofuran*. *Can. J. For. Res.* 23 : 1786-1792.
- Gill, S.S., E.A. Cowles et P.V. Pietrantonio, 1992. *The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins*. *Ann. Rev. Entomol.* 37 : 615-636.
- Gillespie, R.L., M.R. McGuire et B.S. Shasha, 1994. *Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae*. *J. Econ. Entomol.* 87 : 452-457.
- Grisdale, D.G., 1984. *A laboratory method for mass rearing the eastern spruce budworm, Choristoneura fumiferana (Clemens)*. Dans : E.G. King et N.C. Leppla [éd.]. *Advances and challenges in insect rearing*. USDA-ARS, New Orleans, Louisiana : 223-231.
- Guy, R.H., N.C. Leppla et J.R. Rye, 1985. *Trichoplusia ni*. Dans : P. Singh et R.F. Moore [éd.], *Handbook of insect rearing*, vol. II. USDA, Cotton Production Research Unit, Florence, SC : 497-494.
- Haverty, I.H., P.J. Shea et L.E. Stipe, 1986. *Single and multiple applications of fenvalerate to protect western pine cones from Dioryctria abietivorella (Lepidoptera: Pyralidae)*. *J. Econ. Entomol.* 79 : 158-161.
- Hedlin, F.A., H.O. Yates III, D.C. Tovar, B.H. Ebel, T.W. Koerber et E.P. Merkel, 1980. *Cone and seed insects of North America conifers*. *Can. For. Serv., Ottawa, Ont.; USDA-For. Serv., Washington, D.C.; et Secr. Agric. Recursos* : 78-80.
- Heimpel, A.M., 1956. *Further observations on the pH in the gut and the blood of Canadian insects*. *Can. J. Zool.* 34 : 210-212.
- Huber, H.E. et P. Lüthy, 1981. *Bacillus thuringiensis d-endotoxine: composition and activation*. Dans : O. Allanheld [éd.]. *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Davidson Press, Totowa, N. J., USA : 209-234.
- Hulme, M.A., T.J. Ennis et A. Lavallée, 1983. *Current status of Bacillus thuringiensis for spruce budworm control*. *For. Chron.* 59 : 58-61.
- Ignoffo, C.M., 1963. *Sensitivity spectrum of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner to antibiotics, sulfonamides, and other substances*. *J. Insect Pathol.* 5 : 395-397.
- Ives, W.G.H. et R.H. Wong, 1988. *Tree and shrub insects of the prairie provinces*. *Nor. For. Cent., Can. For. Serv., Inf. Rep.* NOR-X-292.
- Jackson, P.R. et P.E. Hunter, 1983. *Effects of nitrogen fertilizer level on the development and populations of pecan leaf scorch mite (Acari: Tetranychidae)*. *J. Econ. Entomol.* 76 : 432-435.
- Kozłowski, T.T., P.J. Kramer et S.G. Pallardy, 1991. *The physiological ecology of woody plants*. Academic Press, San Diego, CA.

- Keen, F.P., 1958. *Cone and seed insects of western forest trees*. USDA, For. Serv., Tech. Bull. 1169.
- Lamontagne, Y., 1978a. *Introduction aux méthodes d'amélioration des arbres forestiers*. MER, Serv. pépinières et reboisement, Québec.
- Lamontagne, Y., 1978b. *Guide général pour l'établissement de vergers à graines*. Min. Terre et Forêts, Dir. de l'aménagement, Serv. de la restauration, Québec.
- Lamontagne, Y., 1988. La sélection d'arbres et l'implantation de vergers à graines au Québec. Carrefour 1988 de la recherche forestière. MER, Dir. de la recherche et du développement, Serv. de l'amélioration des arbres, Sainte-Foy, Québec.
- Lamontagne, Y., 1992. *Verger à graines de la première génération et tests de descendance implantés au Québec pour les espèces résineuses. Bilan des réalisations*. MFO, Direction de la recherche, Sainte-Foy, Québec. Mémoire de recherche forestière n° 106. 39 p.
- Lamontagne, Y. et A. Corriveau, 1982. *Glossaire des termes utilisés en génétique et amélioration des arbres forestiers*. MER, Serv. des pépinières et du reboisement, Québec. Publ. n° ERI-3285-1. 55 p.
- Loader, C. et H. Damman, 1991. *Nitrogen content of food plants and vulnerability of Pieris rapae to natural enemies*. Ecology 72 : 1586-1590.
- Lyons, L.A., 1957. *Insects affecting seed production in red pine. II. Dioryctria disclusa Heinrich, D. abietella (D. et S.), and D. cambicola (Dyrd) (Lepidoptera : Phycitidae)*. Can. Ent. 89 : 70-79.
- Ministère des Forêts du Québec, 1991. *Insectes et maladies des arbres. Québec 1990*. Gouv. du Québec, 91-3020. Suppl. For. Conserv. 57 : 35 p.
- MacKay, M.R., 1943. *The spruce foliage worm and the spruce cone worm (Dioryctria spp., Lepidoptera, Pyralidae)*. Can. Ent. 75 : 91-98.
- Maretzki, A., L.G. Nickell et N. Thom, 1969. *Arginine in growing cells of sugarcane. Nutritional effects, uptake and incorporation into proteins*. Physiol. Plant. 22 : 827-839.
- Martineau, R., 1985. *Les insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada*. Éd. Marcel Broquet inc. Min. des App. et Serv. Can. n° 2-89000-141-5. 283 p.
- Mattson, W.J. et J.M. Sciber, 1986. *Nutritional ecology of insect folivores of woody plants : nitrogen, water, fiber, and mineral considerations*. Dans : F. Slansky et J.G. Rodriguez [éd.]. Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates. John Wiley, New York, NY. 1016 p. : 105-146.
- Mattson, W.J. et R.A. Haack, 1987a. *The role of drought in outbreaks of plant-eating insects*. Bioscience 37 : 110-118.
- Mattson, W.J. et R.A. Haack, 1987b. *The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects*. Dans : P. Barbosa et J.C. Schultz [éd.]. Insect outbreaks. Academic Press, San Diego, CA. 578 p. : 365-407.
- McGaughey, W.H. et D.E. Johnson, 1994. *Influence of crystal protein composition of Bacillus thuringiensis strains of cross-resistance in indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae)*. J. Econ. Entomol. 87 : 535-540.
- McGuire, M.R., B.S. Shasha, L.C. Lewis et T.C. Nelsen, 1994. *Residual activity of granular starch-encapsulated Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 87 : 631-637.
- McMorran, A., 1965. *A synthetic diet for the spruce budworm Choristoneura fumiferana (Clem.) (Lepidoptera : Tortricidae)*. Can. Entomol. 97 : 58-62.
- Moar, W.J., M. Pusztai-Carey et T.P. Mack, 1995. *Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from Bacillus thuringiensis against lesser corn-stalk borer (Lepidoptera: Pyralidae)*. J. Econ. Entomol. 88 : 606-609.
- Mosseler, A., B.A. Roberts et P. Tricco, 1992. *The effect of the fir coneworm, Dioryctria abietivorella (Grote) (Lepidoptera: Pyralidae), on seed production in small, isolated populations of red pine, Pinus resinosa Ait.* For. Ecol. Manag. 53 : 15-27.
- Munroe, E., 1959. *Canadian species of Dioryctria Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)*. Can. Ent. 91 : 65-72.
- Owens, J.N., J.E. Webber, S.D. Ross et R.P. Pharis, 1985. *Interaction between gibberelin A4/7 and root-pruning on the reproductive and vegetative process in Douglas fir. III. Effects on the anatomy of shoot elongation and terminal bud development*. Can. J. For. Res. 15 : 354-364.

- Percy, J. et P.G. Fast, 1983. *Bacillus thuringiensis crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells*. J. Inv. Pathol. 41 : 86-98.
- Pharis, R.P. et C.G. Kuo, 1977. *Physiology of gibberelin in conifers*. Can. J. For. Res. 7 : 299-325.
- Pharis, R.P., D. Tomchuk, F.D. Beall, R.M. Rauter et G. Kiss, 1986. *Promotion of flowering in white spruce (Picea glauca) by gibberelin A₄₇, auxin (naphthaleneacetic acid), and the adjunct cultural treatments of gridling and Ca(NO₃)₂ fertilisation*. Can. J. For. Res. 16: 340-345.
- Prasad, S.S.S.V. et Y.I. Shethna, 1976. *Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis*. Soc. Bio. Chem. (India). Biochem. Rev. 47 : 70-77.
- Rainville, A. et coll., 1990. *Guide d'établissement et d'aménagement des vergers à graines au Québec*. Gouv. du Québec, MER, Dir. de la rech. et du dév., Sainte-Foy, Québec. Guide [interne] de recherche for. n^o 6. P.v.
- Rappaport, N.G. et W.J. Volney, 1989. *Effect of pest species exclusions on Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii [Mirb.] Franco) cone and seed insects : implications for pest management*. Dans : G.E. Miller [éd.]. Proceedings, Third Cone and Seed Insects Working Party Conference S2.07-01, International Union of Forestry Research Organizations (IUFRO). For. Can., Pac. For. Cent., Victoria, B.C. : 142-150.
- Raymond, K.C., T.R. John et L.A. Bulla, Jr., 1989. *Determinant of insect host range in Bacillus thuringiensis insecticidal protoxins*. Dep. Mol. Bio., Univ. Wyoming, Laramie, WY.
- Rhoades, D.F., 1983. *Herbivore population dynamics and plant chemistry*. Dans : R.F. Denno et M.S. McClure [éd.]. Variable plants and herbivores in natural and managed systems. Academic Press, New York, NY. 717 p. : 155-220.
- Rivet, M.-P. et P.J. Albert, 1990. *Oviposition behavior in spruce budworm Choristoneura fumifera (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae)*. J. Insect Behav. 3 : 395-400.
- Robertson, J.L., 1985. *Choristoneura occidentalis and Choristoneura fumiferana*. Dans : P. Singh et R.F. Moore [éd.]. Handbook of insect rearing, Vol. II. USDA, Cotton Product. Res. Unit, Florence, SC, USA : 227-236.
- Rose, A.H. et O.H. Lindquist, 1994. *Insects of eastern spruces, fir and hemlock*. Nat. Res. Can., Can. For. Serv., Ottawa, Ont. 159 p.
- Ross, S.D., 1976. *Differential flowering responses by young Douglas fir grafts and equi-size seedlings to gibberelins and auxins*. Acta Hortic. 56 : 163-168.
- Ross, S.D., 1985. *Promotion of flowering in potted Picea engelmannii (Perry) grafts: effects of heat, drought, gibberelin A₄₇, and their timing*. Can. J. For. Res. 15 : 618-624.
- Ruth, D.S., 1980. *A guide to insect pests in douglas-fir seed orchards*. Can. For. Serv., Pac. For. Res. Cent., Victoria, BC. BC-X-204. 63 p.
- Ruth, D.S., G.E. Miller et J.R. Sutherland, 1982. *A guide to insect pests and diseases in spruce seed orchards in British Columbia*. Environ. Can., Can. For. Serv., Pacific For. Res. Cent., Victoria, BC. BC-X-231. 27 p.
- SAS Institute, 1985. *SAS user's guide: statistics, version 5*. SAS Institute, Cary, NC.
- Shaw, G.G., C.H.A. Little et D.J. Duranz, 1978. *Effect of fertilization of balsam fir trees on spruce budworm nutrition and development*. Can. J. For. Res. 8 : 364-374.
- Stein, J.D., R.E. Sandquist, T.W. Koerber et C.L. Frank, 1993. *Response of Douglas fir cone and seed insects to implants of systemic insecticides in a northern California forest and a southern Oregon seed orchard*. J. Econ. Entomol. 86 : 465-469.
- Stevens, R.E., L.D. Merrill et J.W. Brewer, 1988. *Dioryctria albovitella (Hulst) (Lep., Pyralidae) in shoots and cones of pinyon (Pinus edulis Engelm.) in Colorado*. J. Appl. Ent. 105 : 387-392.
- Surany, P., 1970. *Hyperactive toxigenesis by sporeless variants of Bacillus thuringiensis*. Int. Pest. Control 12 : 25-27.
- Sweeney, J.D., 1994. *Sampling insects and predicting impact in seed orchards*. Dans : J.J. Turgeon et P. De Groot [éd.]. Biology, damage and management of seed orchard pests. F.P.M.I. Can. For. Serv., Sault-Sainte-Marie, Ontario : 59-70.

- Tabashnik, B.E. et W.H. McGaughey, 1994. *Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: response of indianmeal moth (Lepidoptera : Pyralidae) to Bacillus thuringiensis.*
- Trudel, R., É. Bause, J. Cabana et C. Guertin, 1995. *Rearing technique for Dioryctria abietivorella (Lepidoptera: Pyralidae).* J. Econ. Entomol. 88 : 640-643.
- Turgeon, J.J., 1994. *Insects exploiting seed cones of Larix spp., Picea spp. and Pinus spp. : species richness and patterns of exploitation.* Dans : J.J. Turgeon et P. De Groot [éd.]. *Biology, damage and management of seed orchard pests.* F.P.M.I. Can. For. Serv., Sault-Sainte-Marie, Ontario : 15-30.
- Turgeon, J.J. et P. De Groot, 1992. *Management of insect pests of cones in seed orchards in eastern Canada.* F.P.M.I., Can. For. Serv., Sault-Sainte-Marie, Ontario, 98 p. : 14, 19, 22, 57.
- van Frankenhuyzen, K., 1994. *Effect of temperature on the pathogenesis of Bacillus thuringiensis Berliner in larvae of the spruce budworm, Choristoneura fumiferana Clem. (Lepidoptera : Tortricidae).* Can. Ent. 126 : 1061-1065.
- van Frankenhuyzen, K. et F. Ortiz., 1991. *Trente ans de recherche sur le Bt donnent des résultats.* Serv. Can. For., Institut pour la répression des ravageurs forestiers, Sault-Sainte-Marie, Ont., Canada.
- Wakisaka, Y., E. Masaki, K. Koizumi, Y. Nishimoto, Y. Endo, M.S. Mishimura et J. Nishiitsutsuji-Uwo, 1982. *Asporogenous Bacillus thuringiensis mutant producing high yields of δ -endotoxin.* Appl. Environ. Microbiol. 43 : 1498-1500.
- Webber, J.E., S.D. Ross, R.P. Pharis et J.N. Owens, 1985. *Interaction between gibberelin A₄₇ and root-pruning on the reproductive and vegetative process in Douglas fir. II. Effects on growth.* Can. J. For. Res. 15 : 348-353.
- White, T.C.R., 1984. *The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stress food plants.* Oecologia 63 : 90-105.



Pour rencontrer ses objectifs de reboisement, le ministère des Ressources naturelles doit s'assurer de bien protéger les vergers à graines contre les insectes nuisibles. La pyrale des cônes du sapin est l'un des principaux ravageurs qui peuvent menacer la rentabilité des vergers à graines. Pour cette raison, le Ministère a entrepris des travaux de recherche afin de mieux connaître d'une part la biologie de cet insecte et d'autre part, sa vulnérabilité au *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*). Les résultats de cette recherche ont permis de mettre au point une méthode d'élevage de l'insecte en laboratoire et d'identifier le *Btk* comme outil potentiel de lutte biologique contre ce ravageur.

