

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 494 717

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 80 24769**

(54) Perfectionnements apportés aux procédés de préparation de spores durables d'entomophthorales pathogènes d'insectes, préparations de spores ainsi obtenues et compositions phytosanitaires contenant lesdites préparations.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 3/00; A 01 N 63/04.

(22) Date de dépôt..... 21 novembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 21 du 28-5-1982.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR, fondation reconnue d'utilité publique, résidant en France.

(72) Invention de : Jean-Paul Latgé et David Frank Perry.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Orès,
6, av. de Messine, 75003 Paris.

1

La présente invention est relative à des perfectionnements aux procédés de préparation de spores durables de champignons *Entomophthorales* pathogènes d'insectes, aux préparations de spores ainsi obtenues et aux applications phytosanitaires de ces préparations. De façon plus spécifique, la présente invention est relative à un nouveau procédé de formation, de maturation et de germination de spores durables de champignons *Entomophthorales* pathogènes d'insectes, et aux spores obtenues par ce procédé, ainsi qu'à l'utilisation de ces dernières notamment dans des compositions phytosanitaires.

Les *Entomophthorales* sont des champignons entomopathogènes très répandus dans le monde entier, qui infectent divers insectes nuisibles, notamment en agriculture, et exercent une action pathogène particulièrement efficace à l'égard des aphides.

Comme on le sait, les *Entomophthorales* produisent deux types de spores : les conidies, dont la durée de vie est brève et qui sont à l'origine de l'infection et de la propagation de la maladie, et les spores durables ("resting spores") - zygospores ou azygospores suivant l'espèce - qui assurent la conservation du champignon d'année en année, sont résistantes aux conditions climatiques adverses et fournissent l'inoculum pour l'infection primaire des insectes au début de leur cycle de pullulation. Les spores durables, en raison de leur résistance, représentent actuellement les propagules les mieux adaptées pour l'emploi des *Entomophthorales* dans la lutte contre les insectes nuisibles, et notamment contre les aphides (cf. Bull. Soc. Pathol. Exot., vol. 71, p. 196-203, 1978, J.P. Latgé, G. Remaudière & B. Papierok). L'infection des insectes est en outre possible à partir du mycélium (corps hyphaux) et des conidies produits *in vitro*, en particulier dans le cas des espèces qui ne donnent pas de spores durables en culture comme par exemple *Erynia neoaphidis* Remaudière & Keller.

Les procédés de préparation de spores durables

d'Entomophthorales connus consistent à fermenter, pendant 5 à 15 jours, sous agitation et insufflation d'air, à une température comprise entre 10 et 30°C (variable suivant l'espèce), un inoculum constitué par des corps hyphaux

5 d'Entomophthorales âgés de 1 à 8 jours dans un milieu de culture liquide approprié, (cf. Biotechnol. Bioengin. vol. 19, p. 1269-1284, 1977, J.P. Latgé, R.S. Soper & C.D. Madore et Canad. J. Microb., vol. 26, p. 1038-1048, 1980, J.P. Latgé). La première phase de fermentation est une phase de croissance. L'affamement du mycélium déclenche la sporulation dans le milieu de culture. Les spores immatures sont appelées "préspores" (voir figure unique). La maturation de ces préspores a lieu au cours d'une deuxième phase de fermentation liquide. Les spores mûres sont généralement caractérisées par un globule lipidique central dont le diamètre est compris entre $\frac{1}{3}$ et $\frac{2}{3}$ du diamètre sporal et une paroi dont l'épaisseur est au moins égale au $\frac{1}{10}$ du diamètre sporal. Les spores sont séparées de la phase liquide, par exemple par centrifugation, puis rincées à l'eau, avant

10 15 20 stockage à l'état humide ou séchage à l'air, suivant les espèces.

La production des spores durables peut être effectuée sur milieu solide, notamment chez Zoophthora radicans (Brefeld) Batko. Un procédé de production sur vermiculite a été développé

25 chez Conidiobolus thromboïdes Drechsler (=Entomophthora virulenta Hall & Dunn). Il a pu être établi que la croissance et le développement des cultures ainsi réalisées étaient considérablement augmentés, et que, après conservation pendant 6 mois à -20°C, ces cultures étaient encore

30 vivantes (cf. Lantbrukshögskolans Annaler, Vol. 35, p. 235-274, 1969, M. Gustafsson). Ces cultures ont cependant été réalisées avec des espèces dont la conservation in vitro est très facile.

Plus récemment, (cf. Brevet français Sandoz

2 317 882), il a été proposé d'enrober des préparations de virus obtenues par broyage dans l'eau de larves infectées ou par extraction par l'acétone, d'une matrice solide comprenant une matière protéique inerte solide et/ou de l'argile, pour réaliser des compositions insecticides microbiologiques sous forme de fines particules mouillables, dures, de dimensions inférieures à 150 µm. Il a, par ailleurs, été proposé (cf. Brevet français INRA-ANVAR n° 2 394 606 et Ann. Zool. Ecol. anim., 1979, 11, p. 247-257, Fargues, J., Robert, P. & Reisinger, O), de protéger et de conserver des micro-organismes utilisables en tant qu'insecticides de lutte contre les insectes nuisibles en agriculture et en arboriculture en les enrobant d'argile, en assurant en même temps le maintien de leur efficacité lors d'un stockage prolongé.

15 Le procédé décrit consiste à mélanger une préparation aqueuse de microorganismes tels que virus, champignons ou bactéries obtenus sur milieu nutritif et préalablement lavés pour éliminer toute trace d'un tel milieu, avec une suspension aqueuse d'argile, à soumettre ce mélange à agitation,

20 puis à éliminer l'eau en excès, notamment par séchage par atomisation ou par lyophilisation, ce qui permet d'obtenir des propagules, notamment des spores fongiques entomopathogènes, enrobées d'argile, stabilisées par la combinaison du traitement de déshydratation, de l'enrobage par

25 l'argile et de la conservation à basse température (+ 5°C) et qui conservent leur pouvoir infectieux au bout d'un mois de conservation, ce pouvoir subissant une diminution au bout de 3 à 5 mois de conservation.

L'on sait, par ailleurs, que les espèces d'Entomophthorales se distinguent par leurs comportements différents en ce qui concerne la croissance mycélienne, la formation et la germination des spores durables. Certaines espèces telles Neozygites fresenii (Nowak) Remaudière & Keller, n'ont jamais été cultivées in vitro. Des espèces, notamment C. obscurus (Hall & Dunn) Remaudière & Keller ou C. thromboïdes Drechsler forment dès

spores durables *in vitro*, en culture liquide, alors que d'autres, notamment *z. radicans* produisent des spores sur substrat solide après ou sans développement mycélien en culture liquide agitée. Les spores 5 durables de certaines espèces, notamment *C. thomboïdes* germent immédiatement lorsqu'elles sont placées dans l'eau à température ambiante, alors que d'autres espèces, notamment *C. obscurus* et *z. radicans* produisent des spores dormantes qui requièrent un séjour de longue durée 10 à basse température pour lever leur dormance et ensuite germer lorsqu'elles sont remises dans l'eau à température ambiante. La dénomination des espèces d'Entomophthorales est conforme aux travaux de Remaudière & Hennebert (1980, Mycotaxon, 11, 269-321) et Remaudière & Keller (1980, 15 Mycotaxon, 11, 323-338).

La présente invention s'est donné pour but de pourvoir à un procédé de préparation de spores durables de champignons Entomophthorales pathogènes d'insectes nuisibles, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que 20 les procédés visant au même but proposés dans l'Art antérieur, notamment en ce qu'il réduit la durée de fermentation du champignon, en ce qu'il diminue considérablement les échecs de fermentation par contamination tardive dans les cuves de culture, en ce qu'il donne lieu à des spores 25 mûres obtenues par maturation des préspores dans des conditions non stériles, en présence d'un support inerte, en ce que ces spores se conservent pendant des durées prolongées et en ce que leur germination ultérieure est activée, en ce que les spores germées obtenues conservent une activité pathogène, en ce que les spores ainsi traitées permettent 30 des applications phytosanitaires plus souples que les préparations entomopathogènes proposées conformément à l'Art antérieur.

La présente invention a pour objet un procédé de 35 préparation de spores durables de champignons Entomophthorales pathogènes d'insectes, nuisibles notamment en agricul-

ture, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- une première étape de fermentation d'un inoculum composé de corps hyphaux d'Entomophthorales dans un milieu de fermentation approprié contenant une source de carbone et une
- 5 source d'azote, sous agitation et insufflation d'air, à un pH variable selon les espèces et de préférence compris entre 6 et 7, ladite étape de fermentation donnant lieu, après une durée de 2 à 5 jours suivant les espèces, à la formation de préspores sphériques présentant une paroi composée
- 10 de deux couches, la couche interne isolant la spore du milieu ambiant ; - une deuxième étape, réalisée dans des conditions non stériles, au cours de laquelle les préspores sont séparées du milieu de fermentation et lavées abondamment et soigneusement ; - une troisième étape au cours de
- 15 laquelle les préspores sont mélangées avec un support inerte humide tel que de l'argile ; - une quatrième étape d'évolution des préspores mélangées audit support inerte humide, à une température comprise entre 15 et 25°C, pendant un temps suffisant pour obtenir les
- 20 spores durables présentant une épaisseur de paroi au moins égale au $1/10$ du diamètre sporal et comprenant un seul globule lipidique de diamètre minimum égal au $1/3$ du diamètre sporal ; - une cinquième étape au cours de laquelle lesdites spores durables, en mélange avec le support inerte, sont gardées au froid à une température moyenne comprise entre 2 et 7°C, et -une sixième étape où les spores enrobées du support inerte sont éventuellement mélangées à des composés usuels pour l'obtention d'une composition phytosanitaire entomopathogène à l'égard des insectes nuisibles, notamment en agriculture, laquelle composition présente un pouvoir infectieux élevé.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, particulièrement adapté à la maturation des spores d'Entomophthorales présentant un

35 temps de dormance, l'étape de maturation des préspores mélangées à un support inerte humide, en spores durables

fournit des spores dormantes qui sont soumises à une étape supplémentaire de traitement qui a pour but de lever leur dormance et qui consiste à maintenir le mélange de spores durables et d'argile humide à une température moyenne de 5 l'ordre de 2 à 7°C pendant une durée d'au moins deux mois pour obtenir des spores mûres dont la dormance est levée.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, les préspores sont séparées du milieu de culture à leur sortie du fermenteur, dans la 10 deuxième étape, par centrifugation ou par filtration, et lavées soigneusement.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, la séparation des préspores du milieu de culture est réalisée par filtration éventuellement en présence d'un 15 adjuvant de filtration approprié.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, le support inerte utilisé dans la troisième étape est une argile choisie dans le groupe qui comprend notamment la rhyolite, la 20 terre de diatomées, l'attapulgite, l'argile complexe "Le Buisson" à base essentiellement de bentonite et d'attapulgite.

Selon une disposition préférée de l'invention, les Entomophthorales mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention pour la production et/ou la maturation et/ou la germination de spores-azygospores ou zygospores -, sont choisies notamment dans le groupe qui comprend 25 C. osmodes, C. obscurus, C. thrcmboïdes, N. fresenii et Z. radicans.

Le procédé conforme à la présente invention comprend la totalité des étapes ci-dessus ou seulement certaines de ces dernières. En particulier, les spores durables, formées *in vivo*, d'une espèce non cultivable (telle que N. fresenii) ou celles produites en milieu solide pour les 30 espèces ne sporulant pas en milieu liquide, notamment Z. radicans, peuvent subir les étapes 3, 4, 5 et 6. D'un

autre côté, les spores ne présentant pas de dormance comme notamment celles de C. thromboïdes peuvent subir en particulier les étapes 1, 2, 3 et 4.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé 5 objet de la présente invention, la maturation des préspores en spores en mélange avec un support inerte, est réalisée en présence d'eau, la proportion des constituants du mélange préspores:eau:support inerte étant fonction de l'argile et de l'espèce (ou souche) considérée et comprise dans les 10 limites suivantes :

Préspores (poids humide)	Eau	Argile (poids sec)
2-6	1-7	2-15

Selon un mode de réalisation préféré de l'étape supplémentaire de levée de la dormance des spores dormantes 15 obtenues à l'issue de la quatrième étape, cette étape supplémentaire comprend le maintien pendant au moins deux mois à une température moyenne de 2 à 7°C d'un mélange de spores, d'un support inerte et d'eau présents dans des proportions variables suivant le support et l'espèce (ou souche) considérés. 20

La présente invention a en outre pour objet en tant que produit intermédiaire nouveau utilisé pour la production de spores d'Entomophthorales présentant un pouvoir entomopathogène élevé, un mélange de préspores sphériques 25 présentant une paroi bituniquée obtenues par fermentation dans un milieu de culture approprié, et d'une argile choisie dans le groupe qui comprend notamment la rhyolite, la terre de diatomées, l'argile "Le Buisson" (mélange complexe naturel à base de bentonite et d'attapulgite) et l'attapulgite. 30

La présente invention a également pour objet en tant que produit nouveau, un mélange d'argile et de spores dont la dormance a été levée par maintien du mélange pendant au moins deux mois à une température moyenne comprise 35 entre 2 et 7°C.

La présente invention a également pour objet une

composition phytosanitaire entomopathogène, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un mélange de spores présentant un pouvoir infectieux élevé à l'égard des insectes nuisibles, notamment en agriculture, et d'argile, obtenu 5 par le procédé de l'invention, associé aux composés usuels pour la préparation d'une telle composition tels qu'agents collants, mouillants, dispersants, propres à faciliter la pulvérisation ou l'aspersion ultérieure desdites compositions en plein champ, et à favoriser le collage des spores 10 sur le substrat végétal.

Selon un mode de réalisation avantageux de la composition phytosanitaire conforme à la présente invention, son constituant actif est constitué par des spores enrobées d'argile, à pouvoir entomopathogène élevé obtenues par maturation 15 de préspores sphériques issues d'une fermentation.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la composition phytosanitaire conforme à la présente invention, son constituant actif est constitué par des spores enrobées d'argile, à pouvoir entomopathogène élevé obtenues par maturation de 20 préspores sphériques issues d'une fermentation et maintien des spores résultantes pendant au moins deux mois à 2 à 7°C, pour lever la dormance desdites spores.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de traitement de cultures à l'aide de la composition 25 phytosanitaire entomopathogène conforme à l'invention, lequel procédé consiste à appliquer sur la plante et/ou au sol, par pulvérisation ou aspersion, la composition phytosanitaire conforme à l'invention, pour contrôler des populations d'insectes nuisibles importantes déjà établies sur 30 la plante, dans le cas où le constituant actif, c'est-à-dire la spore, est à germination rapide (environ 48 heures), ou avant l'apparition des insectes ou dès la détection des premiers insectes, pour contrôler la population d'insectes avant qu'elle n'ait atteint un seuil dommageable pour la 35 culture, dans le cas où le constituant actif, c'est-à-dire la spore, est à germination lente (8 à 15 jours ou plus).

Les spores mûres peuvent être incubées dans l'eau pendant plusieurs jours avant formulation définitive et application. Par ce traitement, les spores ayant une germination lente peuvent être utilisées dans les mêmes conditions que celles à germination rapide.

5 Parmi les Entomophthorales qui sont susceptibles d'être utilisées dans le cadre de l'invention, on peut citer, à titre d'exemples non limitatifs, *C. obscurus*, *C. osmodes*, *C. thromboïdes*, étant cependant bien entendu que tout autre représentant du groupe des Entomophthorales que ceux 10 qui viennent d'être mentionnés peut être utilisé dans le cadre de la présente invention.

Pour la mise en oeuvre du procédé conforme à la présente invention, on procède avantageusement comme suit, les modalités du procédé précisées ci-après étant applicables en particulier dans le cas de *C. obscurus* :

La figure unique annexée schématise les différentes étapes du développement de *C. obscurus* réalisé en mettant en oeuvre le procédé conforme à la présente invention, depuis l'inoculation du mycélium dans le milieu de culture du 20 fermenteur jusqu'à l'obtention des spores germées qui exercent directement ou par l'intermédiaire des conidies qu'elles projettent dans l'air, leur action entomopathogène sur les insectes nuisibles notamment à l'égard des plantes.

I - Conditions de culture

25 1. Inoculum
L'inoculum choisi est, de préférence, un mycélium âgé de 24 à 72 heures, et plus particulièrement âgé de 24 heures, développé en fermenteur sur un milieu de culture approprié, notamment sur un milieu agité contenant 30 1 à 2 % d'extrait de levure (Difco) et 3 à 6 % de glucose, et cet inoculum représente 1 à 20 % (v/v) du milieu de culture ensemencé.

2. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour réaliser la

sporulation, est un milieu solide ou liquide aqueux qui contient essentiellement une source de carbone et une source d'azote, la source de carbone étant constituée par exemple par du glucose ou d'autres sucres, commercialisés notamment sous les Marques "AMBREX", "GLOBE", "FLEURINE", "CEREOLOSE" (commercialisés par la SOCIETE DES PRODUITS DU MAIS), ou encore par une huile végétale telle que l'huile de tournesol ou l'huile de maïs non raffinée, commercialisée notamment par la SOCIETE DES PRODUITS DU MAIS et la source d'azote par exemple par de l'extrait de levure ou de l'extrait soluble de maïs (Produit commercialisé par la SOCIETE DES PRODUITS DU MAIS). Le rapport C/N doit être au moins égal à 5.

La teneur en carbone du milieu est, de préférence, de l'ordre de 1,2 à 2,4 %, et sa teneur en azote de l'ordre de 0,1 à 0,2 %. Il est avantageux de lui ajouter un agent antimousse approprié.

Ce milieu est inoculé par le mycélium mentionné en 1. ci-dessus.

3. Conditions de fermentation

La fermentation est réalisée dans un fermenteur contenant un milieu de culture tel que l'un de ceux décrits en 2. ci-dessus.

La température de la fermentation est continuellement régulée à + 20°C ± 1°C. L'agitation est comprise entre 400 et 1200 tpm et l'aération comprise entre 0,1 et 1,0 volume d'air/volume de milieu/minute (vvm). Le pH optimal est compris entre 6 et 7. Il est ajusté à 6,5 avant autoclavage et peut être régulé à 6,5 pendant toute la fermentation.

Dans un milieu de culture contenant 3 à 4 % de glucose ou analogue et 1 % d'extrait de levure, la phase de latence, ou phase stationnaire, dure 6 à 8 heures ; à la suite de cette phase de latence, il s'instaure dans le milieu une phase de croissance linéaire qui atteint son maximum 40 à 50 heures après l'inoculation du milieu de culture. Le mycélium se développe toujours sous forme d'éléments unicellulaires plurinucléés, les corps hyphaux (1), séparés ou en amas, plus

ou moins importants suivant le temps de fermentation et l'espèce considérée.

La sporulation débute dès la fin de la phase de croissance qui correspond à la métabolisation quasi-5 complète de la source de carbone et/ou d'azote, et le nombre de préspores augmente pendant une vingtaine d'heures.

Le début de la sporulation est caractérisé par la condensation du protoplasme en un endroit précis (centre de sporulation) du corps hyphal (2). Ce centre de sporulation 10 (2a) peut avoir une position terminale, latérale ou médiane (comme représenté au dessin) sur l'élément mycélien. Une vacuole se forme aux extrémités distales et propulse le protoplasme granuleux vers le centre de sporulation en même temps que des cloisons successives isolent la préspore. 15 Il se forme ainsi une préspore sphérique (3-4) à protoplasme granuleux. La paroi unituniquée de la préspore très jeune est de composition similaire à celle du mycélium et est essentiellement constituée de glucanes. Le nombre de préspores est maximal entre la 60ème et la 84ème heure et après ce temps, le nombre des 20 préspores n'augmente plus. Celles-ci évoluent ensuite pendant 3 à 5 jours : des globules lipidiques qui s'individualisent au centre de la préspore 5. Le nombre de globules lipidiques va progressivement diminuer en même temps que leur taille augmente et que la paroi 25 de la préspore s'épaissit. Les jeunes préspores contiennent plus de 50 globules lipidiques individualisés, de 3,5 à 5 μm de diamètre et présentent une épaisseur de paroi inférieure à 1 μm . L'augmentation de l'épaisseur de la paroi résulte de la synthèse d'une couche interne (CI) qui 30 comprend essentiellement de la chitine et des protéines et qui est différente de la couche externe (CE) qui est surtout constituée de glucanes. La préspore devient alors insensible à toute variation du milieu extérieur, alors que les corps hyphaux (mycélium) ou les préspores en formation 35 sont, eux, très dépendants du milieu ambiant.

La mise en évidence du fait que le nombre des

préspores n'augmente plus après la 60ème à la 84ème heure et que la seconde couche pariétale interne caractéristique de la présore isole celle-ci du milieu ambiant, a permis aux Inventeurs d'en tirer parti en libérant le fermenteur 5 au bout de 3,5 jours \pm 12 heures pour réaliser la maturation des présopores à l'extérieur du fermenteur, ce qui permet une réduction de moitié du temps d'utilisation du fermenteur.

Le nombre de présopores produites est de 10 5×10^5 à 2×10^6 présopores par ml pour les milieux indiqués en 2. ci-dessus.

II - Formation des spores durables à partir des présopores

1. Récupération des présopores

15 La fermentation étant alors arrêtée 3,5 jours \pm 12 heures après l'inoculation, lorsque les présopores ont une paroi bituniquée, les présopores sont récupérées par centrifugation ou filtration et abondamment lavées à l'eau ordinaire. La filtration peut être éventuellement réalisée 20 en présence d'un adjuvant de filtration tel qu'une perlite de filtration par exemple, ou tout autre adjuvant de filtration approprié, pour séparer les présopores.

2. Conditionnement des présopores par de l'argile

Les présopores sont alors mélangées de façon 25 homogène dans un malaxeur approprié, à palette par exemple, dans des conditions non stériles, avec une argile, en présence d'eau, notamment une argile prise dans le groupe qui comprend, en particulier, la rhyolite, la terre de diatomées, l'attapulgite, l'argile "Le Buisson".

30 Les proportions respectives de présopores, d'argile et d'eau dans le mélange ne sont pas critiques, bien que certaines proportions soient optimales en ce qu'elles donnent des spores de meilleure qualité. De plus, les proportions optimales du mélange présopores:argile:eau, 35 varient selon le type d'argile. Lesdites proportions sont entendues en poids humide pour les présopores et en poids

--

sec pour l'argile et sont données dans ce qui va suivre, dans l'ordre qui vient d'être indiqué. Les $\langle \rangle$ expriment des concentrations en grammes.

C'est ainsi qu'il a été constaté que la meilleure 5 maturation est obtenue avec l'attapulgite (Clarsol BBC, Ceca) dans le mélange suivant : préspores:eau:argile: 1:2:5. L'attapulgite est un support qui permet les écarts de concentration les plus importants. Ainsi, une bonne maturation est obtenue dans les limites de concentration 10 suivantes :

Préspores	Eau	Argile
2 à 6	1 à 7	5 à 15

à condition de respecter la condition suivante :

$$\langle \text{préspores} \rangle < \langle \text{argile} \rangle < \langle \text{eau} + \text{préspores} \rangle \times 2$$

15 Il a été constaté, par exemple, qu'avec la rhyolite (Cecaperl AM, Ceca), on obtient des spores de qualité satisfaisante à partir d'un mélange

Préspores	Eau	Argile
2	1 à 2	2

20 dans lequel :

$$\langle \text{eau} \rangle < \langle \text{argile} \rangle$$

$$\langle \text{préspores} \rangle < \langle \text{argile} \rangle$$

Il a été constaté qu'avec l'argile "Le Buisson" (Clarsol STF, Ceca), le mélange optimal est un mélange

Préspores	Eau	Argile
2 à 12	1 à 2	5 à 15

dans lequel : $\langle \text{eau} \rangle < \frac{1}{2} \langle \text{argile} \rangle$.

3. Evolution des préspores proprement dite

Les préspores enrobées d'argile comme il vient 30 d'être décrit, sont alors maintenues pendant 3 à 7 jours à + 20°C ± 1°C jusqu'à l'achèvement de la formation des spores. Lors de cette évolution, le nombre des globules lipidiques diminue, alors que leur taille augmente. Par ailleurs, le dépôt de la couche interne de la spore s'intensifie. Ainsi, lorsque le nombre des globules est compris entre 5 et 10, leur taille est de 5 à 12 µm et la paroi sporale a alors une épaisseur de 1 à 2 µm. La spore (6) fina-

lement obtenue est caractérisée par un globule unique de 20 à 25 μm de diamètre et son épaisseur de paroi est d'abord de l'ordre de 2,5 μm à 3 μm pour atteindre parfois 4 μm . Elle présente toutes les caractéristiques d'un organe de 5 résistance : faibles teneurs en acides nucléiques, protéines, glycogène et sucres acidosolubles et fortes teneurs en lipides et polyosides (chitine incluse).

III - Levée de la dormance des spores

Lorsque les spores durables obtenues sont des 10 spores dormantes, comme c'est le cas notamment des spores de *C. obscurus*, il est alors nécessaire de les traiter pour lever leur dormance et les rendre aptes à germer. Il s'est avéré qu'aucun des chocs physicochimiques utilisés habituellement pour stimuler la germination des spores fongiques, 15 n'est capable de lever la dormance des spores durables de *C. obscurus*.

Conformément à la présente invention, les spores dormantes résultant de la maturation des préspores telle que décrite en II.3. ci-dessus, ou effectuée en culture 20 liquide agitée, doivent être stockées dès la fin de la maturation dans une enceinte humide à 2 à 7°C pendant deux mois minimum. Ainsi, ces spores sont capables de germer au bout de trois mois de stockage à une HR supérieure à 90 % et à 4°C \pm 1°C ou à 6°C \pm 1°C, le taux de germination étant 25 maximum après 5 mois de stockage à 4°C \pm 1°C à 100 % d'HR et étant supérieur à 80 %. Le taux de germination ne varie pas de façon significative jusqu'à 10 mois de stockage pour des spores stockées à 100 % d'HR. Des spores stockées à 6°C \pm 1°C sont capables de germer après 3 mois de stockage 30 à des humidités relatives supérieures à 95 %. A 95 % d'HR, le taux de germination atteint 20 % après 5 mois de stockage, puis devient nul au-delà de cette durée. A 100 % et 96 % d'HR, la germination dépasse 40 % même après 10 mois de stockage à 6°C et 4°C (cf. Tableau I).

35 Cette levée de la dormance est réalisable sur le plan industriel, conformément à l'invention, grâce à

l'enrobage des spores par un support inerte tel que l'argile. De plus, l'enrobage des spores par de l'argile est important pour la conservation ultérieure des spores. La conservation et la levée de la dormance sont fonction de l'argile considérée. Ainsi, un taux de germination maximum de 80 % a été obtenu avec des spores enrobées d'attapulgite, d'argile "Le Buisson" et de rhyolite, stockées à $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ à 100 % d'humidité relative, l'attapulgite permettant la meilleure conservation des spores : les spores sont capables de germer après 3 mois de stockage, le maximum de germination de 80 % est atteint à 5 mois de stockage et ce taux se maintient sensiblement au même niveau jusqu'à une durée de 10 mois de stockage. Avec les deux autres substrats, les temps de survie des spores sont plus courts : 6 mois avec la rhyolite et 7 mois avec l'argile "Le Buisson" (Tableaux II, III).

Aucun changement morphologique n'est décelable en microscopie optique entre des spores dormantes et des spores dont la dormance est levée.

Les proportions du mélange spores:eau:argile soumis au traitement de levée de la dormance décrit ci-dessus, peuvent être légèrement différentes de celles indiquées pour les mélanges préspores:eau:argile utilisés pour la maturation des préspores en spores durables.

IV - Germination des spores durables obtenues conformément à l'invention

A - Les spores durables d'Entomophthorales comme par exemple celles de *C. thromboïdes* qui sont aptes à germer immédiatement après leur formation, peuvent être utilisées immédiatement après le processus de maturation des préspores en spores conforme à l'invention : après 48 heures dans l'eau, le taux de germination peut atteindre ou dépasser 50 %, ce qui permet d'utiliser ces spores à germination rapide pour lutter contre des populations d'aphides importantes déjà établies sur la plante.

B - Les spores d'Entomophthorales qui présentent

une dormance et dont *C. obscurus* constitue un exemple, ne sont pas capables de germer avant d'avoir subi un traitement d'au moins 2 mois à 2-7°C et généralement même d'au moins 3-4 mois, en milieu humide. A l'issue de ce traitement, 5 la germination de ces spores mûres débute après 5 à 15 jours d'incubation dans l'eau entre 6 et 20°C, de préférence entre 12 et 16°C.

La spore mûre (7) prête à germer, placée dans des conditions de germination appropriées (humidité et température) subit des transformations morphologiques au cours 10 desquelles la paroi sporale s'amincit et le volume du globule lipidique diminue (spore 8) ; puis des granulations denses apparaissent dans le cytoplasme, la spore augmente de volume, la réduction du globule lipidique et la lyse de toutes les couches internes de la paroi se poursuivent. Au 15 stade de gonflement maximal de la spore, le globule lipidique a disparu et le protoplasme est entièrement granuleux. Un tube germinatif (9a) apparaît. Il forme au contact de l'air un conidiophore qui projettera une conidie.

V - Préparation de compositions phytosanitaires

20 Il est avantageux d'associer les spores durables préparées conformément à la présente invention, à des agents collants, mouillants et/ou dispersants, afin de rendre la pulvérisation ou l'aspersion ultérieure des compositions phytosanitaires à base de ces spores entomopathogènes, plus 25 facile et plus efficace sur les sols ou sur les plantes à traiter, de tels agents étant présents aux doses usuelles dans les compositions phytosanitaires.

VI - Modalités d'application des compositions phytosanitaires conformes à l'invention

30 Les compositions phytosanitaires conformes à la présente invention peuvent être appliquées suivant différentes modalités, selon que les spores durables qui en sont les constituants actifs sont des spores d'Entomophthorales à germination rapide ou à germination lente :
 35 a) les compositions phytosanitaires à base de spores durables d'Entomophthorales à germination rapide (telle

- c. thromboïdes*) qui germent au bout de 48 heures, peuvent être pulvérisées sur les plantes porteuses de populations d'aphides relativement importantes, déjà établies sur la plante, en raison de l'action entomopathogène rapide qu'elles sont aptes à exercer ;
- 5 b) les compositions phytosanitaires à base de spores durables d'Entomophthorales dont la germination débute seulement 8 à 15 jours après l'application, mais se prolonge pendant au moins un mois dans la nature :
- 10 b₁) peuvent être pulvérisées sur la plante dès l'apparition des premiers insectes nuisibles : les populations d'aphides se développeront en même temps que les processus de germination se débloqueront et permettront de contrôler la population d'aphides avant que celle-ci n'ait atteint un seuil dommageable pour la culture ;
- 15 b₂) peuvent être appliquées sur le sol cultivé avant la sortie de la plante : la présence des spores à la surface du sol ou à une faible profondeur, joue un rôle préventif, les spores étant prêtes à germer et à contaminer les aphides nuisibles dès leur apparition sur la culture.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de 25 la description qui va suivre.

La présente invention vise plus particulièrement les procédés de préparation de spores durables de champignons Entomophthorales pathogènes d'insectes nuisibles, notamment en agriculture, les préparations de spores durables ainsi obtenues, les compositions phytosanitaires contenant lesdites préparations et les procédés de traitement de cultures à l'aide desdites compositions, conformes aux dispositions qui précèdent, ainsi que les moyens pour la mise en oeuvre de ces procédés et la préparation de ces produits, 30 préparations et compositions et pour l'application desdites compositions phytosanitaires au traitement de cultures.

Les caractéristiques de l'invention énoncées plus haut, sont mises en évidence dans les Tableaux qui vont suivre.

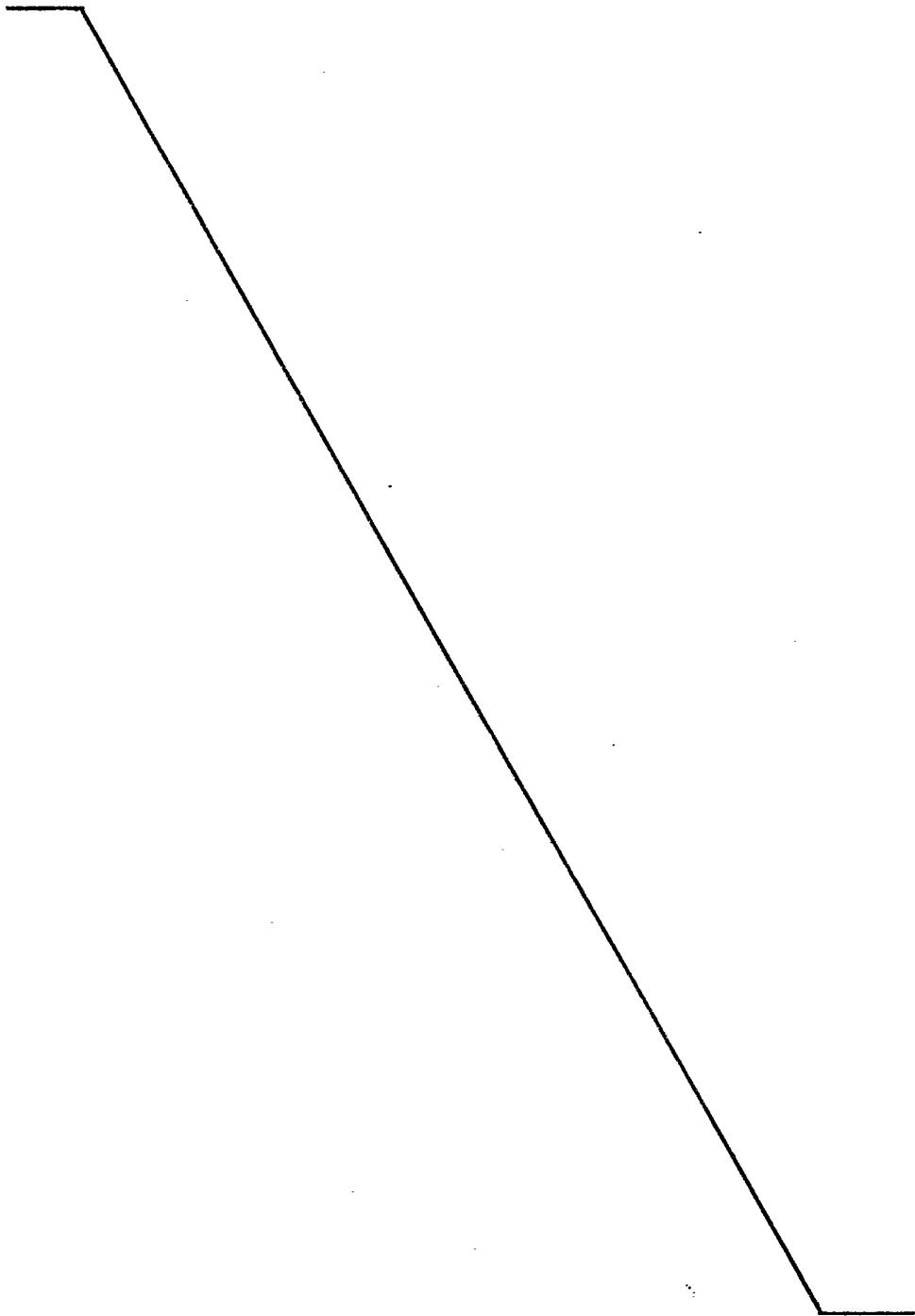


TABLEAU I

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE SUR
LA LEVEE DE LA DORMANCE DES SPORES DURABLES DE
C. OBSCURUS .(1)

Température °C	% H.R.	Nombre de mois									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Témoin (2)				(*)						
	100										
	99										
	96										
	79										
	Témoin			10	60	80	70	80	80	70	80
10	100			5	60	80	60	70	80	70	70
	98			20	60	90	80	60	40	30	40
	95			10	60	80	60	40	20	10	
	79										
	Témoin			10	60	85	90	80	70	60	50
15	100			5	50	75	90	70	60	50	50
	98			10	55	50	40	50	40	40	40
	95				20						
	79										
	Témoin										
20	100										
	98										
	95										
	79										
	Témoin			10	60	85	90	80	70	60	50
25	100			5	50	75	90	70	60	50	50
	98			10	55	50	40	50	40	40	40
	95				20						
	79										
	Témoin										
30	100										
	98										
	93										
	79										
	Témoin										
35	100										
	98										
	92										
	79										
	Témoin										
40	100										
	98										
	91										
	79										
	Témoin										

(1) Exprimée en pourcentage de germination après 16 jours d'incubation dans l'eau à $14 \pm 1^\circ\text{C}$.

(2) Spores maintenues dans un sol à 40 % de sa capacité de rétention d'eau

(*) Les barres représentent la viabilité des spores estimée par observation en microscopie photonique; la germination est nulle dans toutes les cases ne contenant pas de chiffres

TABLEAU II

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU SUBSTRAT D'ENROBAGE SUR LA
LEVEE DE LA DORMANCE ET LA CONSERVATION DES SPORES DURABLES
DE *C. OBSCURUS* STOCKEES A 98 % H.R. (1)

Température °C	Substrat	Nombre de mois									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Rhyolite			(*)							
	Argile Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin (2)										
10	Rhyolite			50	80	40	20	10			
	Argile Le Buisson			30	30	40	30	30	30	20	
	Attapulgite		20	60	80	60	70	70	70	60	
	Terre de diatomées			30	50						
	Témoin		10	60	80	70	80	80	70	80	
15	Rhyolite			40	50	10					
	Argile Le Buisson			30	40	40	40	30	30	20	
	Attapulgite		50	70	70	60	70	60	60	60	
	Terre de diatomées			20	20						
	Témoin		10	60	85	90	70	60	50		
20	Rhyolite										
	Argile Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
25	Rhyolite										
	Argile Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
30	Rhyolite										
	Argile Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
35	Rhyolite										
	Argile Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										

(1) Exprimée en pourcentage de germination après 16 jours d'incubation dans l'eau à $14 \pm 1^\circ\text{C}$.

(2) Spores maintenues dans un sol à 40 % de sa capacité de rétention d'eau.

(*) Les barres représentent la viabilité des spores estimée par observation en microscopie photonique ; la germination est nulle dans toutes les cases ne contenant pas de chiffres.

TABLEAU III
INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU SUBSTRAT D'ENROBAGE LORS DU
TRAITEMENT DE LEVEE DE LA DORMANCE ET LA CONSERVATION DES SPORES
DE *C. OBSCURUS* STOCKEES A 100 % H.R. (1)

Température °C	Substrat	Nombre de mois									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Rhyolite			(*)							
	Argile										
	Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin (2)										
10	Rhyolite				50	80	40	10			
	Argile				30	30	30	80	80	70	70
	Le Buisson			15	60	80	80	80	80	70	70
	Attapulgite										
	Terre de diatomées				30	50	10				
	Témoin				5	60	80	60	70	80	70
15	Rhyolite				40	70	30	10			
	Argile				30	40	50	30	20	20	20
	Le Buisson										
	Attapulgite				50	80	80	70	60	60	60
	Terre de diatomées				30	30					
	Témoin				10	60	85	90	80	70	60
20	Rhyolite										
	Argile										
	Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
25	Rhyolite										
	Argile										
	Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
30	Rhyolite										
	Argile										
	Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										
35	Rhyolite										
	Argile										
	Le Buisson										
	Attapulgite										
	Terre de diatomées										
	Témoin										

(1) Exprimée en pourcentage de germination après 16 jours d'incubation dans l'eau à 14 ± 1°C.

(2) Spores maintenues dans un sol à 40 % de sa capacité de rétention d'eau.

(*) Les barres représentent la viabilité des spores estimée par observation en microscopie photonique ; la germination est nulle dans toutes les cases ne contenant pas de chiffres.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

5 Il doit être bien entendu, toutefois, que cet exemple et les parties descriptives correspondantes, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

10 EXEMPLE

I. - Conditions de culture

1. Inoculum

La souche utilisée dans cet exemple est la souche IP I 015 de C. obscurus déposée dans la Collection Nationale 15 des Cultures Microbiennes (CNCM) de l'Institut Pasteur ; elle porte aussi les n° IPLB 542 et 722 (Laboratoire de lutte biologique contre les Insectes, Institut Pasteur).

L'inoculum est constitué par du mycélium âgé de 24 heures, développé sur un milieu agité à base de 6 % de 20 glucose et 2 % d'extrait de levure (Difco). Il est ajouté au milieu à la dose de 10 % (v/v).

2. Milieu de culture

Le milieu de culture a la composition suivante :

25	Dextrose	3 %
	Extrait de levure (Difco)	1 %
	Antimousse "Rhodorsil 426R"	1 %
	Eau	Q.S.P.

3. Conditions de la fermentation

La fermentation est réalisée dans un fermenteur 30 contenant le milieu de culture ci-dessus, par exemple un fermenteur "Biolafitte", lequel milieu de culture est inoculé par le mycélium identifié en 1. ci-dessus.

La température est continuellement régulée à 20°C ± 0,5°C. L'agitation du milieu est maintenue à 700 t/m, 35 l'aération est de 0,5 volume d'air/volume du milieu/minute (vvm) ; le pH est continuellement réglé pour être maintenu

à 6,5.

Après une phase stationnaire, ou phase de latence, de 6-8 heures, la phase de croissance linéaire dure jusqu'à la 40ème heure \pm 4 heures, puis elle est suivie d'une phase 5 de sporulation multiplicative pendant laquelle il se forme des préspores dont le nombre augmente, jusqu'à la 68ème heure \pm 4 heures.

II. - Formation des spores à l'extérieur du fermenteur

1. On arrête la fermentation après 3 à 4 jours de culture, à la fin de la phase de formation des préspores, lorsque toutes les préspores sont sphériques, à paroi bituniquée, c'est-à-dire après le début de coalescence des globules lipidiques (dont le diamètre est alors supérieur à 3 μm).
15. On évacue la masse liquide du fermenteur, on en sépare les préspores par centrifugation ou filtration, dans ce dernier cas après mélange éventuel avec un adjuvant de filtration tel, par exemple, qu'une perlite. Les préspores sont lavées abondamment à l'eau du robinet.
20. On mélange ensuite les préspores de façon homogène avec une argile appropriée, telle que de l'attapulgite (Clarsol BBC, Ceca) par exemple, et de l'eau, dans des conditions non stériles, dans un malaxeur à palette (de type Lödige par exemple), pendant 2 minutes, sans échauffement, les proportions du mélange préspores (poids humide)/eau/attapulgite étant par exemple, 1:1:1,5.
25. On laisse mûrir les préspores ainsi enrobées d'argile pendant 3 à 7 jours dans des cuves fermées ou des sacs fermés, à $20^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ jusqu'à l'achèvement de la formation des spores, qui présentent alors un seul globule lipidique central volumineux et une paroi de 2,5 μm d'épaisseur minimale.
- 30.
- 35.

III. - Levée de la dormance des azygospores

On incube le mélange de spores enrobées avec de l'argile humidifiée, en sacs fermés, à 4°C ± 1°C dans une chambre froide pendant 4 mois minimum. La proportion

5 spores:eau:argile du mélange est maintenue à 1:1:1,5.

On effectue des prélèvements tous les mois pour évaluer le taux de germination dans de l'eau à 14°C ± 1°C, en effectuant des évaluations tous les 2 jours pendant 16 jours, au bout desquels la germination maximum est

10 habituellement enregistrée. Toutes les évaluations ont été effectuées sur des champs oculaires contenant plus de 100 spores, en comptant 100 spores et en reproduisant chaque contrôle à trois reprises ; la germination est enregistrée lorsque la longueur du tube germinatif 15 est supérieure à la moitié du diamètre de la spore (environ 20 µm).

Les préparations de spores enrobées sont alors des spores mûres prêtes à l'emploi dans des compositions phytosanitaires dont le constituant actif est à germination lente.

20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit 25 du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°- Procédé de préparation de spores durables de champignons Entomophthorales pathogènes d'insectes nuisibles, notamment en agriculture, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - une première étape de fermentation d'un inoculum composé de corps hyphaux d'Entomophthorales, dans un milieu de fermentation approprié contenant une source de carbone et une source d'azote, sous agitation et insufflation d'air, à un pH variable selon les espèces et de préférence compris entre 6 et 7, à une température variable suivant les espèces, ladite étape de fermentation, après une durée de 2 à 5 jours suivant les espèces et le milieu employés, donnant lieu à la formation de préspores sphériques présentant une double paroi ; - une deuxième étape réalisée dans des conditions non stériles, au cours de laquelle les préspores sont séparées du milieu de fermentation et lavées abondamment ; - une troisième étape au cours de laquelle les préspores sont mélangées avec un support inerte humide tel que de l'argile ; - une quatrième étape de maturation des préspores mélangées audit support inerte humide, à une température comprise entre 15 et 25°C suivant les espèces, pendant un temps suffisant pour obtenir l'évolution desdites préspores en spores durables présentant une épaisseur de paroi égale ou supérieure au $1/10$ du diamètre sporal et comprenant généralement un seul globule lipidique de diamètre minimum compris entre $1/3$ et $2/3$ du diamètre sporal ; - une cinquième étape au cours de laquelle lesdites spores durables en mélange avec le support inerte susdit, sont gardées au froid à une température moyenne comprise entre 2 et 7°C, et - une sixième étape où les spores enrobées du support inerte sont éventuellement mélangées à des composés usuels pour l'obtention d'une composition phytosanitaire entomopathogène à l'égard des insectes nuisibles, notamment en agriculture, laquelle composition présente un pouvoir infectieux élevé.

2°- Procédé selon la Revendication 1 particulière-

ment adapté à la maturation des spores d'Entomophthorales présentant un temps de dormance, caractérisé en ce que l'étape de maturation des préspores mélangées à un support inerte humide, en spores durables, fournit des spores dormantes qui sont soumises à une étape supplémentaire de traitement qui a pour but de lever leur dormance et qui consiste à maintenir le mélange de spores durables et d'argile humide à une température moyenne de l'ordre de 2 à 7°C pendant une durée d'au moins deux mois pour obtenir des spores mûres dont la dormance est levée.

5 3°- Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que les préspores sont séparées du milieu de culture à leur sortie du fermenteur, dans la deuxième étape, par centrifugation ou par filtration, et lavées abondamment 10 avec de l'eau.

15 4°- Procédé selon la Revendication 3, caractérisé en ce que lorsque la séparation des préspores du milieu de culture est réalisée par filtration, elle peut l'être en présence d'un adjuvant de filtration approprié.

20 5°- Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que le support inerte utilisé dans la troisième étape est une argile choisie dans le groupe qui comprend notamment la rhyolite, la terre de diatomées, l'attapulgite, l'argile complexe "Le Buisson" à base essentiellement de 25 bentonite et d'attapulgite.

25 6°- Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que les Entomophthorales mises en oeuvre pour la production et/ou la maturation et/ou la germination de spores-azygospores ou zygospores - sont choisies notamment dans 30 le groupe qui comprend C. osmodes, C. obscurus, C. thromboïdes, N. fresenii et Z. radicans.

35 7°- Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que la maturation des préspores en spores en mélange avec un support inerte, est réalisée en présence d'eau, la proportion des constituants du mélange préspores:eau:support inerte étant comprise entre 2-6:1-7:2-15, en fonction du

type d'argile et de l'espèce (ou souche) considérés.

8°- Procédé selon les Revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'étape supplémentaire de levée de la dormance des spores obtenues à l'issue de la quatrième étape, comprend le maintien pendant au moins deux mois à une température moyenne de 2 à 7°C, d'un mélange de spores, d'un support inerte et d'eau présents dans des proportions variables suivant l'espèce (ou souche) et le type d'argile considérés.

10 9°- Produit intermédiaire nouveau utile pour la production de spores d'Entomophthorales présentant un pouvoir entomopathogène élevé, caractérisé en ce qu'il est constitué par un mélange de préspores sphériques à paroi bituniquée obtenues par fermentation dans un milieu de culture approprié, et d'une argile choisie dans le groupe qui comprend notamment la rhyolite, la terre de diatomées, l'argile "Le Buisson" et l'attapulgite, selon la Revendication 1.

10 20 10°- Produit présentant un pouvoir entomopathogène élevé, caractérisé en ce qu'il est constitué par un mélange d'argile et de spores d'Entomophthorales dont la dormance a été levée par maintien dudit mélange pendant au moins deux mois à une température moyenne comprise entre 2 et 7°C, obtenu selon la Revendication 1 et la Revendication 2.

25 11°- Composition phytosanitaire entomopathogène caractérisée en ce qu'elle est constituée par un mélange de spores présentant un pouvoir infectieux élevé à l'égard des insectes nuisibles, notamment en agriculture, et d'argile, obtenu selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8, 30 associé aux composés usuels pour la préparation d'une telle composition tels qu'agents collants, mouillants, dispersants, propres à faciliter la pulvérisation ou l'aspersion ultérieure desdites compositions en plein champ.

12°- Composition phytosanitaire selon la Revendication 11, caractérisée en ce que son constituant actif est constitué par des spores enrobées d'argile, à pouvoir

entomopathogène élevé, obtenues par maturation de préspores sphériques issues d'une fermentation.

- 13°- Composition phytosanitaire selon la Revendication 11, caractérisée en ce que son constituant actif
- 5 est constitué par des spores enrobées d'argile, à pouvoir entomopathogène élevé, obtenues par maturation de préspores sphériques issues d'une fermentation, et maintien des spores résultantes pendant au moins deux mois à 2-7°C, pour lever la dormance desdites spores.
- 10 14°- Procédé de traitement de cultures à l'aide de la composition phytosanitaire selon l'une quelconque des Revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer sur la plante et/ou au sol, par pulvérisation ou aspersion, ladite composition phytosanitaire pour contrôler
- 15 des populations d'insectes nuisibles importantes déjà établies sur la plante, dans le cas où le constituant actif est à germination rapide (environ 48 heures), ou avant l'apparition des insectes ou dès la détection des premiers insectes nuisibles, pour contrôler la population d'insectes
- 20 avant qu'elle n'ait atteint un seuil dommageable pour la culture, dans le cas où le constituant actif est à germination lente (8 à 15 jours ou plus).

PLANCHE UNIQUE

