AMÉLIORATION DES RENDEMENTS ET DE LA QUALITÉ DES FRAISES ET FRAMBOISES PAR UNE GESTION ÉCOLOGIQUE ET RENTABLE DES FONGICIDES ET DES POLLINISATEURS

PROJET NO. 2070

ASSOCIATION DES PRODUCTEURS DE FRAISES ET FRAMBOISES DU QUÉBEC (APFFQ)

LES FRAISES DE L'ÎLE D'ORLÉANS INC.

RAPPORT FINAL

MAI 2004 À MARS 2006

RÉDIGÉ PAR
MADELEINE CHAGNON ET PIERRE-O. THIBODEAU

AVEC L'AIDE DE
ÉRIC CADORETTE, JOCELYN BOULIANNE, ÉMILE HOULE

PROJET RÉALISÉ DANS LE CADRE DU PROGRAMME
DE RECHERCHE APPLIQUÉE, INNOVATION ET TRANSFERT DU CDAQ

JUILLET 2006

TABLE DES MATIÈRES

Principaux éléments ayant contribué à la réussite du rapport	i
SOMMAIRE EXÉCUTIF	
SECTION I : MISE EN CONTEXTE	
1. Introduction et problématique 2. Objectifs 2.1 Objectif général..... 2.2 Objectifs spécifiques de départ..... 2.3 Objectifs additionnels ..... 3. Méthodologie générale 3.1 Procédures de récolte de données ..... 3.2 Division du travail complémentaire et personnel impliqué	
SECTION II : IMPACT DES FONGICIDES SUR LE POLLEN DU FRAISIER.....	
1. Mise en contexte ..... 2. Matériels et méthodes ..... 3. Résultats et discussion ..... 4. Évaluation de l'infection latente dans les fruits 4.1 L'amplification en chaîne par polymérase, PCR 4.2 L'échantillonnage 4.3 L'extraction de l'ADN 4.4 Conclusion 5. Références	
SECTION III : LUTTE CONTRE LA POURRITURE GRISE CAUSÉE PAR LE CHAMPIGNON PATHOGÈNE BOTRYTIS CINEREA : PÉRIODE D'APPLICATION DES FONGICIDES EN RELATION AVEC LA PHÉNOLOGIE DU PLANT DE FRAISE	
1. Mise en situation 1.1 Pertes au champ 1.2 Détection des infections latentes sur des fruits apparemment sains 1.3 Pertes en entrepôt et chez les consommateurs 2. Stratégie actuelle de lutte contre la Pourriture grise des fraises 3. Questions fondamentales auxquelles ce projet voudrait au moins partiellement répondre	

4. Expérimentation
4.1. Essais préliminaires en serre
4.2. Essais en parcelles expérimentales
4.2.1 Protocole expérimental
4.2.1.1 Préparation des parcelles avant expérimentation
4.2.1.2 Traitements appliqués en parcelles afin de vérifier l'efficacité des fongicides pulvérisés lors de la floraison, sur le % d'infections latentes des fruits
4.2.
1.3 Cueillette et traitements des fruits récoltés

5. Résultats et traitements statistiques
5.1 Objectif
5.2 Description du plan d'expérience
5.3 Méthode statistique
5.4 Résultats
5.5 Référence

6. Conclusions et recommandations

7. Assurer la continuité

SECTION IV : MISE AU POINT DU DISTRIBUTEUR

1. Étapes du développement du distributeur monté sur une ruche standard

2. Recommandations pour la méthode d'application à partir du distributeur monté sur une ruche
2.1 Humidité, condensation et emplacement des ruches
2.2 Quantité de fongicides ou autre produits
2.3 Caractéristiques du produit à disperser à l'aide de l'appareil

3. Conclusions

SECTION V : DISTRIBUTION DU FONGICIDE SUR LES FLEURS

1. Introduction

2. Méthodologie
2.1 Terrain (champ et serre)
2.1.1 Acquisition de l'inoculum par les pollinisateurs
2.1.2 Quantité d'inoculum déposé sur les fleurs
2.2 Au laboratoire
2.3 Traitement des données

3. Résultats et discussion

3.1 Acquisition de l'inoculum par les pollinisateurs
3.2 Inoculum déposé dans les fleurs

4. Conclusion

5. Références

SECTION VI : IMPACTS DES FONGICIDES VÉHICULÉS PAR L'ABEILLE SUR LA COLONIE

1. Introduction

2. Tests en laboratoire
2.1 Tests d'ingestion
2.1.1 Matériels et méthodes
2.1.2 Résultats et discussion

2.2 Test de contact et d'inhalation
2.2.1 Matériels et méthodes
2.2.2 Résultats et discussion

2.3 Mesure de la taille des stigmates de l'abeille et de la grosseur des particules des fongicides et autres produits

2.3.1 Matériels et méthodes
2.3.2 Résultats et discussion
2.3.2.1 Grosseur des stigmates
2.3.2.2 Grosseur des particules et mortalité

2. 4 Hygroscopie des particules de fongicides
2.4.1 Matériels et méthodes
2.4.2 Résultats et discussion
3. Tests au champ
3.1 Impacts à court terme : La technique du drap blanc
3.1.1 Matériels et méthodes
3.1.2 Résultats et discussion
3.1.2.1 Efficacité de la technique du drap blanc
3.1.2.2 Nombre de fèces
3.1.2.3 Mortalité
3.1.2.4 Relations entre l'hygroscopie des fongicides et d'abeilles mortes au champ

3.2 Impacts à moyen terme : La santé des colonies d'abeille
3.2.1 Matériels et méthodes
3.2.2 Résultats et discussion

3.3 Analyse de la production de miel

3.3.1 Matériels et méthodes 3.3.2 Résultats et discussion 4. Conclusions 5 Références SECTION VII : ANALYSE DES CONSTITUANTS DE LA RUCHE SECTION VIII : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION DU RAPPORT SECTION IX : DIFFUSION DES RÉSULTATS SECTION X : BILAN DES BIENS LIVRABLES SECTION XI : BILAN DU PLAN DE FINANCEMENT	

LISTE DES FIGURES

SECTION II

Figure 1 : Grains de pollen de la fleur du fraisier sur milieu de germination (400X)……..

SECTION III

Figure 2 : Graphique des taux moyens de fruits infectés, par traitement et par temps d'observation…….

Figure 3 : Essai préliminaire d'inoculation des fleurs en serre avec Botrytis cinerea. Récolte des fruits verts 10 à 14 jours après floraison et enlèvement des sépales avant la désinfection superficielle et la mise des fruits en chambre humide pour la détection des infections latentes ……

Figure 4 : Fleurs individuelles inoculées, traitées ou non, et identifiés par des rubans collants……..

Figure 5 : Récolte des fruits verts 7 jours après l'inoculation et les traitements…….

SECTION IV

Figure 6 : Conception du distributeur…….….

Figure 7 : Distributeur Houle inséré sur une ruche ……..……

Figure 8 : Vue intérieure du distributeur Houle ……

SECTION V

Figure 9 : Essais en laboratoire (IRDA) pour la mise au point du milieu de culture de *Trichoderma*……..

Figure 10 : Développement de la nouvelle technique en laboratoire (IRDA) pour la mise au point du milieu de culture de *Trichoderma*……

SECTION VI

Figure 11 : Mortalité moyenne (%) des abeilles suite au test par contact avec différentes quantités de poudre……

Figure 12 : Pourcentage de mortalité des abeilles en fonction de la grosseur des particules……

Figure 13 : Nombre de fèces laissées par les abeilles adultes sur le dispositif expérimental au-devant de la ruche……..

Figure 14 : Nombre d'abeilles mortes, après exposition aux fongicides, laissées sur le dispositif expérimental en fonction de la distance au-devant de la ruche du 31 mai au 20 juin 2005……

Figure 15 : Nombre de fèces des abeilles retrouvées sur le drap blanc pendant les traitements (semaine 1 : 31 mai au 6 juin ; semaine 2 : 7 juin au 13 juin ; semaine 3 : 14 juin au 20 juin 2005)……..

Figure 16 : Dénombrement d'abeilles mortes sur le drap blanc (3 m^2) en fonction des traitements du 31 mai au 20 juin 2005 (il y a une différence significative lorsque les lettres sont différentes; $P < 0,05$)……

Figure 17 : Nombre d'abeilles mortes retrouvées sur le drap et comptabilisées semaine après semaine entre le 31 mai et 20 juin 2005…….

Figure 18 : Mortalité des abeilles au champ en fonction de l'hygroscopie des fongicides utilisés……

Figure 19 : Production moyenne de miel par traitement (4 colonies/traitement) selon la date (en traitement et post-traitement)……..……..

Figure 20 : Test de toxicité par ingestion. Les abeilles s'alimentent sur un cube de sucre imbibé d'un fongicide dilué dans l'eau à la dose recommandée au champ……...

Figure 21 : Test de toxicité par ingestion et par contact sous température et humidité contrôlées (température 28 ºC; humidité 60 %)……

Figure 22 : Remplissage du distributeur devant la ruche……

Figure 23 : Technique du drap blanc pour évaluer le nombre de fèces déposées par les abeilles……..

LISTE DES TABLEAUX

SECTION II

Tableau 1: Fongicides sélectionnés et testés à la dose recommandée au champ (CRAAQ) …….

Tableau 2: Taux de germination du pollen de fraisiers cv. Seascape en présence des fongicides sélectionnés et appliqués aux mêmes concentrations qu'en fraisières……

SECTION III

Tableau 3 : Résultats des tests sur les effets fixes……..

Tableau 4 : Estimateurs des logit, erreurs-types, taux moyens de fruits infectés et bornes de l'intervalle de confiance à 95 % pour le taux moyen, par traitement et par temps. ……..

Tableau 5 : Contraste et valeur du test……..

Tableau 6 : Pourcentage d'infections latentes retrouvées pour les jeunes fruits verts

SECTION V

Tableau 7 : Pourcentage d'abeilles avec du *Trichoderma* …….....

Tableau 8 : Pourcentage de fleurs où *Trichoderma* a été détecté. Nombre moyen de CFU chez les fleurs exposées et témoin……..

Tableau 9 : Pourcentage de fleurs visitées une seule fois par l'abeille domestique chez lesquelles *Trichoderma* a été détecté……

Tableau 10 : Pourcentage de fleurs où *Trichoderma* fut détecté (x ± e.t. de CFU/fleur) lorsque celles-ci sont exposées à des visites de bourdons ou encagées……

Tableau 11 : Pourcentage de fleurs ayant reçu une seule visite de bourdons montrant la présence de *Trichoderma*……

SECTION VI :

Tableau 12 : Classification des fongicides pour les tests de toxicité des abeilles par ingestion du sirop de glucose contaminé avec différents fongicides……

Tableau 13 : Classification des fongicides pour les tests de toxicité par inhalation 0,5 g à t = 4h00 ……..

Tableau 14 : Taille moyenne des particules pour les différentes poudres …….

Tableau 15 : Pourcentage d'hygroscopie des fongicides à différents moments (t = temps 0h, 3h30, 18h00 et 40h30)…….

Tableau 16 : Relation entre le nombre de fèces et la population des colonies selon le temps des traitements

Tableau 17 : Nombre total des fèces et des mortalités retrouvées sur le drap au champ pour les différents

traitements (bloc : 4 ruches / traitement) (31/05/05 au 22/06/05) et rapport fèces / mortalité….

Tableau 18 : Analyse du couvain non operculé (CNO), au début, pendant et après les traitements aux différents fongicides (en nombre d'alvéoles non operculées contenant œuf et larve)….

Tableau 19 : Évolution du développement du couvain non operculé (CNO) à couvain operculé (CO) et à la population d'abeilles adultes (POP) selon les dates (en nombre)……

Tableau 20 : Poids moyen de la production de miel durant et après l'expérience…….

SECTION VII :

Tableau 21 : Résultats des analyses des résidus dans le miel pour le Supra Captan……

SECTION X

Tableau 22. Bilan financier des dépenses accordées par le CDAQ……..

Tableau 23 : Bilan financier de la participation du personnel du CRSAD …….

Tableau 24 : Bilan financier de la participation de l'IRDA……

Principaux éléments ayant contribué à la réussite du projet

Un bien grand merci pour le financement du CDAQ, sans quoi ce projet n'aurait pas été réalisé; merci pour la collaboration amicale et indéfectible de France Papineau, agente de projet au CDAQ, et de Caroline Thibault de l'APFFQ.

Nous voulons aussi souligner l'apport en biens et services des autres partenaires : Les Fraises de L'Ile d'Orléans inc., particulièrement à M. Louis Gauthier pour sa disponibilité et son aide de tous les instants, pour son approvisionnement de plants Seaescape, de même qu'aux producteurs, MM. Plante, Gosselin et Pouliot pour la mise en disponibilité de leurs parcelles de fraises. Je pense aussi à la collaboration d'UAP Canada, en particulier M. René Gingras, représentant, pour sa rapide collaboration à nos demandes et l' approvisionnent en fongicides. M. Thierry Chouffaut de Koppert Canada, excellent collaborateur, pour l'obtention de ruchettes de bourdons et des deux kilos du fongicide ROOTSHIELD Drench; merci à Jean-Claude Brulotte de Synagri inc, de Charny, qui nous a toujours très bien accueilli. Merci à la Ferme Roger Labrecque inc. pour l'approvisionnement en fleurs et en plants de fraisiers.

Merci à l'IRDA et au CRSAD pour la disponibilité des locaux, (serres, laboratoires et miellerie), des infrastructures du Complexe scientifique et des Stations expérimentales de Deschambault et de Saint-Lambert. Merci aussi à la Fédération des apiculteurs du Québec pour leur intérêt dans notre projet.

Merci aux professionnels(les) et techniciens(nes) de l'IRDA et du CRSAD, de même qu'à MM Pierre Giner, Marc Laverdière, Roch Joncas, François Charrier, Pierre Dumas et Éric Bellemare, et Mmes Chantale Gagnon, Lucie Boivin, Chantale Poitras, Claudine Jomphe, Nicole Boivin.

Je remercie aussi Mme France Papineau du CDAQ pour son intérêt à notre projet et pour sa patience tout au long du processus de demandes de fonds, de réalisation du projet et de la remise du présent rapport final

Grand merci au personnel ouvrier de l'IRDA de Saint Lambert et de Deschambault : Michel Noël et Harold Dusablond, (régisseurs des fermes expérimentales de Saint-Lambert et de Deschambault), Jean-Marie Noël, Kenneth Dumont, Alain Gonthier, Mariette Sauvageau, Christian Gonthier, Sylvie Atkins et Marc Hébert.

Je ne peux terminer sans bien appuyer sur le fait que la réussite de ce projet est en très grande partie due à la motivation et à la ténacité des membres de l'équipe professionnelle et technique qui l'ont réalisé : Dr Madeleine Chagnon, coordonnatrice de la plupart des activités reliées au projet; Émile Houle, spécialiste apicole; et enfin Éric Cadorette et Jocelyn Boulianne, deux étudiants à la maîtrise. Bien sur, on ne peut oublier le travail très professionnel de notre stagiaire portugaise, madame Sylvia Todorova, et l'appui soutenu des deux directeurs de nos étudiants : Dr Domingos de Oliveira de l'UQAM et Dr Daniel Dostaler de l'Université Laval.

Merci à tous,

Pierre O. Thibodeau, phytopathologiste IRDA

SOMMAIRE EXÉCUTIF

La culture de la fraise est sujette à la Pourriture grise causée par les conidies de *Botrytis cinerea*, qui infectent les fleurs et causent des infections dites « latentes » qui demeurent dans les fruits immatures, et seront responsables de la pourriture des fruits en pré ou post-récolte. Selon les recommandations officielles du CRAAQ, son contrôle s'effectue surtout par l'application d'un fongicide en début de végétation (Chlorothalonil) et 2 à 3 pulvérisations d'autres fongicides durant la floraison. Les étiquettes mentionnent de répéter les applications aux 7 à 10 jours, ou aux 5 jours en conditions favorables à la maladie. Ces produits sont appliqués sans savoir s'ils sont nocifs au pollen de cette culture et aux pollinisateurs. Les fongicides doivent être pulvérisés deux à trois fois alors que la floraison dans les champs n'est que partielle (10 % et 50 % floraison). Donc, seules les fleurs ouvertes seraient protégées des pourritures du fruit.

En 2000, un chercheur américain, le Dr Joseph Kovach, publiait avec ses collaborateurs des résultats d'études en conditions expérimentales qui démontraient qu'il était possible, à l'aide d'un distributeur de fongicides adapté à la ruche, de disperser sur les fleurs un fongicide biologique, par les abeilles introduites dans une fraisière pour la pollinisation. La distribution des fongicides dits de « synthèse » par l'abeille ou le bourdon ne semble pas avoir été essayée, pourtant ils sont de moins en moins nocifs pour l'environnement.

La distribution continue de fongicides par l'abeille lors de la floraison pourrait s'avérer être une méthode de contrôle plus efficace et écologique de la Pourriture grise des fruits, augmentant par le fait même, la qualité et les rendements en fraises. Cependant, nous ne savions pas si cette méthode était applicable au champ, dans les conditions qui prévalent au Québec durant la floraison de la fraise. Tout d'abord, il fallait s'assurer que le contact direct des abeilles avec un fongicide, lors de leur passage dans un distributeur attaché à leur ruche, n'était pas dangereux pour leur survie, ni pour la santé de l'ensemble de leur colonie. De plus, nous ne savons pas si les fongicides présentement homologués contre *Botrytis* peuvent avoir des effets nocifs sur la germination du pollen de la fleur du fraisier. Dans la présente étude, nous avons tenté de résoudre quelques facettes de cette problématique par une série d'objectifs complémentaires.

Le but principal de cette étude était d'assurer une meilleure protection des fraises contre la Pourriture grise par une gestion plus écologique des fongicides et des pollinisateurs. Les principaux objectifs visaient donc, dans un premier temps : 1) de vérifier la toxicité des fongicides biologiques ou de synthèse sur les pollens, afin de ne pas nuire à la bonne pollinisation (forme esthétique et volume des fruits); 2) de vérifier aussi leur toxicité sur l'abeille et le bourdon pour les protéger; 3) s'il y a des fongicides non toxiques aux pollens et aux pollinisateurs, pourquoi ne pas les faire distribuer par eux? 4) si oui, développer un distributeur original de fongicides; 5) enfin, il faut vérifier l'efficacité réelle des interventions fongicides faites durant la floraison et déterminer combien d'applications de fongicides sont nécessaires durant la floraison pour s'assurer un bon contrôle de la Pourriture grise.

Dans un premier temps, il a fallu sélectionner des fongicides qui répondaient aux critères mentionnés plus haut, et mettre au point un distributeur s'adaptant aux dimensions standards

des ruches utilisées au Québec. Ensuite, selon la méthodologie proposée, les fongicides sélectionnés sont testés au champ pour vérifier l'efficacité de leur transport par l'abeille domestique sur les fleurs de la fraisière à l'aide du distributeur de fongicides posé à l'entrée de la ruche. Des essais similaires sur le bourdon en serre sont également réalisés.

Les études en serre et en laboratoire on été réalisées à l'IRDA au Complexe scientifique, à Québec, et à Saint-Hyacinthe. Les observations sur le terrain ont été effectuées à l'Île d'Orléans, à Saint-Lambert et à Deschambault.

Certains fongicides peuvent influencer le taux de germination du pollen, et par le fait même entraîner une mauvaise pollinisation provoquant des malformations des fruits et une perte de rendement non négligeable. Le pouvoir germinatif des grains de pollen du fraisier, var. Seascape, en présence de fongicides a été estimé à la concentration recommandée des substances actives. L'étude a démontré que certains fongicides peuvent être toxiques à la germination du pollen. Le fongicide SUPRA CAPTAN® s'est révélé comme étant le plus nocif ; il a donc été retenu comme témoin négatif pour des tests ultérieurs. L'étude a aussi permis de démontrer que certains fongicides ne sont pas nocifs au développement normal des grains de pollen. Il s'agit des fongicides de synthèse commercialisés sous les noms de LANCE®, ELEVATE®, Senator®, Rovral® et Nova®, ainsi que du bio-fongicide Rootshield®. Basé sur les informations issues de ces travaux, il est probable qu'un choix judicieux de fongicides non nocifs au pollen permettra d'optimiser les chances d'avoir une bonne pollinisation lors de la floraison, malgré l'utilisation de ces produits pour lutter contre le *Botrytis cinerea.*

Lors de ces tests, nous avions noté que la viabilité du pollen était fortement influencée par sa durée d'exposition à une forte humidité ou à la présence d'eau, ce qui pourrait avoir une répercussion évidente sur la gestion des applications de fongicides (temps d'application, toxicité, rémanence, efficacité, etc.) et leur efficacité de contrôle de la Pourriture grise. Ces observations ont mené à une autre série de tests concernant l'efficacité de l'application des fongicides Boscalide et Captane sur les fleurs de fraisiers, pour lutter contre la Pourriture grise des fruits. Afin de confirmer que les infections par *Botrytis* avaient lieu durant la floraison et de bien vérifier l'efficacité des fongicides à ce stade, nous avons déterminé le pourcentage d'infections latentes de Botrytis sur les jeunes fruits verts provenant de fleurs traitées ou non avec ces fongicides, 5 à 7 jours plus tard. Le pourcentage des infections latentes de *Botrytis* détectées sur les très jeunes fruits verts issus de fleurs non traitées, que ce soit des parcelles témoins ou des fleurs apparues après les traitements fongicides, est toujours très élevé (65 à 100 %), dépendamment des conditions météorologiques et de l'importance de l'inoculum.

Les fongicides appliqués sur les fleurs se sont montrés très efficaces, réduisant le pourcentage d'infections latentes de 73 à 85 % en période relativement sèche. Cependant, leur efficacité fut réduite quand leur application est suivie d'une période pluvieuse (54 à 67 % de protection). Ces résultats indiqueraient que quatre applications de fongicides, au lieu de 2, durant la floraison des cultivars conventionnels seraient nécessaires pour assurer une bonne protection des fruits contre la Pourriture grise. Il est probable que toutes les autres applications seraient peu ou pas rentables. Il semblerait également qu'il vaudrait mieux

appliquer les fongicides après plutôt qu'avant une pluie. Ces résultats devraient être confirmés en fraisières et être aussi réalisés en framboisières, où on rencontre les mêmes conditions.

L'option de faire distribuer un fongicide par l'abeille exigeait une mise au point et une vérification de la méthode. La conception et la mise au point du distributeur de fongicides ont été effectuées avec succès en 2005, mais quelques petites mises au point ont été faites en 2006. Le distributeur est fabriqué en tôle pliable blanche et est facilement démontable pour permettre un nettoyage efficace. Il est muni d'un tiroir amovible dans lequel on étend uniformément 15 à 20 grammes de poudre fongicide, de préférence à tous les matins, après un nettoyage à fond du tiroir de remplissage. Un grillage moustiquaire placé au fond du tiroir permet au produit de rester en place. La grosseur des particules du produit utilisé est importante. Cette question sera discutée plus loin. Les ruches doivent être positionnées dans le champ avec l'entrée faisant face au soleil afin d'éviter la condensation dans le tiroir de remplissage.

Les périodes de terrain en fraisières n'ont pas été aussi fructueuses que nous l'aurions souhaité à cause de la rareté des abeilles qui butinaient sur les fleurs. On explique cette absence par une température froide de l'air et du sol et par un grand nombre de plantes compétitrices à l'Ile d'Orléans. En 2004, les expériences ont alors été reprises en framboisières à Deschambault et une deuxième série d'observations a été effectuée en fraisières à la station de l'IRDA de Saint-Lambert, lors de la deuxième floraison du cultivar Seascape au mois d'août. Les fraises et les framboises récoltées suite aux visites des abeilles transportant les fongicides ont été mises en chambre humide pour vérifier le taux d'infection par la Pourriture grise et autres maladies. Les résultats en chambre humide sur les fruits murs ne se sont pas avérés efficaces à cause du grand nombre d'infections secondaires (Rhizopus) qui apparaissaient en chambre humide. C'est pour cette raison que la technique de PCR a été abordée.

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été utilisée pour détecter la présence de l'agent pathogène *Botrytis cinerea*, responsable de la Pourriture grise dans la fraise. Cette méthode, quoique plus coûteuse que la traditionnelle chambre humide, s'avère intéressante pour détecter la présence du pathogène dans les fruits verts. Cette technologie permet de vérifier la présence d'une petite quantité de B. cinerea avant son cycle final de sporulation sur le fruit. La spécificité de cette technologie nous permet, grâce à l'amplification d'une séquence de 757 pb unique à *B. cinerea*, d'éviter les interférences causées par d'autres pathogènes au développement plus rapide en chambre humide. Le PCR est donc un outil intéressant pour obtenir des informations épidémiologiques afin de mieux contrôler la maladie et les pertes de rendement. Toutefois, nous n'avons pas pu utiliser la méthode sur des fruits expérimentaux, c'est-à-dire les fruits résultant des fleurs visitées par les abeilles portant des fongicides. Ceci s'explique par un manque de butinage des abeilles sur les fleurs du fraisier au champ en 2006, comme en 2005.

Malgré les imprévus et inconvénients engendrés par un maque de butinage, deux essais ont été réalisés au champ et en serre, en 2005, afin d'évaluer l'efficacité des pollinisateurs (*Apis*

mellifera et *Bombus impatiens*) dans la dispersion de *Trichoderma harzianum*. Dans les deux essais, nous avons utilisé des distributeurs conçus dans le cadre du présent projet. Pour les abeilles en champ, nous avons utilisé le distributeur Houle, décrit plus haut. Pour les bourdons, nous avons utilisé un plus petit distributeur, adapté aux dimensions de la ruchette de bourdons. Une fois chargés de *Trichoderma,* ces distributeurs ont été installés à l'entrée des ruches et ruchettes, permettant l'inoculation des pollinisateurs lors de leur sortie. Les pollinisateurs qui avaient servi de vecteurs ainsi que les fleurs butinées ont été mis sur culture pour déceler la présence de *Trichoderma* sur leurs surfaces. Un milieu de culture permettant le dénombrement des CFU (Colony forming units) a été mis au point à cet effet. Pour l'abeille domestique, les résultats obtenus nous permettent de conclure, que le distributeur Houle assure l'inoculation de tous les insectes en quittant la ruche. Toutefois, la quantité de l'inoculum transporté par l'abeille au moment de sortie de la ruche ($3{,}9 \times 10^3 \pm 1{,}7 \times 10^3$ CFU/abeille) était un peu inférieure aux quantités indiquées dans la littérature par Kovach *et al*. (2000) Cependant, nous avons travaillé dans des conditions au champ difficilement comparables à celles de ces auteurs. Tous les bourdons capturés à la sortie de la ruchette étaient inoculés et présentaient une moyenne de $7{,}2 \times 10^4 \pm 2{,}2 \times 10^4$ CFU/bourdon.

Pour les abeilles capturées en activité de pollinisation sur les fleurs de la culture, nous avons démontré que 40 % des individus portaient du *Trichoderma* et que la densité moyenne de l'inoculum véhiculé était de 53,33 ± 95,43 CFU/abeille. Tous les bourdons capturés dans les mêmes conditions et visitant les fleurs, ont montré la présence de *Trichoderma* et la densité moyenne de l'inoculum véhiculé était de $6{,}6 \times 10^3 \pm 1{,}9 \times 10^3$ CFU/bourdon. Nos essais ont aussi montré qu'entre 35 % (abeilles au champ) et 100 % (bourdons en serre) des fleurs visitées par un pollinisateur étaient inoculées. On peut donc présumer que ces fleurs étaient protégées contre la Pourriture grise. Nos résultats indiquent toutefois que plus d'une visite des pollinisateurs serait nécessaire pour s'assurer qu'une fleur soit efficacement inoculée.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'abeille domestique, comme le bourdon fébrile, possède le potentiel pour acquérir du *Trichoderma* déposé dans les distributeurs – Houle, afin de le disperser dans les fleurs de la culture de fraises. Cette recherche, ainsi que d'autres déjà effectuées, démontre définitivement la capacité des pollinisateurs à disperser avec succès l'agent de lutte biologique *Trichoderma*. Nous n'avons pas reproduit ces essais avec d'autres fongicides car les fongicides de synthèse ne possèdent pas l'avantage de pouvoir être mis en culture. Leur présence sur un pollinisateur ou sur une fleur est donc plus difficile à déceler, mais, vu la nature similaire des produits testés, il est probable que la dispersion soit comparativement efficace.

Quoique cette méthode a été conçue pour protéger la culture de la fraise contre la Pourriture grise, il était important de s'assurer qu'elle ne causait pas de tort aux abeilles et aux bourdons qui les distribuaient. Suite aux tests de toxicité des fongicides, une dizaine d'entre eux ont fait l'objet de tests de préférence et de toxicité, par contact et par ingestion sur l'abeille domestique. Le fongicide le plus toxique lors de ces tests en laboratoire a été le SUPRA CAPTAN®. Ce fongicide a également été celui qui était le plus répulsif. Parmi les produits les moins nocifs, nous retrouvons deux fongicides de synthèse, LANCE® et ELEVATE®, ainsi que le fongicide biologique, Rootshield®. Ces trois fongicides ont donc été sélectionnés pour les travaux de terrain et comparés à un témoin neutre et au SUPRA CAPTAN®. Lors

des tests en laboratoire, le bourdon ne semblait pas sensible aux produits ici mentionnés, ni par ingestion, ni par contact.

Des tests de toxicité à long terme sur le développement des colonies d'abeilles transportant des fongicides ont également été réalisés. En 2005, les tests ont été faits sur 24 ruches. Les variables observées étaient le poids des ruches, la densité de la population et le développement du couvain. À la ruche, on observait également, le nombre d'abeilles et de larves mortes, la couleur, la forme et la densité des fèces.

L'état de santé de l'abeille est légèrement affecté lorsqu'elle transporte des fongicides (SUPRA CAPTAN®, ELEVATE®, LANCE® et ROOTSHEILD® (*Trichoderma*)) durant la période d'activité où elle doit faire des passages à travers le distributeur – Houle pour aller butiner sur les fleurs du fraisier. Cependant, il ne semble pas y avoir d'impact sur les colonies d'abeilles à long terme, ni sur la production de miel. Il a aussi été démontré que la grosseur des particules des différents fongicides testés, ainsi que leur pouvoir hygroscopique, pouvait influer sur la nocivité du produit envers les abeilles.

Des tests de résidus dans le miel ont été effectués pour le fongicide CAPTAN$^{MD.}$ Les résultats démontrent des résidus d'un maximum de 0,009 mg/kg. Ces chiffres obtenus pour le fongicide qui s'était montré le plus nocif lors de nos tests de toxicité, sont en-dessous des normes d'acceptation de l'ARLA (0,1 mg/kg). Les autres fongicides, ainsi que les autres constituants de la ruche (cire, pollen), n'ont pas été testés car les méthodes d'analyse n'étaient pas au point et des budgets supplémentaires auraient été nécessaires pour les développer.

Les objectifs atteints sont la conception des distributeurs de fongicides, une mise au point d'un milieu amélioré de germination du pollen de fraiser, l'élaboration d'une technique efficace pour la vérification de la toxicité des fongicides sur le pollen de fraisiers, l'identification du niveau de toxicité de 18 fongicides pour la germination des pollens, l'identification du niveau de toxicité et de répulsivité de 8 fongicides sur les abeilles et les bourdons, et enfin, nous avons démontré l'efficacité et la nécessité de faire plus d'applications de fongicides durant la floraison afin d'assurer une protection efficace des fruits contre la Pourriture grise en pré et post-récolte. Nous avons aussi fait les essais du distributeur de fongicides Houle au champ, l'évaluation de la technique en chambre humide pour améliorer son efficacité (peu coûteuse et très précise si utilisée sur les jeunes fruits verts) et, finalement, la mise au point de la technique d'évaluation de la qualité des fèces d'abeilles suite à leur contact avec un fongicide.

Finalement, nous pouvons conclure qu'il est possible de distribuer un fongicide, ou tout autre produit phytosanitaire sous forme de poudre, par l'abeille ou le bourdon sur les fleurs d'une culture. Cependant, il faut s'assurer que le produit soit le moins nocif possible pour l'abeille et le pollen de la plante visée et il faut suivre la bonne méthode d'utilisation du distributeur. Certains tests d'efficacité de la méthode s'avèrent toutefois encore nécessaires. Il est aussi important de s'assurer que la culture soit bien fréquentée par les pollinisateurs utilisés.

SECTION I
MISE EN CONTEXTE

1. Introduction et problématique

La fraise dépend fortement des insectes pollinisateurs car une bonne pollinisation assure la production de fruits de qualité (grosseur, forme, esthétique) et un bon rendement (nombre, calibre, poids). Au contraire, une pollinisation mauvaise ou partielle conduit au rejet et à la déformation des fruits, ainsi qu'à des pertes importantes de rendement. Cette culture est sujette à la Pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*, dont les conidies infectent les fleurs, puis atteignent les jeunes fruits verts (infections latentes) pour ensuite faire pourrir les fruits à maturité, en pré ou post-récolte. Son contrôle s'effectue par 2 à 3 pulvérisations de fongicides durant la floraison. Ces produits sont appliqués sans savoir s'ils sont nocifs au pollen de cette culture et aux pollinisateurs.

Quelques recherches provenant surtout de l'étranger démontrent la nocivité de certains fongicides à l'égard du pollen et des pollinisateurs. De plus, la répulsivité des fongicides à l'égard des pollinisateurs ne semble pas avoir été examinée. Les guides de protection recommandent deux applications (maximum trois) de fongicides alors que la floraison dans les champs n'est que partielle (10 et 50 % floraison). Donc, seules les fleurs ouvertes à ces moments sont protégées des pourritures du fruit. Puisqu'il y a ouverture journalière de nouvelles fleurs, la plupart d'entre elles ne bénéficient pas de l'application de fongicides.

2. Objectifs

2.1 Objectif général

L'étude vise à augmenter la qualité et les rendements en fraises grâce à un contrôle plus écologique de la Pourriture grise des fruits et à une meilleure pollinisation par l'application à la floraison de fongicides non nocifs au pollen et non toxiques ou répulsifs pour les pollinisateurs de ces cultures. Elle vise aussi à réduire les quantités de fongicides, à diminuer les coûts de production et à améliorer l'efficacité des traitements contre la Pourriture grise par l'application par les abeilles de fongicides sélectionnés qui ne sont ni toxiques, ni répulsifs.

2.2 Objectifs spécifiques de départ

- Vérifier la toxicité des fongicides homologués sur la fraise envers le pollen des fleurs de ces cultures (qualité du pollen produit et sa viabilité).

- Vérifier la toxicité et la répulsivité de ces fongicides envers l'abeille et le bourdon.

- Adapter un distributeur de fongicides efficace n'altérant pas la santé de la colonie d'abeilles dans la ruche et les produits de la ruche.

- À l'aide d'un distributeur de fongicides posé à l'entrée de la ruche, utiliser l'abeille domestique pour transporter sur les fleurs au champ les fongicides identifiés comme étant non toxiques ou répulsifs au pollen et aux pollinisateurs.

- Vérifier l'efficacité de la méthode actuelle de contrôle de la Pourriture grise sur les fruits (efficacité des fongicides durant la floraison).

- Recommander une méthode d'application à partir d'un distributeur monté sur une ruche d'abeilles.

2.3 Objectifs additionnels

Au cours de la réalisation du projet, plusieurs autres objectifs de recherche se sont avérés pertinents. Comme ils ont été réalisés dans le cadre du projet financé par le CDAQ et que les résultats sont inclus au présent rapport, il nous semble ici justifié de les mentionner.

- Mettre au point une méthode de PCR pour détecter la présence latente de *Botrytis* dans les fruits verts.

- Mettre au point une méthode de culture du *Trichoderma* sur agar afin de déceler sa présence sur les abeilles, les bourdons, les fruits et les fleurs.

- Vérifier l'impact des propriétés physiques (grosseur, hygroscopie) des poudres fongicides sur la mortalité des abeilles.

- Déterminer la meilleure période d'application des fongicides en relation avec la phénologie du plant de fraises.

- Déterminer l'efficacité des fongicides appliqués durant la floraison sur le contrôle de la Pourriture grise et le nombre d'applications nécessaires à ce stade pour bien contrôler la maladie en pré et post-récolte.

3. Méthodologie générale

3.1 Procédures de récolte de données

Le travail réalisé dans le cadre de ce vaste projet se divise en plusieurs volets qui comportent chacun une méthodologie qui lui est particulière. Afin d'en faciliter la lecture, nous avons convenu de diviser la description de la démarche méthodologique selon les sections respectives de ce rapport.

3.2 Division du travail complémentaire et personnel impliqué

Le travail à effectuer dans le cadre de ce projet a été réalisé à différents endroits et par différentes personnes, selon leur champ d'expertise professionnelle respectif. L'ensemble des travaux a été supervisé par Mme Madeleine Chagnon, chargée de projet.

CRSAD
La conception et la construction des distributeurs ont été réalisées grâce aux efforts de M. Émile Houle qui a mis de nombreuses heures à la réalisation de ces tâches. M. Houle et son équipe d'ouvriers et d'étudiants stagiaires ont été responsables de la préparation et du transport des ruches entre les différents sites utilisé dans le cadre du projet. Ces derniers ont aussi effectué l'évaluation finale du couvain dans le but de mesurer les impacts des différents traitements sur les abeilles. Des tests de toxicité sur les abeilles en cage ont été réalisés dans les laboratoires du CRSAD à plusieurs reprises par M. Jocelyn Boulianne et Mme Madeleine Chagnon.

Plusieurs fonctions administratives ont été réalisées au CRSAD. Ces tâches comprennent l'embauche de personnel, la préparation et signature de contrats, l'émission des salaires et des honoraires, la mise à jour du bilan financier et la production d'affiche de diffusion des résultats.

IRDA
Tout le travail concernant les impacts des fongicides sur la germination des pollens, ainsi que la protection des fruits contre la Pourriture grise, ont été réalisé par Pierre Thibodeau et Eric Cadorette à l'IRDA. Une grande partie des travaux ont été réalisés en laboratoire et en serre au Complexe scientifique. Des travaux ont aussi été effectués dans des parcelles de recherche à la Ferme expérimentale de Saint-Lambert.
Une stagiaire du Portugal, Mme Silvia Albano, invitée par le Dr De Oliveira et supervisée par Pierre Thibodeau, a aussi travaillé de nombreuses heures dans les laboratoires et les serres de l'IRDA au Complexe scientifique. Le travail de terrain de Mme Albano a été réalisé dans les champs de M. Pouliot (membre des Fraises de l'Île) sur l'île d'Orléans.

Les Fraises de l'Île d'Orléans inc.
La plupart des travaux de terrain ont aussi été réalisés sur l'Ile d'Orléans dans des champs appartenant à quatre producteurs membre des Fraises de l'île. Les producteurs impliqués durant ces deux étés de terrain étaient Louis Gauthier (Cultivar Seascape), Louis Gosselin (Cultivar Acadie), M. Plante (Cultivar Yamaska), M. Pouliot (Cultivar Seascape) Ces producteurs ont mis leurs terres, leurs bâtiments, leurs outils et leur personnel à notre disposition. Monsieur Louis Gauthier, directeur des Fraises de l'Ile, nous a fournit le support nécessaire à l'établissement de la fraisière expérimentale à Saint-Lambert.

UQAM
Les laboratoires du Dr Domingos de Oliveira ont été mis à la disposition du projet pour les travaux concernant les caractéristiques particulières des fongicides et leur relation avec les mortalités d'abeilles. Le Dr de Oliveira a supervisé les travaux de Jocelyn Boulianne à cet effet.

SECTION II
IMPACT DES FONGICIDES SUR LE POLLEN DU FRAISIER

1. Mise en contexte

L'application de fongicides en début de saison de végétation est nécessaire pour protéger le feuillage et les autres parties de la plante de plusieurs cultures fruitières. Dans certains cas, les applications ciblent spécifiquement les fleurs pour contrôler les pathogènes pouvant s'attaquer aux pièces florales et aux fruits. Dans la culture des fraisiers, des applications de fongicides sont recommandés pendant la floraison pour lutter contre la Pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Ce pathogène important du fraisier peut infecter différentes parties de la fleur pour atteindre le fruit et causer des pertes économiques non négligeables. Conséquemment, les périodes d'application de fongicides coïncident avec la pollinisation.

Plusieurs études démontrent l'effet toxique de certains pesticides sur la germination du pollen, la mise à fruit et le rendement des cultures d'arbres fruitiers (Rosaceae) tel les pommiers (*Malus* x *domestica* Borkh.) (Church *et al*., 1977; Legge *et al.*,1975), les poiriers (*Pyrus communis* L.) (Butt *et al*., 1985; Mayer *et al*., 1986) et les cerisiers (*Prunus avium* L.)(Eaton, 1961). Le fraisier, étant aussi un rosacée, produit du pollen du même type (classe: tricolpée) que ces arbres fruitiers. Les effets des fongicides utilisés dans la culture des fraisiers est peu connus. Les fongicides utilisés pour lutter contre le *B. cinerea* sont nombreux et ont plusieurs modes d'action pour protéger la plante. De plus, l'apparition sur les marchés de nouveaux produits pour la lutte anti-parasitaire chimique amène un manque de connaissance face à l'effet des nouvelles matières actives sur la pollinisation. Les informations recueillies par cette étude seront des plus importantes pour l'élaboration de recommandations afin de lutter efficacement contre le pathogène responsable de la Pourriture grise dans la fraise tout en minimisant les effets toxiques des fongicides sur les fonctions polliniques.

La germination *in vitro* est régulièrement utilisée pour vérifier la viabilité du pollen (figure 1). Cette technique a aussi été utilisée pour déterminer la toxicité de substances chimiques sur le pollen (Eaton *et al*., 1969).

2. Matériels et méthodes

Les grains de pollen ont été prélevés de plants de fraisiers cv. Seascape cultivé en serre à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) au Complexe Scientifique à Québec. Le pollen a été prélevé le jour de l'expérimentation pour assurer sa fraîcheur et ainsi maximiser sa capacité de germination. Dix-huit fongicides recommandés en application pendant la floraison pour lutter contre *B. cinerea* ont été sélectionné pour l'étude: 1) Chlorotalonil, Syngenta Crop Protecction Canada inc., Guelph; 2) Pyraclostrobine, BASF

Canada inc., Toronto; 3) Cuivre, Cerexagri inc., Philadelphie; 4)Sulfate de cuivre, United Agri Products Canada inc., Dorchester; 5) Fenhexamide, Arvesta Canada inc., Toronto; 6) Dodine, Norac Concepts inc., Ottawa; 7) Folpet, Makhteshim-Agan of North America inc., New York; 8) Ferbame, United Agri Products Canada inc., Dorchester; 9) Boscalid, BASF Canada inc., Toronto; 10) Soufre (polysulfide), United Agri Products Canada inc., Dorchester; 11) Captane, Arvesta Corporation, San Francisco; 12) Myclobutanil, Dow Agrosciences Canada inc., Calgary; 13) Vinclozoline, BASF Canada inc., Toronto; 14) *Trichoderma harzianum* T-22, BioWorks inc., New York; 15) Ipridione, Bayer CropScience inc., Calgary; 16) Captane, United Agri Products Canada inc., Dorchester; 17) Thiophanate-méthyl, Engage Agro Corporation, Guelph; 18) Thirame, Taminco inc., Smyrna.

Le nom commercial, la famille chimique, la formulation, le pourcentage d'ingrédient actif, la dose recommandée et la concentration en partie par million (ppm) des différents fongicides testés sont présentés dans le tableau 1. La capacité germinative des grains de pollen a été vérifiée suite au traitement à la concentration maximum recommandée des fongicides.

Le milieu de germination du pollen consiste à une solution de 1 % H_3BO_3 (p/v), 3 % $CaNO_3$ (p/v), 0,4 % $MgSO_4$ (p/v), 3 % KH_2PO_4 (p/v) et 25 % polyethylène glycol (p.m. 25000)(p/v). Le pH de la solution a été ajusté à 5,2.

Tableau 1: Fongicides sélectionnés et testés à la dose recommandée au champ (CRAAQ)

Nom commercial	Ingrédient actif	Famille chimique	Formulation	Ingrédient actif (%)	Dose* (/ha)	Équivalent au laboratoire (ppm)
Bravo 500™	Chlorotalonil	Chloronitrile	WP	50	3,5 L	1750
Cabrio™	Pyraclostrobine	Strobilurine	EG	20	1 kg	200
Cuprofix™	Cuivre	Substances inorganiques	WP	20	6,5 kg	1300
Copper 53W™	Sulfate de cuivre	Substances inorganiques	WP	53	3,8 kg	2014
Elevate™	Fenhexamide	Hydroxyanilide	WDG	50	1,7 kg	850
Equal™	Dodine	Guanidine	WP	65	2,25 kg	1462
Folpan™	Folpet	Phtalimides	WP	50	2 kg	1000
Ferbam™	Ferbame	Dithiocarbamates	WDG	76	2,5 kg**	1900
Lance™	Boscalid	Anilide	WDG	70	0,56 kg	392
Lime sulphur™	Soufre (polysulfide)	Substances inorganiques	L	22	15 L	3450
Maestro™	Captane	Phtalimides	DF	80	4,5 kg	3600
Nova™	Myclobutanil	Triazoles	W	40	0,34 kg	136
Ronilan™	Vinclozoline	Dicarboximide	EG	50	2 kg	1000
Rootshield™	*Trichoderma harzianum* T-22	Biofongicide	P	-	1 kg	-
Rovral™	Ipridione	Dicarboximide	WDG	50	2 kg	1000
Supra Captan™	Captane	Phtalimide	WDG	80	4,2 kg	3360
Senator™	Thiophanate-méthyl	Benzimidazole	WP	70	1,1 kg	770
Thiram™	Thirame	Dithiocarbamates	WP	80	2,5 kg	2000

*Doses recommandées sur l'étiquette en fraisières

** Dose recommandée sur l'étiquette en framboisières

3. Résultats et discussion

Tel que présenté au tableau 2, la toxicité des fongicides utilisés dans les tests de germination des grains de pollen se répartie en un large éventail allant de 0 à 82 % de taux de germination, le témoin (milieu sans fongicide) représentant une moyenne de 76,4 % de taux de germination. Tel que démontré par l'analyse statistique, l'ensemble des fongicides testés pourrait se répartir en 3 groupes : les fongicides très toxiques au pollen (0 à 25 % de taux germination), ceux modérément toxiques (40 à 70 % de taux germination), et les peu ou pas toxiques au pollen de fraisiers (70 à 100 % de germination).

Le folpet (C9H4Cl3NO2S) et le captane (C9H8Cl3NO2S) sont chimiquement similaire et font partie de la même famille chimique, les phtalimides. On devrait s'attendre à des taux de germination similaires. Pourtant, leur taux de germination est significativement différent, soit de 24,9 % pour le Folpan®(Folpet), de 0,3 % pour le Maestro®(Captane) et de 0 % pour le SUPRA CAPTAN®(Captane). La toxicité supérieure des formulations de Captane est probablement due en partie à la différence de la dose maximale recommandée et appliquée lors des essais qui est plus de deux fois moindre pour le Folpet (voir tableau 1) et au pourcentage de matière active du Folpet de 50 % comparativement à 80 % pour les captanes.

Ceci pourrait expliquer la différence de toxicité de ces fongicides à la germination du pollen. L'ipridione (Rovral®) et la vinclozoline (Ronilan®) font partie de la même famille chimique, les dicarboximides. Leur taux de germination de 78,0 % (ipridione) et 75,8 % (vinclozoline) ne sont pas différents significativement. Leur pourcentage de matière active et leur dose recommandée sont identiques. Ces deux dicarboximides sont donc peu ou pas nocif à la germination du pollen de fraisiers cv. Seascape s'ils sont comparés au contrôle sans fongicide (76,4 %). Les deux fongicides contentant du cuivre, le Copper 53W® et le Cuprofix® inhibent beaucoup la germination du pollen. Leur taux de germination est respectivement, de 3,7 % et 1,0 %. Les résultats peuvent démontrer que les fongicides d'une même famille testés à une concentration similaire, donnent sensiblement les mêmes pourcentage de toxicité sur la germination du pollen et confirment en même temps, la fiabilité de la méthode utilisée dans nos tests de toxicité envers le pollen.

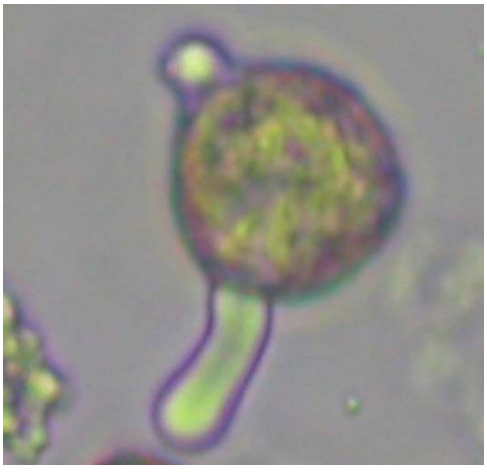

Figure 1 : Grain de pollen de la fleur du fraisier sur milieu de germination (400X)

Tableau 2: Taux de germination du pollen de fraisiers cv. Seascape en présence des fongicides sélectionnés et appliqués aux mêmes concentrations qu'en fraisières.

Matière active	Nom commercial	Taux de germination (%)
Contrôle sans fongicide		76,4 a*
Trichoderma harzianum T-22	Rootshield™	82,4 a
Ipridione	Rovral™	78,0 ab
Boscalid	Lance™	76,2 ab
Vinclozoline	Ronilan™	75,8 ab
Thiophanate-méthyl	Senator™	74,4 ab
Fenhexamide	Elevate™	71,1 ab
Ferbame	Ferbam™	56,0 bc
Dodine	Equal™	45,5 cd
Myclobutanil	Nova™	44,0 cd
Soufre (polysulfide)	Lime sulphur™	40,7 cd
Folpet	Folpan™	24,9 de
Chlorotalonil	Bravo 500™	11,0 ef
Pyraclostrobin	Cabrio™	7,2 ef
Sulfate de cuivre	Copper 53W™	3,7 ef
Cuivre	Cuprofix™	1,0 f
Captane	Maestro™	0,3 f
Thiram	Thiram™	0,3 f
Captane	SUPRA CAPTAN™	0 f

4. Évaluation de l'infection latente dans les fruits

4.1 L'amplification en chaîne par polymérase, PCR

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR, polymerase chain reaction) permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent en la bornant, la séquence à amplifier.

Les produits obtenus à chaque étape de l'amplification sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes. L'amplification de l'ADN cible est alors exponentielle et permet d'en obtenir de grande quantité détectable.

Cette technique d'amplification est grandement utilisée en médecine, en agriculture et en biotechnologie. Pour obtenir de bons résultats, il y a des étapes importantes à réaliser qui sont parfois longues et coûteuses. Il est important de bien dégager l'ADN des cellules pour permettre aux amorces d'atteindre les acides nucléiques ciblés. La lyse des cellules est donc cruciale pour le bon déroulement de la technique. Les cellules lysées contiennent une foule de composés pouvant nuire à l'amplification, voir même l'empêcher. Souvent l'étape coûteuse de la purification doit être effectué pour permettre l'amplification.

Le *Botrytis* en latence dans les fraises est traditionnellement évalué en stérilisant la surface les fruits puis en les plaçant dans un milieu humide pour favoriser la sporulation. Cette technique demande plusieurs jours pour laisser le temps au pathogène de se développer et de sporuler. L'évaluation de l'incidence de la maladie peut être biaisée par les infections secondaires. En effet, la chambre humide peut se contaminer à chaque ouverture lorsque à l'évaluateur vérifie l'avancement de la sporulation sur les fruits. Aussi, les fruits contaminés à l'intérieur de la chambre humide peuvent devenir une source de contaminants secondaires non négligeables et peuvent ainsi fausser à la hausse les résultats. D'autres champignons, comme *Rhizopus,* ayant une croissance plus rapide que le *Botrytis* peuvent aussi nuire à l'évaluation de l'incidence de la maladie en se développant sur toute la surface du fruit.

Des nouvelles technologies moléculaires (PCR) et sérologiques (ELISA) sont plus fiables, mais aussi plus coûteuses. L'utilisation d'anticorps spécifiques dans l'ELISA rend la technique moins accessible vu sont coût dispendieux. Récemment (Rigotti et coll. en 2002) un marqueur moléculaire spécifique pour *B. cinerea,* basé sur une séquence de 757 paires de bases, a été caractérisé. Ce marqueur permet la détection rapide de ce pathogène en latence dans les tissus des fruits en développement.

La technique développée permet, par l'amplification en chaîne par polymérase de la séquence spécifique de 757 pb liée à *B. cinerea,* de détecter rapidement et spécifiquement la

présence du champignon en latence dans les fruits verts. L'expérimentation a été effectuée avec et sans la purification des échantillons.

4.2 L'échantillonnage

La porte d'entrée principale pour le *B. cinerea* dans la fraise est les étamines. Les conidies atteignant les étamines se développent bien en présence de pollen et infiltrent la fleur en passant par les filaments. Cette voie d'accès permet au champignon d'atteindre le réceptacle du fruit et de rester latent en attendant que les conditions environnantes lui permettent de finaliser son cycle de vie jusqu'à la sporulation massive sur le fruit.

Des échantillons de tissus ont été pris à différents endroits dans les fruits. Le champignon en latence a été détecté seulement dans la zone du réceptacle. L'endroit où l'échantillonnage est effectué est donc très important pour bien évaluer la présence ou non du champignon.

4.3 L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une étape importante. La lyse du maximum de cellules est nécessaire pour permettre la libération de l'ADN. En brisant les cellules, de l'ADN de fraisiers et de *B. cinerea* (si il y a présence du champignon dans l'échantillon) sera libérer.

La meilleure technique testée pour briser les cellules est l'utilisation d'azote liquide pour congeler l'échantillon et de l'écraser à l'aide d'un mortier. L'ensemble des cellules de l'échantillon se brisent et libèrent ainsi l'ADN.
La purification de l'ADN :

C'est connu que l'amplification peut être inhiber par différentes composantes : une mauvaise lyse des cellules, une trop grande quantité de composantes telles que les fragments des parois cellulaires, les polysaccharides, les composés phénoliques, les détergents, etc.

Dans l'expérimentation, l'amplification de l'ADN sans la purification a quand même donné des résultats, mais les bandes amplifiées étaient moins claires. La présence du pathogène pouvait tout de même se faire savoir, mais de façon moins évidente. Ceci est peut-être dû au fait que l'échantillonnage a été effectué avec des fruits verts, donc avec moins de polysaccharides et de composés phénoliques qu'avec les fruits rouges. La quantité de tissus utilisés était minime parce que l'échantillonnage se faisait à l'endroit le plus propice à la présence du champignon (le réceptacle). Ceci permet d'augmenter la concentration d'ADN du pathogène ou autrement dit, de moins diluer l'ADN du pathogène parmi de grande quantité d'ADN de fraisiers.

4.4 Conclusion

La technique développée est intéressante puisqu'elle permet de détecter de façon fiable la présence de *B. cinerea,* à un stade peu développer du fruit. Sachant que ce pathogène peut rapidement détruire de grande quantité de fruits à la récolte et en post récolte, il est

intéressant de connaître l'état de la situation dans le champ à l'aide de la technique d'amplification de l'ADN par la PCR pour obtenir des informations épidémiologiques afin de mieux contrôler la maladie et les pertes de rendement engendrées.

5. Références

Butt, D.J., Swait, A.A.J. et Robinson, J.D. 1985. Effects of fungicides on germination of apple and pear pollen. Ann. Appl. Biol. 106: 110-111.

Church, R.M. et Williams, R.R. 1977. The toxicity to apple pollen of several fungicides, as demonstrated by in vivo and in vitro techniques. J. Hort. sci. 52:429-436.

Eaton, G.W. 1961. Germination of sweet cherry (prunus avium L.) pollen in vitro as influenced by fungicides. Can. J. Plant. Sci. 41: 740-743.

Eaton, G.W. et Chen L.I.. 1969. The effect of captan on strawberry pollen germination. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94: 558-560.

Legge, A.P. et Williams, R.R.1975. Adverse effects of fungicidal sprays on the pollination of apple flowers. J. Hort. Sci. 50:275-277.

Mayer, D.F. et Lunden, J.D. 1986. Toxicity of fungicides and an acaricide to honey bees (Hymenoptera: Apidae)and their effects on bee foraging behavior and pollen viability on blooming apples and pears. Environ. entomol. 15: 1047-1049.

SECTION III
Lutte contre la Pourriture grise causée par le champignon pathogène *Botrytis cinerea* :
PÉRIODE D'APPLICATION DES FONGICIDES EN RELATION AVEC LA PHÉNOLOGIE DU PLANT DE FRAISE

Il est trop difficile de comprendre une situation complexe sans expliquer la situation et comment on pourrait en résoudre les problèmes. Alors, voilà le pourquoi des mises au point suivante.

1. Mise en situation

Mise en situation : Importance de la Pourriture grise des fruits au champ et chez les consommateurs.
(Note : nous traiterons surtout de la production de fraises. Mais beaucoup des observations scientifiques énoncées pourront aussi concerner la production de framboises qui est encore plus sensible aux attaques du phytopathogène *Botrytis cinerea* que la fraise).

La Pourriture grise des fruits (fraises et framboises) causée par le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, cause des pertes variables en champ chez les producteurs de fruits d'une année à l'autre, allant de 3 à 5 % de la récolte, à plus de 30 %. Les pertes varient selon l'âge de la culture (l'inoculum s'accroît d'une année l'autre), de la régie du producteur (le fauchage ou non du feuillage infecté par les maladies et infesté par les acariens et les insectes, et son enlèvement ou non du champ lors de la rénovation, etc…), et de ses interventions fongicides (le nombre et les moments des interventions). En plus les conditions climatiques saisonnières (périodes humides prolongées durant la floraison et durant la maturation de fruits) intensifient les risques de pourritures.
Il est normal que le producteur de fraises concentre tout ses efforts pour réduire ses pertes au champ; mais qu'advient-il des pertes en entrepôts, lors du transport et chez les consommateurs ?. Pas de statistiques officielles de pertes chez l'épicier ou chez les consommateurs, même si on sait qu'elles sont importantes : le lendemain de leur cueillette, les fruits laissés sur le comptoir commenceront à « moisir ». Ce n'est pas normal; un fruit sain ne pourrit pas aussi rapidement.

Ce champignon pathogène est endémique partout où la fraise est cultivée (USA, Ontario. etc.). Nos producteurs doivent trouver la meilleure stratégie pour le combattre, non seulement pour réduire ses **pertes au champs**, mais aussi pour en réduire **les pertes en entrepôt**, lors du transport et **chez les consommateurs**, pour mieux lutter contre la concurrence surtout américaine des fraise de Californie, en offrant un produit de conservation supérieure.

Conclusions :

Malgré les pertes au champ, les pertes en entrepôt chez le producteur, durant le transport, chez le grossiste ou chez l'épicier sont des aspects qui ont trop souvent été négligés par le passé. La concurrence pour un produit de qualité et de vie prolongée devient un atout majeure dans le marché à venir.

1.1 Pertes au champ

Les recherches américaines et canadiennes démontrent que plus de 60 % des pourritures des fruits au champ, surtout au moment de la récolte, proviennent de **l'infection des fleurs** par le champignon pathogène *Botrytis cinerea* : les spores (ou conidies) du champignon sont produites au printemps, sur les vielles feuille infectées l'année et l'automne précédents et contaminent les fleurs. Ces conidies, peu importent les conditions météorologiques, germent et pénètrent surtout par les étamines des fleurs, pour aller se loger sous les sépales dans les futurs fruits verts. Elles vont provoquer des **infections dites « latentes »,** c`est à dire sans symptômes visibles, et qui ne se manifesteront que plus tard, quand les fruits auront assez d`eau et de sucres lors de leur mûrissement, pour permettre au champignon de se développer et de faire pourrir le fruit, surtout si les conditions sont humides lors de la récolte.

1.2 Détection des infections latentes sur des fruits apparemment sains

Quand les phytopathologistes veulent vérifier si les fruits mûrs qui apparaissent sains, sont infectés ou non à l'intérieur (infections latentes), ils les désinfectent en surface (trempage dans l`alcool à 70 %, 10 secondes, suivi d'une minute de trempage dans l'eau de javel à 1 % et d'un bon rinçage à l'eau du robinet) pour s'assurer de détruire toutes contaminations extérieures par les conidies de *Botrytis* ou autres contaminants. Puis, les fruits sont déposés pour incubation en « chambres humides » à la température de la pièce (autour de 23^0C) durant 5 à 6 jours, pour stimuler la manifestation du champignon (moisissure et sporulation). Les fruits qui manifestent de la pourriture sont classifiés comme ayant des infections latentes (qui étaient invisibles lors de la cueillette).

Si, durant la récolte, les conditions au champ sont humides, elles font office de « chambres humides » comme en laboratoire, et les pourriture éclateront, créant des pertes variables d'une année à l'autre, dépendant de la protection fongicide qu'on aura assurée durant la floraison.

1.3 Pertes en entrepôt et chez les consommateurs

Si les fruits ayant des infections latentes ne pourrissent pas au champ, ils vont pourrir durant l'entreposage, le transport ou chez le consommateur. Leur durée de vie est « condamnée », c'est certain, à l'efficacité de la protection fongicide que le producteur leur aura donnée lors de la floraison. Il est évident, que selon les résultats obtenus dans ce projet, et exposés ci dessous, il faudrait reconsidérer la qualité et le nombre d'applications de fongicides durant la floraison.

2. Stratégie actuelle de lutte contre la Pourriture grise des fraises

Le guide de protection de la fraise publié par le CRAAQ et disponible sur le site Agri-Réseau du MAPAQ, recommande une application de fongicides après le dépaillage, (bouillie soufrée ou le fongicide BRAVO) pour diminuer la production d'inoculum par les vieilles feuilles infectées hivernées. Une autre application de fongicides est fortement recommandée au stade 10 % floraison (environ une fleur par grappe) et une troisième, au stade pleine floraison (environ 5 fleurs par hampe florale). Enfin, une troisième application en stade de floraison, pourrait être nécessaire sur les dernières fleurs, si le producteur désire en obtenir les fruits.

Selon la plupart des recommandations inscrites sur les étiquettes des produits homologués par l'ARLA, les applications systématiques de fongicides anti-botrytiques avant, pendant et après la période de floraison, sont recommandées généralement au 7 jours, et aux 4 à 5 jours « si les

conditions sont favorables à la maladie ». Ces conditions sont surtout basées sur la pluviométrie. Pour un producteur qui applique à la lettre ces recommandations, cela pourrait équivaloir à 7 applications et plus de fongicides par saison de production.

Questions sans réponses : Pourquoi des producteurs de fraises réussissent à contrôler aussi bien la Pourriture grise avec moins d'applications de fongicides que d'autres qui en utilisent plus? Sans avoir conduit expressément un protocole pour répondre à la question, les résultats qui suivent devraient nous éclairer.

3. Questions fondamentales auxquelles ce projet voudrait au moins partiellement répondre

En regard de la production, de la protection et de la conservation de fruits de qualité, plusieurs questions de recherches pratiques et économiques se posent :

1- La recherche a démontrée que plus de 60 % des pourriture de fruits à la récolte résultent des infections de *Botrytis* lors de la floraison (qui demeurent latentes dans les fruits). Mais y-a-t-il d'autres infections des fruits par *Botrytis* entre la période de floraison et la maturation des fruits? Si oui, quel en est son importance?

2- Présentement, devant ces évidences, nous recommandons au moins deux applications de fongicides anti-*Botrytis* durant la floraison : une au stade floraison 10 % (environ une fleur par grappe) et une autre au stade pleine floraison (environ 5 fleurs par grappe). Une troisième serait incitée si le producteur veut protéger les 10 % des dernières fleurs. Ces interventions ont-elles été prouvées vraiment efficaces ?

3- Comment peut-on prouver que les interventions fongicides durant la floraison diminuent réellement l'importance des infections latentes qui vont devenir responsables des pourritures en entrepôt, lors du transport, chez l'épicier et chez le consommateur?

4- Qu'arrive-t-il des fleurs qui ne sont pas protégées avec un fongicide, c'est-à-dire celles qui s'ouvrent entre le 10 % et le 50 % floraison, et les autres qui s'épanouissent entre le 50 % et la fin floraison? Portent-elles des infections latentes?

5- Est-t-il opportun d'intervenir avec des fongicides après la floraison, si on a pas idée de l'importance des infections qui pourraient advenir du stade fruit vert jusqu'au stade fruit mûr?

4. Expérimentation :

4.1 Essais préliminaires en serre

À quatre reprises, des contaminations de conidies de *Botrytis* furent réalisées en serre sur des lots de 30 à 50 fleurs de fraisiers du cultivar Seascape durant l'hiver 2005-2006. Ces contaminations furent réalisées à sec, avec des conidies prélevées, avec un petit pinceau, sur des cultures de *Botrytis* produites sur gélose PDA. Ces contaminations des fleurs ont toujours produit plus de 97 %

d'infections latentes sur les jeunes fruits verts (voir technique de la chambre humide au point III- 1.2 ci dessus) seulement 5 à 7 jours après la chute des pétales, même si le pourcentage d'humidité de la serre était de moins de 45 % RH.. Comme le rapporte la littérature, le pourcentage d'humidité à ce stade n'a donc pas d'importance sur l'infection des fleurs. Ces résultats surprenants, ont été aussi réalisés au champ (voir point 4.2 ci-dessous) pour vérifier ce qui pourrait aussi se produire en fraisières, chez les producteurs de fraises. (figure 2)

4.2 Essais en parcelles expérimentales

Pour répondre aux quelques questions posées précédemment, nous avons établi le protocole suivant :

Endroit : Ferme expérimentale de l'IRDA à Saint-Lambert de Lévis.

Cultivar de fraisiers : Seascape. Le choix de ce cultivar était important, puisqu'il nous donnait la possibilité d'obtenir une floraison sur une période prolongée (contrairement à un cultivar standard), et ainsi, nous permettre de répéter nos traitements fongicides à des temps différents ou sur de plus longues périodes, tout en obtenant les résultats désirés.

4.2.1 Protocole expérimental

4.2.1.1 Préparation des parcelles avant expérimentation

Six rang du cultivar Seascape espacés de 1.2 mètres furent plantés sur billons d'un mètre de large sur 60 mètres de longueur, plastifiés avec un film plastique noir. Chaque billon intégrait trois rangées de plants transplantés en quinconces et espacés de 20 cm sur le rang pour assurer une bonne densité des plants.

Un contrôle de l'irrigation et de la fertilisation était assuré par la présence d'un système permettant, sous le film plastique, l'irrigation gouttes à gouttes desservie par deux tuyaux par billon. La majorité des plants provenait du producteur Louis Gosselin, des Fraises de l'Ile d'Orléans inc.

Avant d'appliquer le protocole expérimental ci-dessous au mois d'août 2005, sur une fraisière bien établie depuis mai 2005, les actions suivantes furent réalisées.

a) Deux semaines avant les traitements, les parcelles furent contaminées par des fruits infectés de *Botrytis* sporulant, déposés au hasard, sur le film plastique, au nombre de 4 par mètre carré, afin d'imiter la présence d'un inoculum « naturel ».

b) Toutes les parcelles, exceptées celles des témoins (traitement 1) contaminées de façon dite « naturelle », soit les traitements 2, 3, 4, 5 et 6 furent pulvérisée avec une suspension de conidies de *Botrytis* à la concentration de $1{,}4 \times 10^5$ conidies par ml de suspension, afin d'uniformiser l'inoculum.

c) Le matin de la journée prévue pour l'application des traitements, **tous les fruits verts ou mûrs furent éliminés** des parcelles et toutes les fleurs présentes furent identifiées avec un ruban gommé jaune attaché à leur pédicelle (figure 4). Cette opération d'identification des fleurs, fut

répétée une deuxième fois, 15 jours plus tard, avec des rubans de couleur orange. Il faut préciser que les fleurs apparues après chacune de ces identifications n'ont pas nécessité d'identification puisqu'elles étaient les seules sans rubans.

d) Les traitements fongicides ci-dessous furent appliqués 4 heures après l'application de la suspension de l'inoculum, pour permettre à la suspension de sécher après son application afin de pouvoir vérifier l'effet protecteur des fongicides contre la contamination des fleurs par *Botrytis.* Ils furent appliqués avec un pulvérisateur à dos conventionnel, avec un débit de 1000L/ha.

4.2.1.2 Traitements appliqués en parcelles afin de vérifier l'efficacité des fongicides pulvérisés lors de la floraison, sur le pourcentage d'infections latentes des fruits

Les 6 traitements suivants furent appliqués 4 heures après la pulvérisation de la suspension conidienne de *Botrytis,* sur des parcelles de 6 mètres de longueur disposées au hasard, en 4 blocs casualisés.

1- Témoin #1: parcelles sans traitement fongicide, exposé à l'inoculum dit « naturel »

2 -Parcelles traitées avec du Captane (CAPTAN 80WDG), 3.5kg/1000L/ha

3- Parcelles traitées au LANCE (Boscalid), 0,560kg/1000L/ha

4- Parcelles traitées comme en 3

5- Parcelles traitées comme en 3 et 4

6- Témoin`#2 : parcelles inoculées avec la suspension de conidies de *Botrytis*, mais non traitée avec un fongicide.

<u>Notes importantes</u> :

a) Nous avions prévu une applications de Boscalid aux parcelles 3, 2 applications aux parcelles 4, et 3 applications aux parcelles 5, comme elles auraient pu être réalisées en période de floraison sur des cultivars conventionnels (10 %, 50 % et fin de floraison). Comme nous avions un cultivar à jour neutre, ce n'était pas possible. Nous avons quand même décidé de conserver les traitements identiques 3, 4 et 5.

b) Comme il est recommandé d'intervenir contre la Pourriture grise avec un fongicide, à 10 % de floraison et à la pleine floraison (50 % de floraison), nous avons voulu savoir ce qui se passait du point de vue « infections latentes », entre ces périodes, sur les fleurs qui apparaîtraient et ne recevraient pas de traitements fongicides. Nous avons donc prélevé les fruits verts issus de ces fleurs non traités avec un fongicide durant les deux « vagues » de fleurs (voir rapport statistique préparé par Michèle Grenier, au point III-5

4.2.1.3 Cueillette et traitements des fruits récoltés

Les infections latentes de *Botrytis* sont toujours estimées sur les fruits mûrs. Si on veut vérifier l'efficacité des fongicides sur les infections des fleurs provoquant les infections latentes, dites si importantes à la maturation des fruits, pourquoi ne pas les estimer sur de jeunes fruits verts le plus tôt possible après la chute des pétales? **Plus ces estimations seront rapprochées de la floraison, plus elles représenteront ce qui se passe vraiment à la floraison, traitement fongicide ou pas.** C'est précisément ce que nous avons réalisé au cours des essais décrits ci-dessous.

Les essais furent réalisés à **deux périodes** : le premier essai, que nous appellerons le premier groupe de fleurs, fut réalisé alors que les conditions météorologiques étaient **peu humides**, tandis que le deuxième essai fut réalisé sur une deuxième vague de floraison où les conditions ont été **pluvieuses**. Ceci nous permettait de donner plus d'impact à notre recherche, soit, de valider entre eux les essais et, de simultanément confirmer l'importance des conditions météorologiques sur le développement de la Pourriture grise.

Contrairement aux fruits mûrs contenant beaucoup d'eau et de sucres, ce qui permet aux infections latentes de s'exprimer après 5 jours en chambre humide, les jeunes fruits verts contiennent peu d'eau et de sucres. Nous avons donc du, au cours de plusieurs essais, mettre au point une durée d'incubation optimale à 23 °C, pour que les jeunes fruits verts en chambre humide expriment leurs infections latentes, après leur stérilisation superficielle (point III-1.2). Cette durée en chambre humide fut établie à 15 jours.

5. Résultats et traitements statistiques

Les résultats obtenus furent confiés pour analyse, à madame Michèle Grenier, Biostatisticienne à l'IRDA. Son rapport apparaît ci-dessous :

Titre : Essais des fongicides LANCE (Boscalid) et CAPTAN 80 WDG (Captane) pour la suppression de Botrytis sur les fraises

5.1 Objectif

Déterminer les effets des applications sur les fleurs de fraisiers, des fongicides CAPTAN 80 WDG (Captane) et LANCE (Boscalid), sur l'incidence des infections latentes de *Botrytis* sur les jeunes fruits verts issus de ces fleurs traitées.

5.2 Description du plan d'expérience

Pour cette expérience au champ, on a utilisé un plan à blocs aléatoires complets avec 4 blocs et 6 traitements par blocs. Les traitements se décrivent ainsi :

1 - Fleurs non pulvérisées avec une suspension conidienne de *Botrytis* (contamination naturelle) et non traitées au fongicide (Témoin 1).

2 - Fleurs pulvérisées avec une suspension conidienne de *Botrytis* ($1{,}4 \times 10^5$ conidies/ml) et traitées avec le CAPTAN 80 WDG (Captane) 4 heures plus tard.

3, 4 et 5 - Fleurs pulvérisées avec la suspension conidienne de *Botrytis* et traitées avec le LANCE (Boscalid) 4 heures plus tard.

6 – Fleurs pulvérisées avec la suspension conidienne de *Botrytis* et non traitées au fongicide (témoin 2).

Au jour 1, 15 fleurs ont été identifiées avec un ruban dans chaque parcelle. Un des 6 traitements a été appliqué aux 15 fleurs d'une même parcelle. Les jeunes fruits verts issus des fleurs traitées ont été récoltés 7 jours plus tard (figure 5) et l'évaluation de la présence de *Botrytis* a été réalisée après 15 jours d'incubation en chambre humide. On considère que cette première évaluation représente l'observation au **temps 1**.

Les fleurs produites à partir du lendemain du jour 1 jusqu'au cinquième jour après l'application des traitements ont également été identifiées, mais n'ont subit aucune inoculation artificielle ni traitement au fongicide. Les fruits verts issus de ces fleurs ont été récoltés au même stade que précédemment et la présence de *Botrytis* a été évaluée en chambre humide, de la même façon que précédemment. Cette deuxième évaluation constitue l'observation au **temps 2**.

L'essai complet tel qu'il vient d'être décrit a été répété sur un deuxième groupe de fleurs un peu plus tard, dans les mêmes parcelles. Une évaluation de la présence de *Botrytis* a été effectuée dans un premier temps sur les fraises issues des fleurs traitées et, dans un deuxième temps, sur les fraises issues des fleurs non traitées, tout comme sur le premier groupe de fleurs. On considère que ces évaluations sur les fleurs du deuxième groupe sont les observations aux **temps 3 et 4.**

Les observations aux temps 1, 2, 3 et 4 dans les mêmes parcelles constituent des mesures répétées. Elles sont corrélées et on doit en tenir compte dans l'analyse statistique.

5.3 Méthode statistique

L'effet des traitements sur le taux de fruits infectés a pu être analysé à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte, en utilisant la fonction logit:

$$\log\left(\frac{\pi_{ijk}}{1-\pi_{ijk}}\right) = \mu + F_i + b_k + (Fb)_{ik} + T_j + (FT)_{ij}$$

où :
π_{ijk} est la probabilité qu'un fruit du bloc k soumis au traitement i soit infecté au temps d'observation j
μ est un paramètre de référence
F_i est l'effet du traitement i, i = 1, 2, …, 6
b_k est l'effet aléatoire du bloc k, k = 1, 2, 3, 4
$(Fb)_{ik}$ est l'effet aléatoire du bloc k pour le traitement i
T_j est l'effet du temps d'observation j, j = 1, 2, 3 ou 4
$(FT)_{ij}$ est l'effet de l'interaction entre le traitement i et le temps d'observation j

Pour ce modèle, on suppose que le vecteur des effets aléatoires des blocs

$\boldsymbol{b} = [b_1\ b_2\ b_3\ b_4]'$ est distribué $N(\boldsymbol{0}, \boldsymbol{I}\sigma_b^2)$, où $\boldsymbol{0}$ représente un vecteur nul de longueur 4 et $\boldsymbol{I}$ représente la matrice identité de dimension 4 × 4, et que le vecteur des effets aléatoires de l'interaction $\boldsymbol{Fb}$ =

$[(Fb)_{11}\ (Fb)_{12}\ (Fb)_{13}\ (Fb)_{14}\ldots\ (Fb)_{63}\ (Fb)_{641}]'$ est distribué $N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_{Fb}^2)$, où $\mathbf{0}$ représente un vecteur nul de longueur 24 et $\mathbf{I}$ représente la matrice identité de dimension 24 × 24. De plus, on suppose que les vecteurs $\mathbf{b}$ et $\mathbf{Fb}$ sont mutuellement indépendants. La distribution de la variable réponse, le nombre de fruits infectés dans la parcelle *ijk*, conditionnellement aux effets aléatoires, suit une loi binomiale de paramètre π_{ijk}. Les dénombrements des fruits infectés à des temps successifs dans une même parcelle constituent des mesures répétées et ne sont pas des observations indépendantes. On doit tenir compte des corrélations entre ces observations dans le modèle en spécifiant une matrice de variance-covariance pour les erreurs. L'ajustement d'un tel modèle a été possible avec la procédure GLIMMIX de SAS (version 9.1). Une analyse graphique des résidus a été effectuée afin de s'assurer que les postulats du modèle étaient bien respectés.

Les modèles linéaires généralisés mixtes et l'utilisation de GLIMMIX sont décrits dans le chapitre 11 de Littell *et al.*

5.4 Résultats

Au temps 4, presque tous les fruits étaient infectés. Seulement 8 fruits parmi les 360, répartis dans plusieurs parcelles, n'étaient pas atteints. Cela a causé des problèmes de convergence pour l'ajustement du modèle. Le temps 4 n'a donc pas été considéré pour l'analyse. Comme les composantes de variances attribuables aux effets aléatoires des blocs (σ_b^2 et σ_{Fb}^2) étaient négligeables, on a pu réduire la partie aléatoire du modèle. Une matrice de variance-covariance de type UN (structure la plus générale) a été ajustée pour modéliser les corrélations entre les erreurs du modèle avec mesures répétées.

Les facteurs temps et traitements ont un effet très significatif sur le logit $\log[(\pi_{ijk}/(1-\pi_{ijk})]$, avec des seuils observés de P < 0,0001 et P = 0,0033 respectivement (Tableau 3). L'interaction est aussi très significative (P = 0,0005), ce qui veut dire que les traitements ne se distinguent pas de la même façon à tous les temps d'observation. On peut facilement visualiser cette interaction à l'aide d'un graphique (Figure 2). Nous devons donc comparer les traitements à chaque temps d'observation.

Tableau 3 : Résultats des tests sur les effets fixes

Tests sur les effets fixes (F= statistique de Wald/rang k)				
	Degrés de liberté (numérateur)	**Degrés de liberté (dénominateur)**	**Valeur de F**	**Pr > F**
TRAIT	5	18	22,79	<,0001
TEMPS	2	18	8,01	0,0033
TRAIT*TEMPS	10	18	6,05	0,0005

Les moyennes des traitements par temps ont été calculées à l'aide de l'énoncé ESTIMATE. Comme les traitements 3, 4 et 5 correspondent tous au traitement LANCE, une moyenne de ces 3 traitements a été calculée. Les moyennes et erreurs types sur les logit et les intervalles de confiance sur les taux moyens de fruits infectés sont présentés dans le tableau 4).

Tableau 4 : Estimateurs des logit, erreurs types, taux moyens de fruits infectés et bornes de l'intervalle de confiance à 95 % pour le taux moyens, par traitement et par temps.

TRAIT	TEMPS	Estimateur du logit	Erreur type sur le logit	Taux moyen de plants infectés	Borne inférieure du taux	Borne supérieure du taux
TEMOIN 1	1	1,4939	0,3816	0,8167	0,6664	0,9085
TEMOIN 1	2	0,6190	0,2654	0,6500	0,5154	0,7643
TEMOIN 1	3	2,0244	0,3781	0,8833	0,7738	0,9437
CAPTAN	1	-1,7346	0,4135	0,1500	0,06892	0,2961
CAPTAN	2	0,5465	0,2627	0,6333	0,4987	0,7500
CAPTAN	3	-0,6931	0,2575	0,3333	0,2255	0,4620
LANCE	1	-0,9648	0,1919	0,2759	0,2029	0,3632
LANCE	2	0,5540	0,1530	0,6351	0,5579	0,7059
LANCE	3	-0,1339	0,1407	0,4666	0,3942	0,5403
TEMOIN 2	1	3,3673	0,8226	0,9667	0,8374	0,9939
TEMOIN 2	2	2,9444	0,5808	0,9500	0,8487	0,9847
TEMOIN 2	3	2,9444	0,5569	0,9500	0,8550	0,9839

.

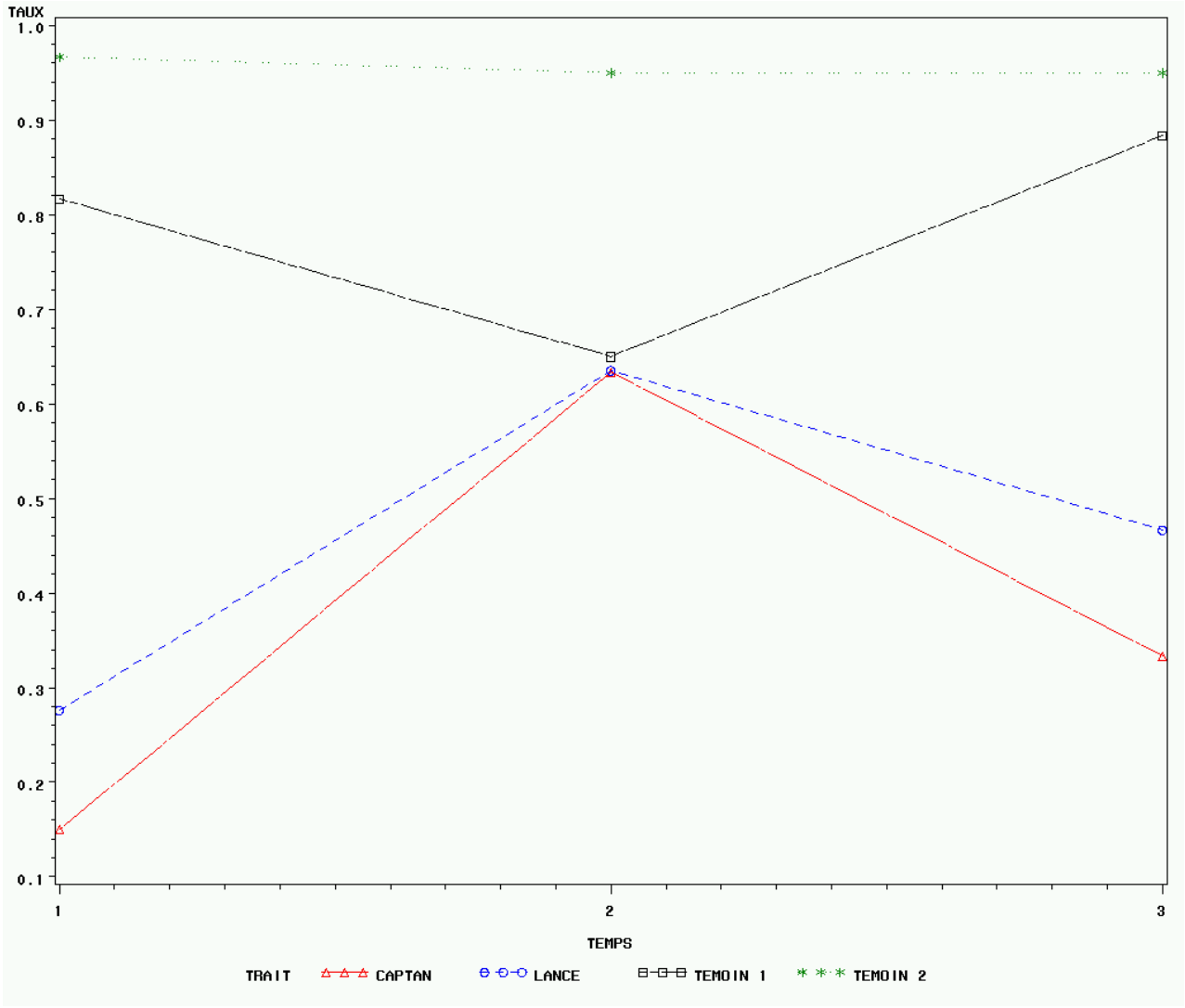

Figure 2 : Graphique des taux moyens de fruits infectés, par traitement et par temps d'observation

Les taux de fruits infectés des parcelles traitées au CAPTAN 80 WDG et au LANCE sont inférieurs à ceux des parcelles témoins 1 et 2 et ces différences sont très significatives à tous les temps, sauf pour le temps 2 où les taux moyens des parcelles traitées ne sont pas significativement inférieurs à ceux des parcelles témoins 1 (moyennes, tableau 4 et contrastes, tableau 5). L'application des traitements aux premières fleurs n'a donc pas été aussi bénéfique pour les fleurs non traitées apparues plus tard. Ceci est aussi vrai pour la deuxième répétition. Le temps 4, correspondant aux observations sur les fraises issues des fleurs non traitées de la deuxième répétition de l'essai, n'est pas inclus dans cette analyse statistique, mais presque toutes les fraises étaient infectées à cette étape. D'autre part, aucune différence significative n'est détectée entre les deux traitements LANCE et CAPTAN 80 WDG, quel que soit le temps d'observation.

Tableau 5 : Contraste et valeur du test t

Contraste	Valeur du test t	Pr > |t|
TEMPS=1, TÉMOIN_1 VS CAPTAN	5,74	<,0001
TEMPS=2, TÉMOIN_1 VS CAPTAN	0,19	0,8482
TEMPS=3, TÉMOIN_1 VS CAPTAN	5,94	<,0001
TEMPS=1, TÉMOIN_1 VS LANCE	5,76	<,0001
TEMPS=2, TÉMOIN_1 VS LANCE	0,21	0,8343
TEMPS=3, TÉMOIN_1 VS LANCE	5,35	<,0001
TEMPS=1, TÉMOIN_1 VS TÉMOIN_2	-2,07	0,0535
TEMPS=2, TÉMOIN_1 VS TÉMOIN_2	-3,64	0,0019
TEMPS=3, TÉMOIN_1 VS TÉMOIN_2	-1,37	0,1885
TEMPS=1, CAPTAN VS LANCE	-1,69	0,1086
TEMPS=2, CAPTAN VS LANCE	-0,02	0,9806
TEMPS=3, CAPTAN VS LANCE	-1,91	0,0728
TEMPS=1, CAPTAN VS TÉMOIN_2	-5,54	<,0001
TEMPS=2, CAPTAN VS TÉMOIN_2	-3,76	0,0014
TEMPS=3, CAPTAN VS TÉMOIN_2	-5,93	<,0001
TEMPS=1, TÉMOIN_2 VS LANCE	5,13	<,0001
TEMPS=2, TÉMOIN_2 VS LANCE	3,98	0,0009
TEMPS=3, TÉMOIN_2 VS LANCE	5,36	<,0001

Note : Le nombre de degrés de liberté est de 18 pour tous les contrastes.

5.5 Référence

Littell, Ramon C., Milliken, George A., Stroup, Walter W., and Wolfinger, Russel D., SAS ® System for Mixed Models, Cary, NC : SAS Institute Inc., 1996.

Annexe

Tous les fichiers de ce projet se situent dans le répertoire de travail :

C:\Documents and Settings\Michele Grenier\Mes documents\IRDA\PO_Thibodeau\fraisiers avr2006

Description des fichiers :

CH. HUMIDES RÉSULTATS.xls : fichiers de données brutes EXCEL.

fraises.sas7bdat : Jeu de données permanent SAS.

FRAISIERS LANCE CAPTAN.sas : Programme SAS pour l'analyse avec GLIMMIX.

RÉSULTATS FIN.DOC : Résultats de l'exécution du programme SAS.

Rapport fraisiers 2006.doc : Version électronique de ce rapport.

Tableau 6: Pourcentage d'infections latentes retrouvés pour les jeunes fruits verts (moyennes de 60 fruits 15/parcelle et 4 répétitions)

Traitements	1er groupe de fleurs		2e groupe de fleurs	
	1[1]	2[2]	3[3]	4[4]
#1 Témoin naturel	81,6	65,0	88,3	96,6
#2 Captane	15,0	63,3	33,3	100,0
#3 Boscalid	27,0	63,5	46,6	96,6
#4 Témoin inoculé	96,6	95,0	95,0	100,0

1[1] : Premier groupe de fleurs traitées avec fongicides dont les jeunes fruits verts furent récoltés 7 jours plus tard

2[2] : Fruits verts provenant des fleurs non traitées et apparues durant les cinq jours suivant les fleurs traitées en 1[1]

3[3] : Deuxième groupe de fleurs traitées avec fongicides dont les jeunes fruits verts furent récoltés 7 jours plus tard.

4[4] : Fruits verts provenant des fleurs non traitées et apparues durant les cinq jours suivant les fleurs traitées en 3[3]

Ce tableau résume les résultats exprimés dans les figures et tableaux précédents. Le traitement #3 est une moyenne des traitements 3, 4, et 5 identiques précédents (traitement au Boscalid), et le #4 correspond au traitement 6 précédent (Témoin inoculé et non traité aux fongicides).

6. Conclusions et recommandations

1- Seulement 7 jours après l'apparition des fleurs, les tout jeunes fruits verts provenant des fleurs non traitées avec un fongicide durant la floraison « témoins # 1 et #4» ont un pourcentage élevé d'infections latentes (tableau 6, colonne 1 et 3). Ceci démontre que :
   a) Les infections latentes retrouvées sur les jeunes fruits verts proviennent bien des infections des fleurs par *Botrytis*.
   b) Le pourcentage d'infections latentes peut être très élevé si les fleurs ne sont pas protégées avec un fongicide.

2- L'application de fongicides sur les fleurs (ici le Captane et le Boscalid) est **très efficace** pour réduire, au stade de jeunes fruits verts, l'incidence des infections latentes causées par *Botrytis.* Les 15 et 27 % d'infections latentes des traitements 2 et 3 (colonne 1)pourraient être expliqués par :

a) La pulvérisation des fongicides n'a pas atteint toutes les fleurs, donc n'a pu toutes les protéger.
b) Un certain nombre de fleurs étaient peuvent déjà être infectées avant la pulvérisation. La durée de vie des fleurs varie de 3 à 4 jours selon que les températures sont plus ou moins élevées. Au moment de la pulvérisation, certaines fleurs devaient déjà être ouvertes depuis un à deux jours au moins, et des infections pouvaient donc avoir eu lieu. Les fongicides utilisés n'étaient pas systémiques, donc ne pouvaient enrayer ces infections.

3- Tel que révélé dans les résultats, les fruits verts issus des fleurs qui sont apparues après les traitements, et qui n'avaient donc pas reçu de fongicides, ont un pourcentage d'infections latentes de près de 65 % (tableau 6, colonne 2). Ceci nous permet de penser que cette situation se produit aussi en fraisières des producteurs pour les fruits issus des fleurs qui n'ont pas reçues de fongicides et qui sont apparues entre les stades de 10 % à 50 % de floraison, ou entre le 50 % et les dernières fleurs.

Comme la durée de chaque fleur est de 3 à 4 jours et que la période de floraison est d'environ 15 jours,

a) Il faudrait pour bien protéger les fleurs durant la période de floraison, faire quatre applications de fongicides (une aux quatre jours) au lieu de deux ou trois tel que recommandé actuellement.
b) Si, comme nous le croyons, cette recommandation est nécessaire, il sera encore plus important de n'utiliser que des fongicides les moins nocifs au pollen, et aux pollinisateurs car leur impact sur la bonne pollinisation des fruits sera encore plus important.

4- Il est aussi évident que sous des conditions plus humides, l'efficacité des fongicides est moindre (tableau 6, colonne 3).
a) l'inoculum peut être plus important
b) les fongicides sont délavés par les pluies.

Ceci remet en question le moment d'application des fongicides pour en assurer l'efficacité: avant ou après la pluie. De toute apparence, leur efficacité serait meilleure après la pluie.

5- Nous n'avons pu vérifier si des infections latentes additionnelles ont lieu sur les fruits entre le stade début fruit vert et le stade fruit mûr, car le gel est venu interrompre les essais avant la maturation des fruits.

Avec un pourcentage aussi important d'infections latentes des fruits verts provenant des fleurs non traitées (témoins et fleurs ouvertes après les traitements, tableau 6, colonnes 2 et 4) on peut sérieusement se demander si les applications de fongicides avant et après la floraison sont vraiment nécessaires.

6- La détection hâtive des infections latentes de *Botrytis* sur jeunes fruits verts est une première au Québec. Elle indique au producteur l'état sanitaire de sa future récolte, et le danger de pertes potentielles au champ lors de la récolte, surtout si l'humidité est importante à cette période.

Trop souvent les producteurs sont surtout préoccupés que des pertes au champ. Si le pourcentage d'infections latentes est peu élevé, non seulement il pourra espérer peu de

*pertes à la récolte, mais il pourra compter sur des fruits de **qualité** qui se conserveront plus longtemps en entrepôt, lors du transport et aussi à l'épicerie et chez le consommateur.*

La technique en chambre humide est fiable et peu coûteuse si elle est utilisée sur les très jeunes fruits verts. En effet, sur les1 440 fruits verts analysés, nous n'avons observé aucune contamination par *Rhizopus*. Ce champignon pathogène qui cause la moisissure chevelue est souvent présente à plus de 30 % sur les fruits mûrs incubés en chambre humide. Il pousse beaucoup plus rapidement que *Botrytis* et en masque donc sa présence. Les résultats obtenus sur fruits mûrs sont donc approximatifs. Il faut alors utiliser la technique dite PCR (qui est très coûteuse) pour obtenir des résultats fiables.

7. Assurer la continuité

En regard des résultats prometteurs obtenus dans ce projet, il faut :

1- **Confirmer en fraisières de producteurs**, l'impact des applications de fongicides sur les fleurs lors de la floraison (nombre d'applications, pourcentage d'infections latentes au stade jeunes fruits verts et au stade fruits mûrs, pourcentage de pourriture à la récolte, durée de conservation des fruits chez l'épicier, chez le consommateur…). Cette confirmation améliorerait la régie de la lutte contre la Pourriture grise, réduirait les coûts de production en diminuant le nombre d'interventions fongicides, le pourcentage de pertes à la récolte etc…

2- Vérifier les mêmes hypothèses mentionnées ci-dessus en framboisières. Il est réaliste de penser que les mêmes conditions s'appliquent aussi pour la framboise.

Figure 3 : Essai préliminaire d'inoculation des fleurs en serre avec Botrytis cinerea. Récolte des fruits verts 10 à 14 jours après floraison et enlèvement des sépales avant la désinfection superficielle et la mise des fruits en chambre humide pour la détection des infections latentes

Figure 4 : Fleurs individuelles inoculées, traitées ou non et identifiés par des rubans collants

Figure 5 : Récolte des fruits verts 7 jours après l'inoculation et les traitements

SECTION IV : MISE AU POINT DU DISTRIBUTEUR

1. Étapes du développement du distributeur monté sur une ruche standard

Le développement du distributeur de fongicides a été réalisé par Émile Houle, technicien apicole du CRSAD. Le premier modèle de distributeur construit a été inspiré des prototypes élaborés par Kovach 2000 et Gross *et al*. 1994 et modifié pour nos besoins personnels. La particularité du modèle conçu dans le cadre du présent projet est qu'il permet la séparation des entrées et des sorties des abeilles (figure 6). Les matériaux utilisés étaient l'aluminium et le plexiglass. Suite au développement de chaque prototype, le distributeur était posé sur une ruche et des observations visuelles réalisées pour permettre de vérifier son efficacité. L'appareil était alors retiré pour faire les modifications requises. Quatre différents prototypes ont été testés avant d'arriver à la version finale utilisée en 2004.

Un petit distributeur de fongicides ajustable à une ruchette de boudons à également été mis au point par M. Houle. Ce distributeur est destiné à faire des tests en serre sur la distribution des fongicides et pourrait servir au champ.

Quoique nous ayons été satisfaits du fonctionnement de la dernière version du distributeur Houle utilisé en 2004, quelques petits ajustements ont été effectués en 2005, particulièrement à l'égard du matériel utilisé pour sa fabrication

Les nouveaux appareils sont fabriqués complètement en tôle pliée. Leur construction est donc plus rapide. De plus, des perforations ont été ajoutées sur les cotés pour éviter la condensation interne. Une nouvelle conception du design de l'appareil permet maintenant une plus grande facilité de son nettoyage (figures 7 et 8). L'appareil s'ajuste bien à l'entrée de la ruche et le récipient à fongicide (tiroir) s'enlève et se replace aisément afin de permettre de le remplir facilement lorsqu'il est vide.

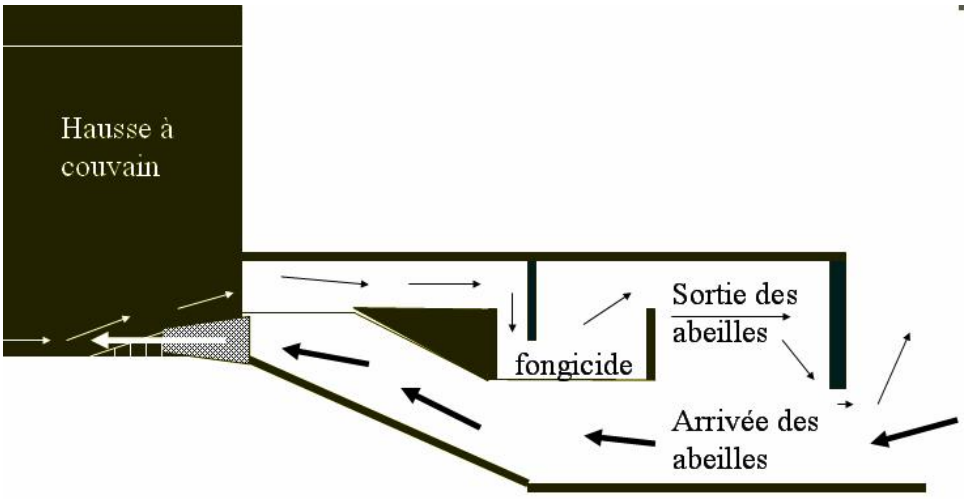

Figure 6 : Conception du distributeur permettant une séparation des entrées et des sorties (Dessin par Jocelyn Boulianne)

Figure 7 : Distributeur Houle inséré sur une ruche

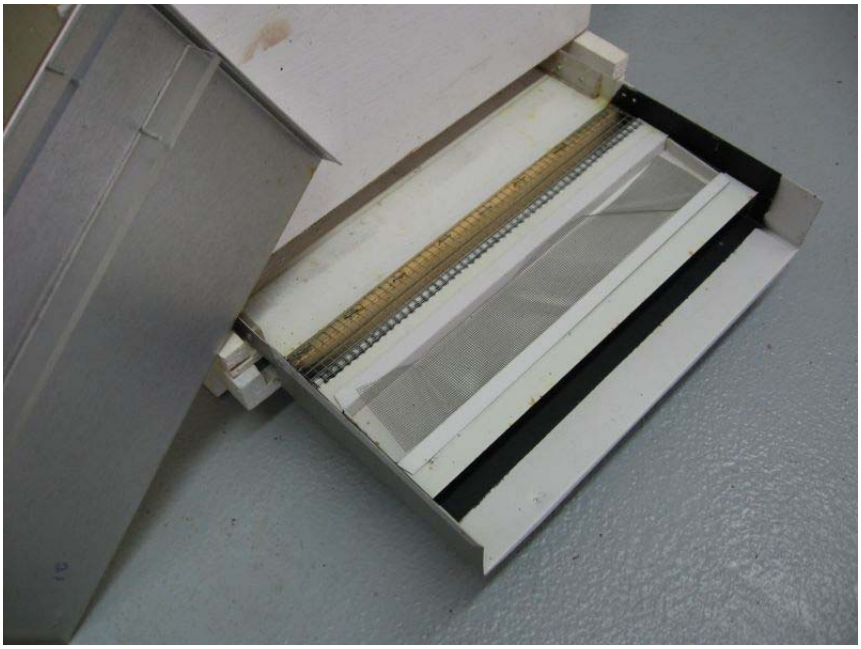

Figure 8 : Vue intérieure du distributeur Houle

2. Recommandations pour la méthode d'application à partir du distributeur monté sur une ruche

2.1 Humidité, condensation et emplacement des ruches

Durant la première année d'expérimentation nous avons eu beaucoup de problème de condensation à l'intérieur du distributeur. L'humidité accumulée dans la ruche durant la nuit avait de la difficulté à s'évaporer vers le dehors, à cause de la présence du distributeur. Le résultat était que, au matin, cette humidité se condensait sur les parois supérieures du distributeur et des gouttelettes d'eau ainsi formées tombaient dans la poudre fongicide, formant une sorte de boue non distribuable par les abeilles. Ce problème a été partiellement résolu par l'ajout de perforations sur les coté du distributeur, tel que mentionné au point 1 de la présente section.

Cependant, une série d'essais effectués durant l'été 2005 nous ont permis de conclure que l'emplacement des ruches au lever du soleil pouvait aussi entrer en jeux. Effectivement, les ruches exposées au soleil tôt le matin étaient moins enclin à former de la condensation que les ruches situées à l'ombre. Il est donc recommandé de prendre ce facteur en considération lors de l'utilisation des distributeurs sur les ruches.

2.2 Quantité de fongicides ou autres produits

La quantité de fongicides est importante car avec trop de produit, il peut y avoir perte par compaction et encroûtage. Trop peu de produit risque de nuire à l'efficacité de la méthode. Dans le cadre de ce projet, les fongicides utilisés étaient remplacés à tous les jours. Le produit restant était pesé et sa qualité (poudre ou croûte) notée. Nos résultats font ressortir qu'environ 5 grammes de produit ne sont pas distribués par les abeilles, mais reste plutôt collé au fond du tiroir du distributeur sous forme de croûte. La condensation ou un temps pluvieux empire ce problème.

Nos essais nous permettent donc de recommander l'étalement uniforme d'environ 15 à 20 grammes du produit à disperser au fond du tiroir prévu à cet effet. Un grillage moustiquaire placé au fond du tiroir permet au produit de rester en place.Le produit doit être remplacé à tous les jours, ou au plus, à tous les deux jours. Dans ce dernier cas, une quantité pouvant aller jusqu'à 25 grammes est acceptable.

2.3 Caractéristiques du produit à disperser à l'aide de l'appareil

Afin de s'assurer que la présence des fongicides dans le distributeur n'avait pas de conséquences néfastes à long terme sur la colonie, des tests ont été effectués dans de cadre de l'objectif du projet qui visait à vérifier tous les impacts de la distribution des fongicides sur les abeilles. Il a été démontré que la grosseur particulaire du produit à disperser est critique pour la santé de la colonie d'abeilles qui est en contact directe avec ce produit lors de sa dispersion. Les caractéristiques physico-chimiques recommandables pour un produit qui serait utilisé avec le distributeur sont discutées dans la Section VI.

3. Conclusions

Les entrées et sorties des abeilles ne sont pas gênées par ce distributeur. Il faut placer les ruches dans un endroit ensoleillé le matin pour minimiser la condensation de l'humidité et conséquemment l'encroûtage des produit à disperser. Il est important de tenir compte des caractéristiques physico-chimiques des produits à utiliser avec le distributeur, pour ne pas nuire à la santé des abeilles. Le CRSAD possède maintenant 24 de ces distributeurs qui sont disponibles pour d'autres projets de distribution d'agents de lutte pour la phytoprotection des cultures ou bien pour des projets de mise au point technique.

SECTION V
DISTRIBUTION DU FONGICIDE SUR LES FLEURS

1. Introduction

Deux essais ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité des pollinisateurs (*Apis mellifera* et *Bombus impatiens*) dans la dispersion d'un agent en lutte biologique, *Trichoderma harzianum* . Dans les deux essais nous avons utilisé des distributeurs conçus et construits par Émile Houle, technicien et membre actif du projet de recherches. Les deux distributeurs, un fois chargés de *Trichoderma* (ROOTSCHIELD drench), ont été installés à l'entrée des ruches permettant l'inoculation des pollinisateurs lors de leur sortie.

Les distributeurs utilisés dans la ruche d'abeilles diffèrent nécessairement de ceux utilisés dans les ruches de bourdons étant donné les caractéristiques spécifiques de chacun des types d'habitacle.

La réalisation du deuxième essai a exigé un pré-essai où le distributeur fut adapté pour la ruchette de bourdons et testé. Le pré-essai fut effectué dans la même serre que l'essai no. 2.; la ruchette utilisée avait servi auparavant dans la pollinisation des canneberges. Ce pré-essai était un de grande importance car il a permis à l'équipe d'améliorer les distributeurs utilisés et comprendre certains aspects importants qui assurent leur bon fonctionnement : 1) Les distributeurs doivent être placés sur des ruchettes de bourdons jeunes et sans expérience dans d'autres culture et doivent être installés dès la 1re journée de l'ouverture de la ruchette; cela afin d'assurer la meilleure adaptation des insectes aux distributeurs installés sur les ruchettes; 2) ces distributeurs doivent avoir un orifice pour l'entrée indépendant de celui pour la sortie. On prévient ainsi le passage d'individus par l'endroit où se trouve *Trichoderma*. Ceci permet d'éviter l'entrée de l'inoculum vers l'intérieur de la ruche. Cette mesure s'est avérée aussi utile en facilitant l'entrée et la sortie des insectes des ruchettes. Dans le deuxième test (essai) nous avons procédé à quelques modifications à partir du modèle original du distributeur, basés sur les informations acquises dans le pré-essai. Ainsi, une entrée et une sortie indépendantes y ont été installées. De plus, nous avons utilisée une nouvelle ruchette de bourdons sur laquelle nous avons installé le distributeur dès l'ouverture de celle-ci.

Dans les travaux de laboratoire, plusieurs essais préliminaires ont été réalisés en vue de développer un milieux sélectif mieux adapté à la souche de *Trichoderma* utilisée dans la formulation du fongicide ROOTSCHIELD-drench, afin de permettre de quantifier le nombre de colonies de *Trichoderma* présentes dans les échantillons cueillis en champs (fleurs et insectes). Ayant réalisé que le milieu sélectif utilisé par le Dr J.Kovach était néfaste pour la formulation de *Trichoderma* utilisée, à cause de la concentration de Captane prévue dans le milieu, diverses concentrations de 12 fongicides ont été essayés pour s'assurer que notre souche de *Trichoderma* était bien celle détectée sur gélose.

Basé sur ces essais préliminaires, coordonnés par Pierre-O. Thibodeau à l'IRDA, un nouveau milieu sélectif pour *Trichoderma* a été sélectionné (figure 9). Le développement de ce nouveau milieu de culture a été un processus long qui a pris un mois de travail intensif au laboratoire de l'IRDA (figure 10). Les modifications apportées au milieu original, celui de

Smith *et al.* (1990), nous ont permis d'obtenir de meilleurs résultats, c'est-à-dire du milieu de cultures sans contaminations par autres fongi et, en conséquence, une meilleure détection des colonies de *Trichoderma*.

L'objectif principal des deux essais ne consistait pas à comparer directement les résultats de ces essais car ils ont été effectués en conditions différentes (champ/serre; zones différentes, etc.) et avec des distributeurs nécessairement distincts, mais plutôt, confirmer l'inoculation des insectes et des fleurs avec l'agent de lutte biologique *(Trichoderma)* placé dans les deux disperseurs étudiés.

2. Méthodologie

L'essai no. 1 a été réalisé à l'Ile d'Orléans ainsi qu'à la station expérimentale de Saint-Lambert, pendant les mois de juin et de juillet 2005. À cette fin, nous y avons introduit quatre ruches d'abeilles domestiques, placées à environ 100 m de la culture de fraisiers (cv. Seascape), là où il y a eu l'essai (fraisière d'une surface d'environ 1 ha). À la Station expérimentale de Saint-Lambert nous avons procédé à la capture d'abeilles provenant de ruches inoculées avec *Trichoderma* et de ruches-témoin. L'essai no. 2 a été effectué dans une serre ($80m^2$) de l'IRDA située au Complexe scientifique à où fut placée une ruchette de bourdon fébriles (*Bombus flavescens*). Cet essai a été effectué au mois de juillet 2005, et la variété Seascape a été aussi utilisée. Dans les deux essais, la méthode a été la même si ce n'est que constituée par une composante de champ et une autre de laboratoire.

2.1 Terrain (champ et serre)

L'agent de lutte biologique *Trichoderma harzianum* (marque commerciale - Rootshield®) était placé quotidiennement dans tous les distributeurs utilisés dans les essais (figure 22). Chaque distributeur recevait le matin, 6g et 2g respectivement pour l'abeille domestique et le bourdon fébrile. Le *Trichoderma* utilisé était conservé au congélateur à -20^0C jusqu'au moment d'être ajouté aux distributeurs. La formulation de *Trichoderma* utilisée dans ces essais contenait $9.8X10^6$ CFU/g.

2.1.1 Acquisition de l'inoculum par les pollinisateurs

Dans le premier essai, de la Station expérimentale de Saint-Lambert, nous avons pris un échantillon d'abeilles domestiques : i) sortant de ruches inoculées avec le *Trichoderma*, ii) entrant aux ruches inoculées, iii) de ruches témoin, non inoculées. Ces captures ont été réalisées environ une heure après le rechargement de *Trichoderma* dans les distributeurs. Dans le deuxième essai nous avons effectué seulement un échantillon de bourdons (10) sortant de la ruchette inoculée avec *Trichoderma* dans les 3 heures suivant le dépôt de l'agent dans le distributeur.

Dans les deux essais, nous avons aussi procédé à la capture d'un échantillon (environ 30) d'abeilles lors de leurs visites aux fleurs de la culture.

2.1.2 Quantité d'inoculum déposé sur les fleurs

Pour quantifier la quantité d'inoculum sur les fleurs nous avons étiqueté aléatoirement environ 120 boutons floraux, au champ et en serre. Soixante de ces boutons ont été encagés individuellement avec des pochettes en tulle. Soixante autres boutons floraux sont demeuré libres afin de permettre l'accès des pollinisateurs à ces fleurs.

De plus, nous avons encagé des boutons floraux dans une zone déterminée du champ/serre et les avons exposés aux pollinisateurs après leur ouverture lors de la visite d'un insecte le moment de l'arrivée et du départ était enregistré à l'aide d'un magnétophone. Ultérieurement, les bande ont été écoutées et la durée des visites étaient déterminées. et après l'utilisation d'un nombre de visites souhaitées, la fleur était cueillie. Après chaque visite le pollinisateur (abeille ou bourdon) était capturé lorsque cela était possible. À l'essai no. 1 nous avons obtenu environ 20 fleurs avec une visite. À l'essai no. 2, nous en avons obtenue environ 42 fleurs avec un nombre limité de visites, dont 30 avec une seule visite. Dans ce dernier essai, nous avons à capturé environ 30 bourdons fébriles responsables de ces visites.

2.2 Au laboratoire

Les échantillons d'insectes et/ou de fleurs provenant de chacun des essais ont été gardés individuellement en petites bouteilles et amenés au laboratoire. Tous les échantillons de l'essai no. 1 ont été conservés au frigorifique, sauf les abeilles sortant et entrant aux ruches inoculées et témoin. Tous les échantillons ont été gardés au congélateur (-20^0C)

À chaque échantillon cueilli au champ (fleurs et insectes) nous avons additionné 20 ml d'eau distillée avec du Tween (0.01 %) et la suspension qui en résultait, était agitée pendant 1 heure. Ensuite, 400 ml de la suspension originelle étaient déposés dans un milieu de culture sélectif du *Trichoderma*. Le milieu comprenait (g/L) : Ca $(NO_3)_2$, 1.0; KNO_3, 0.26; $NaSo_4$ $7H_2O$, 0.26; KH_2PO_4, 0.12; $CaCl_2$ $2H_2O$, 1.0; acide citrique, 0.05; sacarose, 2.0; agar, 20.0. Puis, son Ph. était ajusté à 4.5. Après stérilisation, les antibiotiques et les fongicides suivants furent additionnés alors que la température du milieu atteignait 45^0C : tétracycline, 0.05; streptomycine, 0.10; senator (70 %), 0.0143 et quintozène (75 %), 0.02666. Pour chaque échantillon, 3 répétitions étaient réalisées. En général nous n'avons pas procédé à des dilutions sauf chez les échantillons de bourdons fébriles en quittant la ruchette (essai no. 2). Les plats de Pétri ont été gardés au laboratoire, à la température de la pièce (22°C) et le nombre de colonies (CFU colony forming units) était dénombré environ 8 jours après la réalisation des inoculations.

2.3 Traitement des données

La moyenne du nombre de CFU a été déterminée à partir des 3 répétitions chez tous les échantillons (insectes et fleurs) obtenus lors des deux essais. Ensuite pour chaque ensemble d'échantillons la moyenne des moyennes et leur écart-type respectif était calculée. Pour chacun des groupes d'échantillons analysés, nous avons calculé le pourcentage de fleurs ou d'insectes où *Trichoderma* a été détecté.

Pour l'essai no. 2, les données des fleurs exposées à un nombre limité de visites, ont servies au calcul de corrélations entre le no. CFU/bourdon responsable des visites et le no. CFU/fleur ainsi qu'entre le temps total des visites et le no. CFU/fleur (test de Spearman in statistics 6.0)

3. Résultats et discussion

3.1 Acquisition de l'inoculum par les pollinisateurs

Les résultats obtenus à l'essai no. 1 nous permettent de conclure que le distributeur Houle inséré sur une ruche standard d'abeilles domestiques assure l'inoculation de tous les individus qui quittent la ruche. Quant à la quantité de l'inoculum transporté pour chaque abeille au moment de sortie de la ruche, les résultats (Tableau I) indiquent des valeurs un peu inférieures à ceux indiquées dans la littérature pour *Trichoderma harzianum* (Kovach *et al*. 2000) et pour d'autres agents de lutte biologique comme *Gliocladium roseum* (Yu & Sutton, 1997) ainsi que *Bacillus subtilis* (Dedej *et al.*, 2004). Tous ces auteurs mentionnent un taux d'inoculation d'environ 10^4 - 10^5 CFU/abeille.

Cependant, les résultats de ces travaux ne peuvent pas être comparés directement à ceux obtenus à l'essai no.1 étant donné que (i) les distributeurs utilisés ne sont pas exactement du même type, (ii) dans la majorité de ces études on ne rapporte pas la quantité de l'inoculum placée dans les distributeurs et (iii), le temps entre le chargement de l'inoculum et la capture des insectes n'est pas indiquée. Tous ces facteurs peuvent influencer la quantité de l'inoculum portée par les pollinisateurs au moment de leur sortie de la ruche. De plus, dans la recherche de Kovach *et al*., (2000), ils ont utilisé de petits nucléi tandis que dans cette étude, des ruches normales furent utilisées.

Le nombre élevé de CFU transporté par les insectes lors de l'entrée à la ruche (retour) est un indicateur que seulement une partie (environ 43 %) de l'inoculum est libérée pendant l'activité de pollinisation des abeilles. Notons que ces valeurs ont été obtenus après environ une heure de la recharge de *Trichoderma* dans le distributeur. L'input au retour demeure donc important, surtout pour ce type de distributeurs où le passage de l'abeille à l'entrée ne se fait pas par le site où est placé l'inoculum.

Quoique les tests de toxicité par ingestion réalisés dans ce projet, ont révélé que *Trichoderma* n'est pas toxique pour les abeilles par cette voie (ingestion) (Section VI), il serait probablement important de minimiser cet inoculum excessif revenant à la ruche puisqu'il pourrait s'accumuler et finir par atteindre des doses toxiques dans le cas où les abeilles soient utilisées en fraisières à jour neutre où la floraison occupe une longue période. Dans le cas des fraisières conventionnelles, la période de floraison est limitée à 15 jours environ, et les analyses de résidus de Captane retrouvé dans le miel indique que les concentrations après 26 jours sont de 10 fois inférieures à celles acceptées par le fédéral.

Les traces de *Trichoderma* trouvées sur les abeilles provenant des ruches témoins (pas inoculées par *Trichoderma* (Tableau 7) pourraient s'expliquer de deux façons

i) les individus capturés proviendraient par dérive de ruches inoculées voisines

ii) du *Trichoderma* indigène naturellement présent dans l'environnement

iii) des individus auraient acquis le *Trichoderma* sur des fleurs déjà butinées par des abeilles provenant des ruches avec un distributeur.

Tableau 7 – Pourcentage d'abeilles avec du Trichoderma

	Nbre d'abeilles par échantillon	% d'abeilles présentant du *Trichoderma*	CFU/abeille (x ± s.d.)
Abeilles sortant des ruches inoculées avec du *Trichoderma*	20	100	$3.9x10^3 \pm 1.7x10^3$
Abeilles rentrant à la ruche inoculée avec du *Trichoderma*	20	100	$2.2x10^3 \pm 1.3x10^3$
Abeilles des ruches témoin (non inoculées avec du *Trichoderma*)	20	40	6.67 ± 8.38

Dans l'essai no. 2, tous les bourdons capturés à la sortie de la ruchette étaient inoculés, ruchette avec un dispositif distributeur de *Trichoderma*; ils présentaient une moyenne de $7.2x10^4 \pm 2.2x10^4$ CFU/bourdon. Quoique l'échantillon était petit (10 individus), nous avons vérifié que le taux d'inoculum obtenu avec le distributeur-Houle pour bourdons était avantageusement comparable à celui obtenu dans d'autres recherches réalisées avec *Bombus terrestris* avec un autre modèle de disperseur, soit de $4.3x10^4$ CFU/bourdon (Maccagnani *et al*. 2005).

Pour les abeilles capturées en activité de pollinisation sur des fleurs de la culture nous avons montré que 40 % des individus portaient du *Trichoderma* et que la densité moyenne de l'inoculum véhiculé était de 53.33 ± 95.43 CFU/abeille. Pour les bourdons capturés dans les mêmes conditions, visitant les fleurs, tous ont montré la présence de *Trichoderma* et la densité moyenne de l'inoculum véhiculé était de $6.6x10^3 \pm 1.9x10^3$ CFU/bourdon.

3.2 Inoculum déposé dans les fleurs

Dans les deux essais nous n'avons pas détecté de *Trichoderma* chez les fleurs témoin (tableaux 8 et 10). Cependant ce champignon a été détecté dans d'autres échantillons provenant des sites où ont été effectués les essais.

Dans l'essai no. 1, réalisé avec des abeilles en milieu libre, nous avons montré que 33.33 % des fleurs exposées aux visites de ces pollinisateurs avaient l'agent de lutte biologique (tableau 8). Cette fréquence de la présence de l'inoculum est plus basse que celle détectée dans d'autres études, comme celle de Kovach *et al.* (2000) où le pourcentage de fleurs visitées par abeilles, avec des niveaux détectables de *Trichoderma* a été toujours supérieur à 50 %. Cependant, les données obtenues dans cet essai ne sont pas directement comparables avec ceux de Kovach *et al* (2000).

Pour les fleurs qui ont reçu une seule visite d'abeille (tableau 9) nous avons vérifié une très grande diversité, voire des résultats contradictoires, entre la densité présente après une visite d'abeille (tableau 8 et 9) avec celle de fleurs exposées à plusieurs visites (tableaux 8 et 9). Chaque fleur exposée aux pollinisateurs était susceptible de recevoir du *Trichoderma* mais aussi de se voir l'enlever. Ainsi, une fleur librement exposée peut présenter des densités moins élevées qu'une fleur qui n'a reçu qu'une seule visite où il y a eu seulement déposition de l'agent de lutte biologique Une autre hypothèse serait qu'il y aurait une grande hétérogénéité entre le nombre de CFU déposés par fleur, dépendant en grande partie de la charge que l'abeille a pris et qu'elle porte encore

Tableau 8 : Pourcentage de fleurs où Trichoderma a été détecté. Nombre moyen de CFU chez les fleurs exposées et témoin.

	Nbre de fleurs de l'échantillon	% de fleurs avec *Trichoderma*	CFU/fleur (x ± s'.t.)
Fleurs exposées à des visites d'abeilles	60	33.33	26.27 ± 87.99
Fleurs témoin (encagées)	60	0	0

Tableau 9 : Pourcentage de fleurs visitées une seule fois par l'abeille domestique chez lesquelles Trichoderma a été détecté.

	Nbre de fleurs de l'échantillon	% de fleurs où *Trichoderma* a été détecté	CFU/fleur (x ± e.t.)
Fleur visitée une fois par l'abeille domestique	23	34.78	118.84 ± 222.44

À l'essai no. 2, nous avons détecté la présence de *Trichoderma sur* 100 % des fleurs exposées aux bourdons, où la densité moyenne de CFU/fleur était de $1.2x10^3$ (tableau 10). Ce pourcentage de fleurs « protégées » est supérieur à celui trouvé dans d'autres travaux impliquant *Trichoderma* disséminé par *Bombus terrestris*. Maccagroni *et al*. (2005) ont obtenu un maximum de 67.5 % de fleurs colonisées avec une densité moyenne de $1.35x10^2$ CFU/fleur. Kovach *et al.* (2000) a aussi obtenu un pourcentage maximum de 69 % de fleurs avec *Trichoderma*, dans un essai avec Bombus impatiens.

Dans cet essai, la densité élevée de pollinisateurs inoculés par rapport à la faible densité de fleurs relativement à l'essai no. 1, a fait en sorte que le dépôt de *Trichoderma* dans les fleurs était supérieur à son enlèvement. Alors, les fleurs exposées à plusieurs visites des pollinisateurs ont présenté un plus grand nombre de CFU que les fleurs qui ont reçu une seule visite (tableaux 10 et 11). Cela justifie aussi le fait que toutes les fleurs exposées à des visites de bourdons présentaient un inoculum (tableau 10).

Tableau 10 : Pourcentage de fleurs où Trichoderma fut détecté (x ± e.t. de CFU/fleur) lorsque exposées à des visites de bourdons ou encagées.

	Nbre de fleurs de l'échantillon	% de fleurs avec du *Trichoderma*	CFU/fleur (x ± s'.t.)
Fleurs exposées aux bourdons	60	100	$1.2x10^2 \pm 9.0x10^3$
Fleurs témoin	60	0	0

Du total de fleurs visitées une seule fois par des bourdons, seulement 75 % ont été colonisées avec des niveaux de *Trichoderma* détectables et la densité moyenne de ce champignon y était de 123.44 ± 196.01 (tableau 11). Il existe une corrélation statistiquement positive entre le nombre de CFU/fleur et le nombre de CFU/bourdon visiteur (r = 0.56; n = 28; p = 0.002). Ce résultat indique que plus grand est la quantité de l'inoculum transportée par l'insecte visiteur, plus grand est l'inoculum déposé dans la fleur visitée. Nous avons aussi trouvé une corrélation positive et statistiquement significative entre le nombre de CFU/fleur et le temps total de visite (r = 0.42; n =42; p = 0.0057). Ainsi, les visites plus longues potentialisent positivement le dépôt de l'inoculum dans les fleurs. Ces deux paramètres analysés (temps de visite et no. de CFU/bourdon visiteur) déterminent en partie la quantité de l'inoculum déposé dans une fleur. La connaissance de ces facteurs et d'autres (comme le comportement de l'insecte sur la fleur et les conditions au niveau de la fleur) serait importante pour optimiser dans l'avenir, le no. de CFU en chaque fleur afin d'y assurer une protection contre le *Botrytis*.

Tableau 11 : Pourcentage de fleurs ayant reçu une seule visite de bourdon montrant la présence de Trichoderma.

	Nbre de fleurs de l'échantillon	% de fleurs avec du Trichoderma	CFU/fleur (x ± s'.t.)
Fleurs exposées à une visite de bourdon	32	75	123.44 ± 196.01

4.0 Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus dans ces deux essais indiquent que l'abeille domestique comme le bourdon fébrile possèdent le potentiel pour acquérir du *Trichoderma* déposé dans les distributeurs-Houle, le disperser dans les fleurs de la culture de fraises. Cette recherche ainsi que d'autres déjà effectuées démontrent définitivement la capacité des pollinisateurs à disperser avec succès, l'agent de lutte biologique, *Trichoderma.* Elle démontre aussi indirectement la capacité des pollinisateurs à distribuer des poudres, qu'elles soient des fongicides de synthèse ou des insecticides biologiques ou de synthèse (et même des antibiotiques) pour protéger les fleurs et conséquemment les fruits, des maladies et ravageurs. La recherche doit être maintenant orientée vers l'amélioration de l'efficacité de cette technique. C'est à dire, l'optimisation des modèles de distributeurs-Houle utilisés dans ce projet. Ils doivent présenter les principales exigences qui caractérisent les distributeurs

efficaces pour éviter le transport de l'inoculum vers l'intérieur des ruches, pour ne pas provoquer d'altérations importantes dans l'activité et le comportement des pollinisateurs, et pour garantir un taux d'inoculum adéquat sur les insectes qui sortent de leurs ruches. Cependant, lorsque testés dans le champ, en situation réelle, ils ont présentés quelques problèmes du point de vue technique ce qui les rend moins fonctionnels. La limitation principale trouvée dans le distributeur-Houle pour l'abeille domestique est en relation avec la manutention de l'agent de lutte biologique en bonnes conditions pour la dispersion. Dans quelques essais sur le terrain, nous avons observé de la condensation à l'intérieur des distributeurs avec une altération subséquente des particules de l'agent de lutte biologique par la formation d'agglomérés qui réduisent la quantité d'inoculum de *Trichoderma* sur l'insecte sortant de la ruche. Il serait donc nécessaire de réaliser d'autres travaux visant la comparaison de différents types de distributeurs, en appliquant des méthodologies communes pour établir une base de données correcte dans l'évaluation de l'efficacité de la technique d'utilisation de distributeurs pour la dispersion d'agents de lutte biologique, ou de poudres visant la protection des fleurs contre les maladies ou les ravageurs (Bilu *et al*., 2004).

5. Références

Dedej, S. Delaplane, K. S. Scherm, H. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent Bacillus subtilis to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. Biological Control. Elsevier Science Publishers,Amsterdam, Netherlands: 2004. 31: 3, 422-427.

Kovach, J. Petzoldt, R. Harman, G. E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for Botrytis control. Biological Control. 2000. 18: 3, 235-242.

Maccagnani, B. Mocioni, M. Ladurner, E. Gullino, M. L. Maini, S. Investigation of hive-mounted devices for the dissemination of microbiological preparations by Bombus terrestris. Bulletin of Insectology. Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies,Bologna, Italy: 2005. 58: 1, 3-8.

Smith, V. L. Wilcox, W. F. Harman, G. E. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and Gliocladium spp. Phytopathology. 1990. 80: 9, 880-885.

Yu Hai Sutton, J. C. Morphological development and interactions of Gliocladium roseum and Botrytis cinerea in raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology. 1997. 19: 3, 237-246.

Figure 9 : Essais en laboratoire (IRDA) pour la mise au point du milieu de culture de Trichoderma

Figure 10 : Développement de la nouvelle technique en laboratoire (IRDA) pour la mise au point du milieu de culture de Trichoderma

SECTION VI

IMPACTS DE FONGICIDES VÉHICULÉS PAR L'ABEILLE SUR LA COLONIE

1. Introduction

L'utilisation de l'abeille comme vecteur de fongicides à l'aide d'un distributeur fixé à la ruche pourrait devenir un outil efficace pour une gestion écologique des fongicides. Le principal chercheur qui a mené des travaux pour mettre au point cette technique est Joseph Kovach (Kovach *et al.*, 2000). Au cours de ce type de travaux, ni Kovach, ni aucun autre chercheur ne semblent s'être préoccupés des impacts de cette technique sur les abeilles qui se retrouvent directement en contact avec les produits qu'ils dispersent.

L'objectif général de cette partie de l'étude est donc d'évaluer les effets des fongicides sur l'abeille butineuse ainsi que sur l'ensemble de l
a colonie. La réalisation de ces objectifs nécessitait des études en laboratoire et au champ.

En laboratoire, les objectifs spécifiques étaient d'identifier, à partir de 8 produits homologués contre le *Botrytis* au champ, lesquels étaient les moins toxiques pour les abeilles et qui pourraient, subséquemment, servir pour les études en champ. Les objectifs spécifiques des travaux en champ étaient de vérifier si le produits sélectionnés suite aux tests en laboratoires étaient des produits candidats suffisamment sécuritaires pour les recommander pour usage avec le distributeur au champ. Ceci implique qu'ils ne causeraient pas de tord à moyen terme aux populations d'abeilles dans les ruches et n'affecteraient pas leur production de miel..

2. Tests en laboratoire

2.1 Tests d'ingestion

2.1.1 Matériels et méthodes

La toxicité par ingestion a été évaluée pour 8 fongicides. Ce test a été fait en deux parties. D'abord, un cube de sucre blanc a été imbibé légèrement dans une solution de fongicides dont la dose respectait les recommandations au champ du fabricant (tableau 1, section II). Puis, ce cube a été déposé au fond d'une cage grillagée (15 cm x 15 cm x 15 cm) avec une quinzaine d'abeilles vivantes (figure 20). Une bouteille d'eau potable de 50 ml était placée sur le dessus de la cage afin de subvenir au besoin hydrique des abeilles. Par la suite, nous avons recensé les cadavres d'abeilles mortes après 24 heures. Le deuxième partie du premier test a été fait avec une dilution d'un sirop de glucose (3 partie d'eau :1 partie de sucre) contenant un fongicide dont la concentration était ajustée selon les recommandations au champ du fabricant (tableau 1, Section II). En somme, les abeilles encagées ont reçu 50 ml de sirop contaminé aux fongicides ainsi que 50 ml d'eau potable (figure 21). L'expérience a durée 72 heures avec deux recensements d'abeilles mortes à 24 heures et à 72 heures. Les

moyennes des mortalités des 3 répétitions ont été calculées et exprimées en pourcentage et classés en trois niveaux de toxicité, peu toxique, moyennement toxique et toxique (tableau 1).

2.1.2 Résultats et discussion

Nos résultats démontrent qu'après 72 heures de consommation d'un sirop contaminé, le Captan était le plus létal avec 93,89 % d'abeilles mortes, alors que le *Trichoderma Larzianum* a intoxiqué 20,55 % des abeilles, l'ELEVATE 10,42 % et le LANCE 7,07 %.

Tableau 12 Classification des fongicides pour les tests de toxicité des abeilles par ingestion du sirop de glucose contenant différents fongicides

Peu toxique	Moyennement toxique	Toxique
0 à 25 %	**26 à 50 %**	**51 à 100 %**
LANCE (7,07 %)	NOVA (38,13 %)	CABRIO (68,04 %)
ELEVATE (10,42 %)	SENATOR (34,08 %)	ROVRAL (74,03 %)
ROOTSHIELD (20,55 %)		CAPTAN (93,89 %)

2.2 Test de contact et d'inhalation

L'utilisation du diffuseur de fongicides, situé à l'entrée de la ruche, nécessite une poudre fongique afin que l'abeille, en passant dans cette substance, la transporte vers les fleurs. Nous avons vérifié l'impact de ces fongicides sous la forme poudreuse sur l'abeille (figure 11.). La toxicité par contact était particulièrement important à vérifier avant d'utiliser l'abeille comme vectrice d'un fongicide puisque cette méthode exige un contact direct de l'insecte avec la poudre du produit commercial.

2.2.1 Matériels et méthodes

Ce second test consistait donc à mettre des abeilles en cage en contact avec de la poudre fongique et deux matières inertes : l'argile grise (AG) et la fécule de maïs (FM)). La durée de ce traitement a été 24 heures avec des recensements d'abeilles mortes à 2h00, à 4h00, à 6h00 et à 24h00. Les moyennes des 3 répétitions ont été exprimées en pourcentage puis regroupées du moins toxique au plus toxique. Ce test a été répété trois fois avec des quantités différentes de fongicides : 1 g ; 0,5 g ; 0,2 g. Chacune des ces poudres étaient dispersées par le grillage situé au dessus du pot (type pot de conserve *Mason*® d'environ 1litre) où il y avait une vingtaine d'abeilles vivantes. Puis, chacun de ces dispositifs était muni d'une bouteille de 50 ml de sirop de glucose.

2.2.2 Résultats et discussion

Nos résultats de tests préliminaires ont démontré que la mortalité des abeilles variait selon le temps d'exposition des abeilles avec la poudre fongique. Le temps d'exposition d'une durée

de 6h00 a été sélectionné pour la suite des analyses des données car cette durée montre l'impact le plus discernable. La quantité de poudre avec laquelle les abeilles étaient en contact, soit 1g, 0,5g, 0,2g, influençait aussi le taux de mortalité (figure 11).

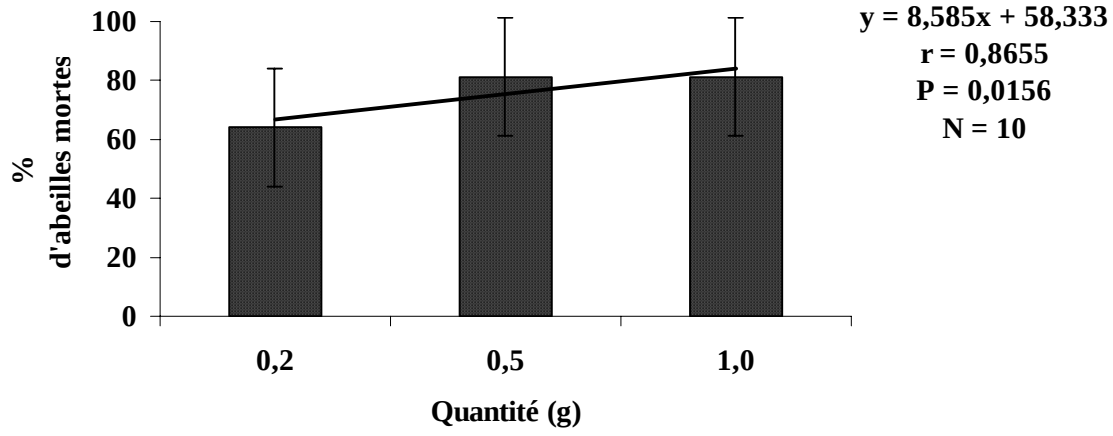

Figure 11 Mortalité moyenne (%) des abeilles suite au test par contact avec différentes quantités de poudre après 6h00 d'exposition

Les fongicides LANCE, ELEVATE et ROOTSHEILD considérés peu toxique lors des tests d'ingestion, deviennent toxiques lors des tests d'inhalation. En effet, avec 0,5g de poudre, LANCE accuse une mortalité de 68,52 %, CAPTAN 78,90 %, ROOTSHEILD 81,23 % et ELEVATE 82,38 %.

Tableau 13 : Classification des fongicides pour les tests de toxicité par inhalation 0,5g à t = 4h00.

Peu toxique 0 à 25 %	**Moyennement toxique 26 à 50 %**	**Toxique 51 à 100 %**	
	Fécule de maïs 46,21	LANCE (68,52 %)	ROOTSHIELD (81,23 %)
		RONILAN (74,06 %)	ELEVATE (82,38 %)
		CAPTAN(78,90 %)	Argile grise (83,27 %)
		NOVA (80,77 %)	SENATOR (86,70 %)

Il est important de noter que des produits inertes comme la fécule de maïs et l'agrile grise provoquent de 46 % et 83 % de la mortalité des abeilles lorsque celles-ci sont exposées à leur particule lors du test par inhalation.

2.3 Mesure de la taille des stigmates de l'abeille et de la grosseur des particules des fongicides et autres produits

Les fongicides sont composés en partie de matières actives et de matières inactives comme matériaux de remplissage (souvent de l'argile). Il est évident que l'abeille mange et respire de la poudre fongique par les stigmates. On est en droit de se demander s'il y a un lien entre ces paramètres (compatibilité entre la taille des particules du fongicide et l'appareil respiratoire) et les conséquences sur la santé de l'abeille. Ce point important ne semble pas avoir attiré l'attention de la communauté scientifique. Le fait que des poudres potentiellement inertes comme l'argile et la fécule de maïs deviennent toxiques lorsqu'elles sont en contact avec l'abeille laisse supposer que d'autres facteurs que la matière active du produit testé pourraient causer des tords à l'abeille. Nous avons donc voulu vérifier la grosseur des particules de fongicides pouvait permettre à ces produits d'entrer par les stigmates dans le système trachéen, causant peut-être des dommages létaux. La réponse à ces questions nécessitait donc aussi de connaître de diamètre des stigmates de l'abeille..

2.3.1 Matériels et méthodes

Les mesures du diamètre des stigmates de l'abeille et la grosseur des particules des fongicides et autres produits poudreux ont été faites à l'aide d'une loupe binoculaire modèle Wild M 8 et d'un microscope, modèle Wild M 11. La conversion entre les mesures prises au binoculaire et au microscope a été fait à l'aide d'une plaque de verre micrométrique.

Le diamètre moyen des stigmates de l'abeille *A. mellifera* a été mesuré avec une loupe binoculaire au grossissement 10 x 50. Deux stigmates situés sur le coté pariétal de l'abdomen ont été mesurés sur 47 abeilles différentes provenant des 24 colonies utilisées dans cette expérience (tableau 14).

La grosseur des particules des fongicides et autres poudres a été mesurée au microscope muni d'une plaque micrométrique insérée dans une des oculaires au grossissement 10 x 100. Une quantité de poudre était étendue sur une plaque de verre et les mesures et les mesures y étaient prises aléatoirement. Au total, il a eu 1185 particules différentes de mesurées.

2.3.2 Résultats et discussion

2.3.2.1 Grosseur des stigmates

Des mesures ont été faites sur 94 stigmates provenant de 47 individus différents. Il y a peu de variation de la grosseur des stigmates des abeilles (variance 1,11 μm). Le stigmate a une forme légèrement triangulé et il a environ 2 microns de différence entre la longueur (moyenne=8,31μm) et la largeur (moyenne=6,06 μm). Le stigmate mesure donc en moyenne 7,14 (+_0,39)μm.

2.3.2.2 Grosseur des particules et mortalité

Les particules des poudres sont de loin plus petites par rapport à la grosseur des stigmates (tableau 14); les particules peuvent donc entrer facilement à l'intérieur, même si le corps de l'abeille est muni de soies qui protègent ses stigmates des poussières environnantes. Néanmoins, après le stigmate, il y a un étranglement dû aux valvules du système trachéen avant de se diviser en diverses trachées et trachéoles au diamètre plus petits (Chapman, 1982). Il y aurait donc probablement des gabarits inférieurs à celui du stigmate qui empêcherait physiquement l'entrée des particules plus grosses.

Toutefois, les analyses de corrélation de la mortalité de l'abeille en fonction du diamètre des particules nous montrent des coefficients négatifs et significatifs. La mortalité chez l'abeille diminue donc lorsque la grosseur de la particule augmente. La mortalité des abeilles varie aussi selon la quantité (1g, 0,5g, 0,2g) de poudre fongique avec laquelle est en contact (R^2 = 0,7491)(figure 11).

En plus de la toxicité, les poudres constituées de particules de petit diamètre qui était inhalées par l'entraînement de l'air semble bien avoir des impacts sur la mortalité de l'abeille. Une fois la particule entrée à l'intérieur de l'abeille, ces substances semblent avoir des effets différents sur le bon fonctionnement physiologique de l'abeille. On peu donc se poser la question à savoir si l'affinité des fongicides pour l'humidité pouvait avoir un impact négatif sur la santé de l'abeille.

Tableau 14 : Taille moyenne des particules pour les différentes poudres

Poudres	**Grosseur moyenne des particules (micron)**	**Écart type**	**No**
Nova	0,0462	0,0249	180
Lance	0,0463	0,0311	50
Argile grise	0,0473	0,0253	221
Ronilan	0,0610	0,0356	95
Elevate	0,0719	0,0397	158
Captan	0,0888	0,0355	105
Trichoderma	0,1085	0,0367	107
Senator	0,1657	0,0494	105
Fécule maïs	0,1693	0,0711	164

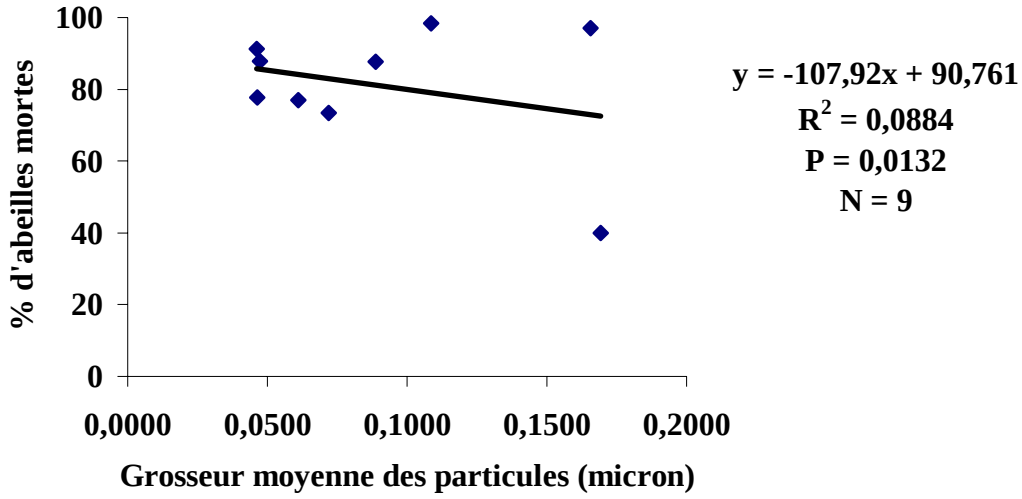

Figure 12 : Pourcentage de mortalité des abeilles en fonction de la grosseur des particules

2. 4 Hygroscopie des particules de fongicides

L'étude hygroscopique des particules fongiques est un autre point qui semble absent de la littérature. Au moment où les particules entre dans les stigmates et les cavités respiratoires de l'abeille, elles auront tendance à se coller sur les parois des trachées et à bloquer le passage de l'oxygène. Si la particule se rend plus loin à l'intérieur du corps de l'abeille, jusqu'à l'hémolymphe, la capacité alcaline de la molécule d'argile (matériel de remplissage des nombreux fongicides) aura un effet tampon sur l'acide carbonique produite par l'abeille (Chapman, 1982). Cela peut avoir pour effet d'annuler le signal physiologique de l'abeille qui éliminer l'acide carbonique faisant ainsi augmenter le pH de l'hémolymphe et par conséquent provoquer une asphyxie (Chapman, 1982).

Il est vraisemblable que les produits plus hygrophiles se fixent plus rapidement aux surfaces humides du système trachéen causant différents problèmes dont celui d'une diminution de l'échange d'oxygène et de dioxyde carbone.

2.4.1 Matériels et méthodes

L'hygroscopie des particules pour chacun des produits utilisés a été évaluée par la capacité des particules à acquérir l'humidité. Afin de s'assurer que toutes les particules étaient sèches, elles ont été placées dans un incubateur de type convection à air chaud (Dry type Bacteriological incubator, SS1860 F) à une température de 40° C pendant 24 heures.

Des mini-chambres humides ont été élaborées à l'aide de deux plats de pétri de hauteurs et de diamètres différents. L'eau tempérée du robinet a été versée (15 ml) dans chacun des plus grands plats de pétri. Puis, 1 ml de produit a été étendu sur le fond de 20 petits plats de pétri sans leur couvercle. Ces derniers ont été placés soigneusement sur le dessus de l'eau des plus grands plats de pétri afin que les petits plats de pétri remplis de 1 g de fongicides puissent flotter. Finalement, les grands plats de pétri ont été fermés rapidement à l'aide de leur couvercle et nous les avons laissés sur un comptoir du laboratoire à la température ambiante 20°C. Le principe actif de ces deux plats de pétri l'un dans l'autre est de permettre à l'humidité de migrer librement vers les particules sèches. Il y a eu deux répétitions du test. Des lectures de poids des petits plats de pétri à 3h30, à 18h00 et à 40h30 pour mesurer l'acquisition de l'humidité par les particules de fongicides. Les résultats ont été transformés en pourcentage moyen d'acquisition d'eau sur le poids initial des produits.

2.4.2 Résultats et discussion

Les fongicides et autres poudres montrent des degrés d'hygroscopie différents par l'acquisition plus ou moins rapide de l'humidité (tableau 15).

Tableau 15 : Pourcentage d'hygroscopie des fongicides et autres poudres inertes à différents moments (poids à temps 0h, 3h30, 18h00 et 40h30).

		Acquisition de l'humidité par rapport au poids initial (%)					
	t = 0h	**t = 3h30**		**t = 18h00**		**t = 40h30**	
Poudres	Poids initial (g)	Poids (g)	Acquisition d'eau % t = 0h00 à 3h30	Poids (g)	Acquisition d'eau % t = 3h30 à 18h00	Poids (g)	Acquisition d'eau % t = 18h00 à 40h30
E	1,16	1,96	69	4,86	148	6,57	35
L	0,90	1,73	92	5,56	221	6,66	20
C	1,21	1,31	8	3,43	162	4,44	30
Th	0,83	1,65	99	2,75	67	3,14	14
Fm	0,99	2,81	184	4,62	64	5,04	9
Ag	0,91	0,94	3	1,45	54	1,45	0
Cg	1,29	1,62	26	3,98	146	4,86	22
N	0,54	1,22	126	2,75	125	3,43	25
R	0,88	1,27	44	3,22	154	3,96	23
S	0,49	0,56	14	0,79	41	0,94	19

E : ELEVATE; L : LANCE; C : captan; Th : *Trichoderma Larzianum*; Fm: fécule de maïs; Ag : argile; Cg : captan granulaire; N : nova; R : ronilan; S : senator.

On remarque que le taux d'acquisition de l'humidité est plus important entre 3h30 et 18h00 et par la suite, ils tendent vers la saturation. L'ordre selon lequel se présente l'hygroscopie des fongicides (plus à moins hygroscopique) correspond à l'ordre de la grosseur des particules de ces fongicides à l'exception du fongicide Captan (tableau 14). Par exemple, le

fongicide LANCE est celui dont l'affinité à l'humidité est le plus élevé (221 %) (tableau 15) et qui a les plus petites particules (0,0463 micron) (tableau 14).

3. Tests au champ

L'étude au champ nous a permis d'évaluer l'impact des fongicides utilisés dans la culture de fraise. Cette expérience a été réalisée à l'Île d'Orléans du 31 mai au 7 juillet 2005 chez quatre producteurs de fraises. Vingt-quatre ruches (n=24) du CRSAD ont été utilisées.

L'évaluation de la santé des colonies au champ a été réalisée pendant que les abeilles distribuaient 4 des fongicides jugés les moins nocifs lors des tests de toxicité en laboratoire : le bio-fongicide ROOTSHEILD® (*Trichoderma harzianum)*, ELEVATE®, LANCE ® et SUPRA CAPTAN® (3 fongicides de synthèse)(figure 22). Ce dispositif comprend également un traitement diffuseur sans la présence de fongicides, afin de voir l'effet de diffuseur sur la santé des colonies ainsi qu'un témoin, ruche sans diffuseur.

3.1 Impacts à court terme : La technique du drap blanc

3.1.1 Matériels et méthodes

Au champ, nous avons utilisé une nouvelle technique pour comptabiliser le nombre de fèces et d'abeilles mortes lorsque celles-ci sont exposées aux fongicides. Cette technique, nouvellement adaptée à l'apiculture, consiste à étendre un drap blanc devant l'entrée de la ruche, permettant ainsi de pouvoir relever quotidiennement le nombre de fèces et d'abeilles mortes (figure 23). Les dimensions du drap blanc utilisé pour les nos observations étaient 1 mètre de large par 3 mètres de long.. Ces derniers étaient étendus et fixés au devant de l'entrée de la ruche à l'aide d'un cadre de bois. Nous procédions à tous les matins au nettoyage et au remplissage des différents fongicides dans les récipients de chacun des dispositifs (diffuseur). Par la suite, nous comptions le nombre de fèces ainsi que le nombre de cadavres d'abeilles retrouvés sur le drap blanc situé au pied de la ruche. Il y avait 3 observations par drap, une pour chacun des mètres carrés du tissus.

3.1.2 Résultats et discussion

3.1.2.1 Efficacité de la technique du drap blanc

Cette technique nous a permis de dénombrer au total 7411 fèces ainsi que 9279 cadavres entre 31 mai et 20 juin 2005. L'analyse ANOVA nous permet de déterminer des différences significatives entre certains traitements. A cet effet, le nombre de fèces (F = 2,8990; df = 5; P = 0,0432) entre Captan et Diffuseur (P = 0,0060); Captan et ELEVATE (P = 0,0090); Captan et Témoin (P = 0,0064) et Captan et *Trichoderma* (P = 0,0114).

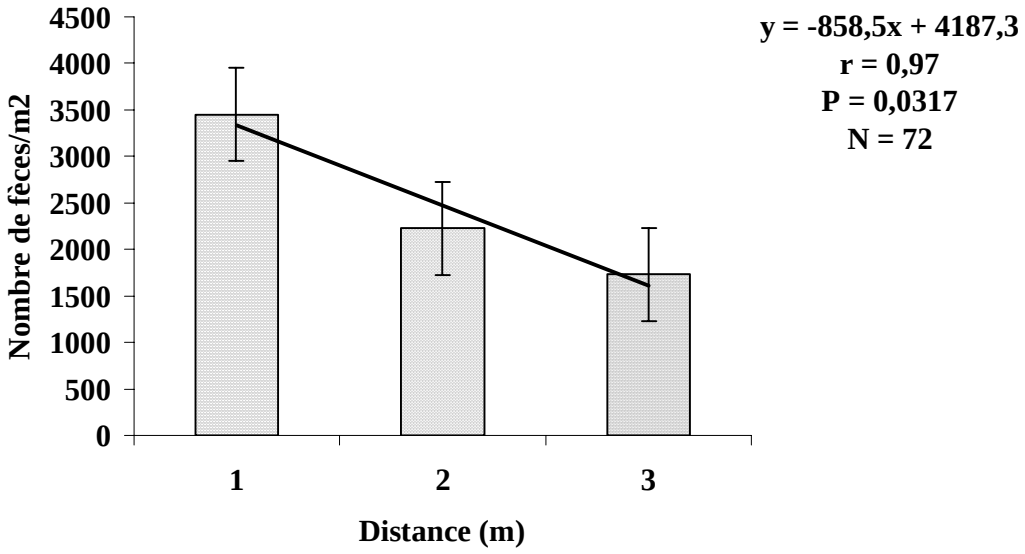

Figure 13 : Nombre de fèces laissées par les abeilles adultes sur le dispositif expérimental devant la ruche du 31 mai au 20 juin 2005.

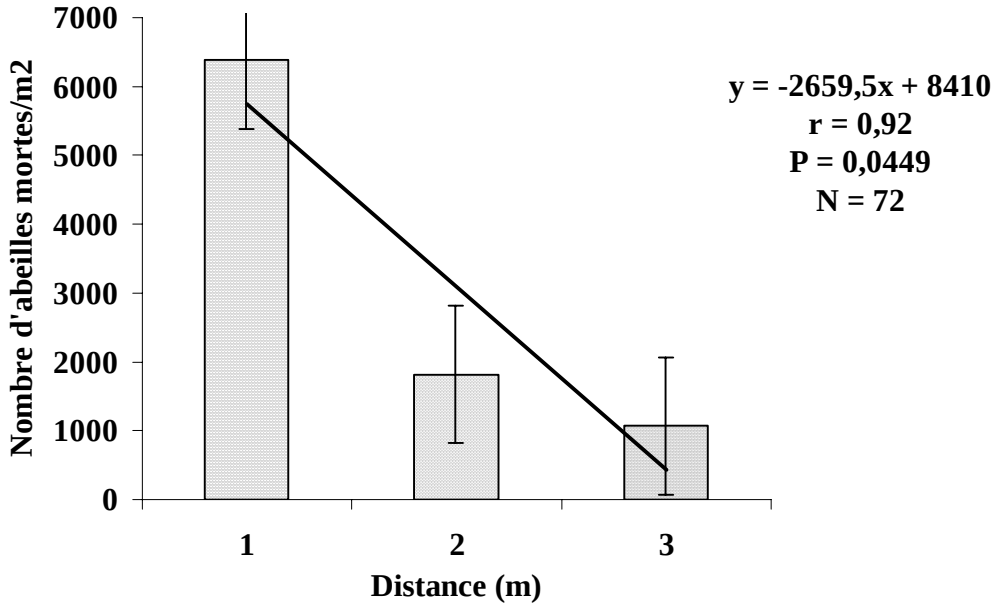

Figure 14 Nombre d'abeilles mortes, après exposition aux fongicides, laissées sur le dispositif expérimental en fonction de la distance devant la ruche du 31 mai au 20 juin 2005

Au premier mètre, il y a eu 3450 fèces (47 %) et 6387 abeilles mortes (69 %), au deuxième mètre 2228 fèces (30 %) et 1818 (20 %) abeilles mortes, et au troisième mètre 1733 fèces (23 %) et 1074 (12 %) abeilles mortes (figure 13). En somme, le premier mètre carré semble représentatif de l'ensemble des trois mètres puisque à lui seul, il représente 47 % du nombre total de fèces et 69 % du nombre total d'abeilles mortes retrouvées sur le drap. Peut-il avoir une relation entre le nombre de fèces et le taux de la mortalité au champ d'une colonie lorsque celle-ci est exposée à un fongicide ?

Tableau 16 Relation entre le nombre de fèces et la population des colonies selon le temps des traitements

Traitements	Fèce par colonie			Population des colonies			Coefficient de corrélation Fèce/Population
	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	
Diffuseur	265	461	823	16950	28225	28250	r = 0,7701
Elevate	430	187	314	18100	30087	32887	r = -0,7459
Lance	397	748	391	18212	32325	23387	r = 0,9267
Captan	93	263	92	16662	29775	24631	r = 0,7946
Thricoderma	230	471	859	18237	31375	35150	r = 0,9034
Témoin	362	511	588	19825	32312	37275	r = 0,9981

En général, tel que nous aurions peu le prévoir, plus la population augmente, le nombre de fèces est significativement plus élevé (tableau 17) Cependant le fongicide ELEVATE ne réagit pas de la même manière : est-ce que ce dernier occasionnerait des problèmes gastro-intestinale (constipation) à l'abeille? Ou encore, est-ce que la toxicité du fongicide affecte l'abeille de manière très rapide et l'abeille n'a pas le temps d'évacuer ses fèces avant de mourir? Alfonsus *et al*. (1935) ont trouvé que normalement l'abeille libère ses intestins lorsqu'il y a moins de 80 % d'eau dans ses fèces et que la variation de l'humidité à l'intérieur des fèces serait liée à la capacité d'absorption du système digestif de l'abeille. Cependant, nos résultats indiquent qu'il y a une diminution du nombre de fèces lorsque l'abeille absorbe les poudre fongicides et inertes qui sont hygrophiles. Ces résultats suggèrent sons que des produits ayant une telle propriété pourraient causer de la constipation chez l'abeille.

3.1.2.2 Nombre de fèces

Il est normal que le nombre de fèces augmente entre la première et la troisième semaine puisqu'il y a une augmentation des populations des colonies. En regardant la courbe du groupe témoin on voit une tendance normale de l'augmentation du nombre de fèces par rapport au déroulement de la saison (figure 15).

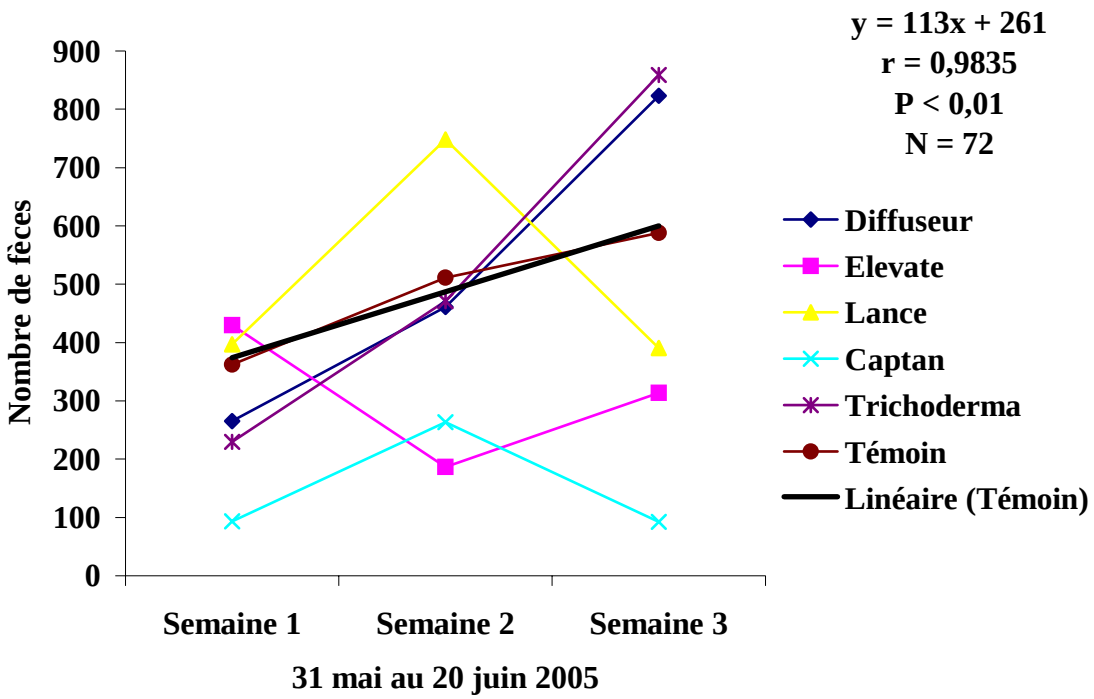

Figure 15 : ***Nombre de fèces d'abeille retrouvées sur le drap blanc pendant les traitements (semaine 1 : 31 mai au 6 juin ; semaine 2 : 7 juin au 13 juin ; semaine 3 : 14 juin au 20 juin 2005)***

Les traitements LANCE et Captan connaissent une diminution du nombre de fèces entre la deuxième et la troisième semaine signifiant qu'il y a probablement une diminution du nombre d'abeilles vivantes puisqu'une abeille morte ne fait plus d'excrétion. Le traitement ELEVATE connaît une diminution du nombre de fèces entre la première et deuxième semaine, mais on s'aperçoit que ces colonies exposées à ce fongicide s'adaptent et augmentent leur nombre de fèces et du coup leur population. Les traitements *Trichoderma*, diffuseur et témoin ne semblent pas avoir d'effet les deux première semaine, mais la troisième pour le *Trichoderma* et le diffuseur augmentent considérablement. Cela est peut-être dû au stress que le diffuseur impose aux colonies. Plus le stress augmente chez l'abeille plus elle consomme et par conséquent plus elle doit éliminer ses aliments donc plus elle produit des fèces. De plus, le *Trichoderma* est un microorganisme qui peut affecter la flore intestinale chez l'abeille provoquant une augmentation du nombre de fèces.

3.1.2.3 Mortalité

Les résultats de l'expérience démontrent que le fongicide LANCE est le plus létal (2628 abeilles mortes) suivi du fongicide ELEVATE (1566), du *Trichoderma*, (1286), du Captan, (881). Le groupe témoin n'a que 743 abeilles mortes au total durant cette expérience (figure 16).

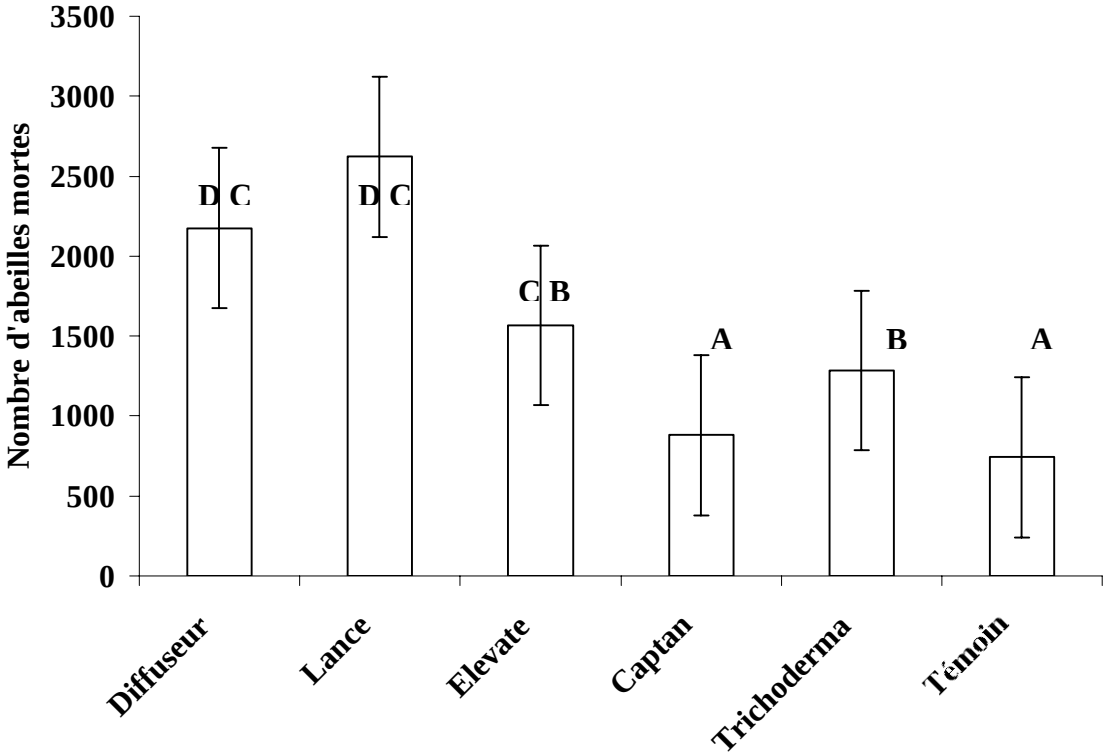

Figure 16 : Dénombrement d'abeilles mortes sur le drap blanc (3m^2) en fonction des traitements du 31 mai au 20 juin 2005. (Il y a une différence significative lorsque les lettres sont différentes; P<0,05)

L'analyse ANOVA nous permet de déterminer des différences significatives entre certains traitements. A cet effet, le nombre de fèces (F = 2,8990; df = 5; P = 0,0432) entre Captan et Diffuseur (P = 0,0060); Captan et ELEVATE (P = 0,0090); Captan et Témoin (P = 0,0064) et Captan et *Trichoderma* (P = 0,0114).

Il est normal que le nombre d'abeilles mortes augmente entre le 31 mai et le 20 juin et que la population des colonies augmente également puisque nous sommes en période post-hivernale.

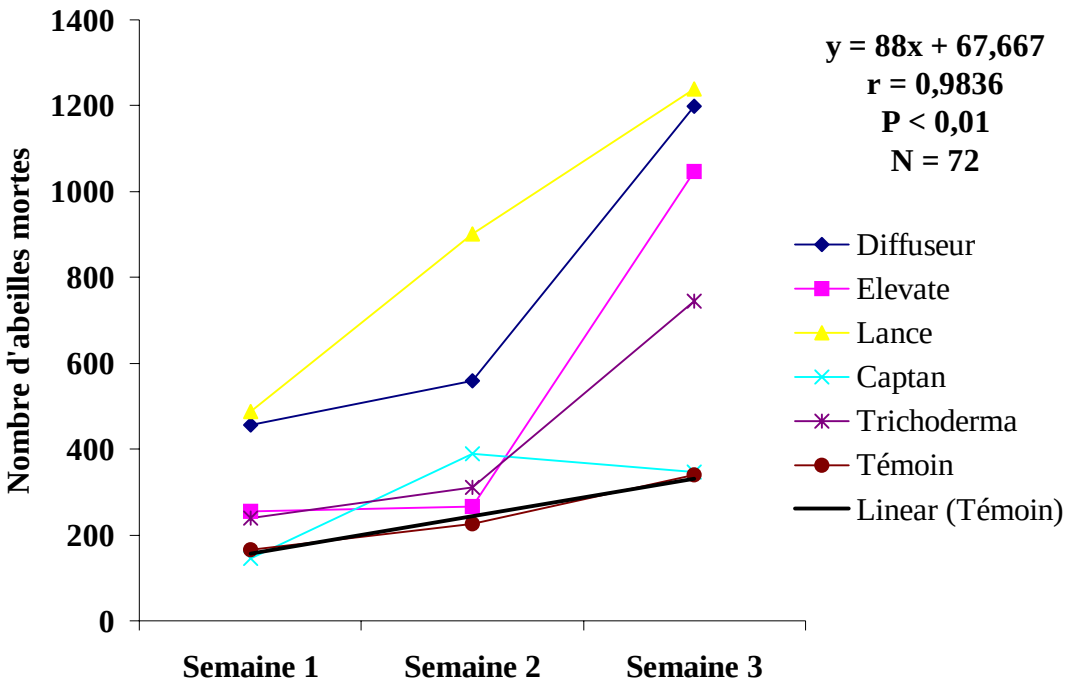

Figure 17 ***Nombre d'abeilles mortes retrouvées sur le drap et comptabilisées semaine après semaine entre le 31 mai et 20 juin 2005 (semaine 1 : 31 mai au 6 juin ; semaine 2 : 7 juin au 13 juin ; semaine 3 : 14 juin au 20 juin)***

En comparant la courbe du traitement témoin aux autres traitements, on s'aperçoit que les fongicides ont un impact sur la mortalité des abeilles. Par ailleurs, le traitement LANCE est le plus toxique dès la première semaine (figure 17). Le Captan démontre *a priori* un faible taux de mortalité, mais à la première semaine, l'angle de courbe ressemble à celle du LANCE à la deuxième semaine, cependant, le point d'inflexion vers le bas du Captan, nous rappelle que la matière active de ce fongicide joue une rôle de modérateur de croissance chez les larves d'abeilles causant une augmentation de jeunes abeilles (abeilles d'intérieures) et donc un recensement d'abeilles mortes plus faible lors de la troisième semaine. Le traitement diffuseur est très élevé lors de la troisième semaine par rapport au groupe témoin. Il se peut que le diffuseur empêche l'évacuation de l'air souillé.

De surcroît, il y a des différences significatives entre certains traitements concernant la mortalité (F = 3,4328; df = 5; P = 0,0236) dont LANCE® et Captan® (P = 0,0018); LANCE® et témoin (P = 0,0031); diffuseur et Captan® (P = 0,0083) ; diffuseur et témoin (P = 0,0137). Pourquoi le traitement diffuseur est-il différent de celui du groupe témoin ? Nous pensons que la présence du diffuseur influence le taux de mortalité des colonies, car il réduit l'évacuation de l'air souillé de la ruche provoquant un surplus de cet air à l'intérieur de la ruche. Par conséquent, certaines abeilles meurent.

Une colonie en santé a un nombre plus grand d'abeilles vivantes que d'abeilles mortes. Il est aussi logique de dire que les fèces sont produites par des abeilles vivantes. Une colonie en santé devrait avoir un nombre supérieur de fèces à celle qui connaît des difficultés létales. Autrement dit, plus le nombre de fèces augmente sur le draps comparativement au nombre d'abeilles mortes, mieux la colonie devrait se porter. En somme, une colonie en santé devrait avoir un ratio élevé.

Tableau 17 : Nombre total des fèces et d'abeilles mortes chez les différents traitements (bloc : 4 ruches / traitement) retrouvées sur le drap au champ (31/05/05 au 22/06/05) et rapport fèces / mortalité

Traitements	**Nombre total de fèces**	**Nombre d'abeilles mortes total**	**Rapport Fèces / mortalité**
Diffuseur	1580	2215	**0,71**
Élevate	931	1572	**0,59**
Lance	1531	2628	**0,58**
Captan	448	881	**0,51**
Témoin	1461	743	**1,97**
Trichoderma	1560	1294	**1,21**

Les fongicides ELEVATE, LANCE et Captan ont un faible rapport fèces/mortalités. En effet, la mortalité chez ces derniers est plus élevée que le nombre de fèces. Le Trichoderma a un rapport fèces / mortalité élevé ce qui signifie qu'il y a une plus grande quantité du nombre fèces que d'abeilles mortes. Cela est peut-être dû à la matière active (micro organisme) du *Trichoderma* qui provoque une augmentation du nombre de fèces. Les trois premiers fongicides sont donc les plus toxiques pour l'abeille alors, que le traitement diffuseur est plus modéré. Il est difficile d'expliquer le faible ratio du traitement diffuseur comparativement au témoin, mais il se peut que ce dernier soit affecté par un manque de ventilation dû à la présence du dispositif.

3.1.2.4 Relations entre l'hygroscopie des fongicides et d'abeilles mortes au champ

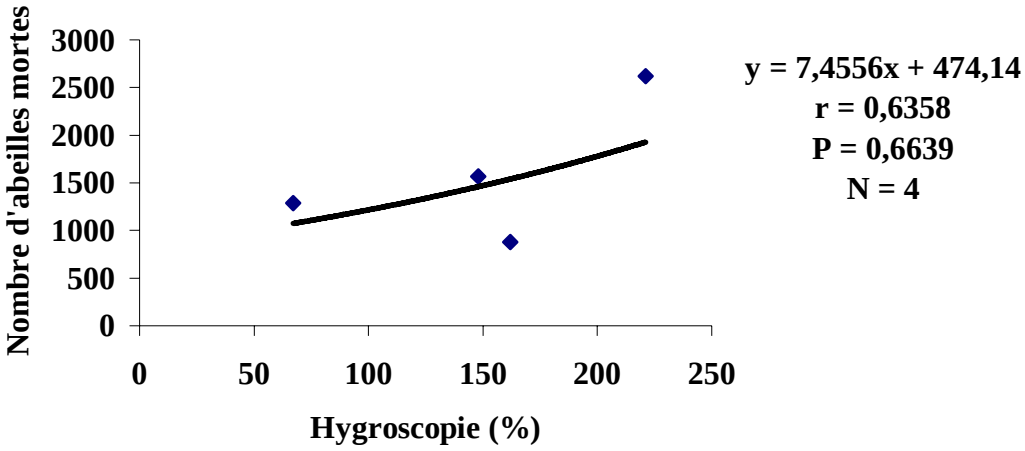

Figure 18 Mortalité des abeilles au champ en fonction de l'hygroscopie des fongicides utilisés

La tendance de la mortalité chez l'abeille augmente lorsque l'hygroscopie des particules de fongicides est élevée. À cet effet, au moment où la particule entre dans les stigmates et le système trachéen de l'abeille, ces particules fongiques auront tendance à se coller sur les parois du système respiratoire et à bloquer le passage de l'oxygène. Où encore, si la particule se rend plus loin à l'intérieur du corps de l'abeille, soit jusqu'à l'hémolymphe, la capacité alcaline de la molécule d'argile aura un effet tampon sur l'acide carbonique produite par l'abeille. Cela peut avoir pour effet d'annuler le signal physiologique de l'abeille a éliminer l'acide carbonique faisant augmenter le pH de l'hémolymphe et par conséquent provoquer une asphyxie et augmenterait la mortalité chez l'abeille. Toutefois, la probabilité d'erreur est élevée (0,6639) parce qu'entre autre l'effectif est bas (N = 4).

3.2 Impacts à moyen terme : La santé des colonies d'abeille

Les impacts des fongicides chez l'abeille isolée en conditions expérimentales peut être néfaste, mais il importe de vérifier également l'impact sur une colonie en santé durant l'été (50 000 abeilles).

La séquence évolutive des deux types de couvains couvain operculé (CO) et couvain non operculé (CNO) jusqu'à l'abeille adulte (POP), nous indique l'état de santé chez les colonies. Du moment de la ponte (CNO), l'ouvrière prend 21 jours d'incubation avant de devenir *imago*. La durée de vie estimée d'une ouvrière pendant la saison estivale est d'environ 42 jours.

3.2.1 Matériels et méthodes

Toutes les colonies préalablement évaluées et équilibrées ont été pesées deux jours après leur arrivée à l'Île d'Orléans afin d'avoir des colonies exemptes du stress causé par le transport. Puis, à la fin de l'expérience, soit le 20 juin, les colonies ont été de nouveau évaluées et pesées. Ce délai de 21 jours entre le début et la fin correspond à une génération d'ouvrières.

Par la suite, les colonies ont encore été évaluées en post-traitement, le 7 juillet (16 jours plus tard) soit une génération potentielle d'une nouvelle reine. Les trois évaluations des colonies (31 mai, 20 juin et 7 juillet) ont été faites en calculant la surface qu'occupaient les deux types de couvains, le nombre d'abeilles adultes ainsi que le poids des colonies. Le couvain non operculé (CNO) ou le couvain operculé (CO) ont été évalués par la mesure de surface (Hoopingarner, 1996) en appliquant un taux de 3,9 cellules par cm^2. Le nombre d'abeilles adultes d'intérieur (POP) a été évalué par la surface de recouvrement d'abeilles sur un cadre. Un cadre plein d'abeilles équivaut à 1000 abeilles (Hoopingarner, 1996). Il est possible d'évaluer le nombre de butineuses (BUT) en extrapolant le nombre au complet du 31 mai pour le 20 juin soit 21 jours plus tard (Ministère de l'Éducation du Québec, 1985). Les mesures de chacun des paramètres CNO, CO, POP et BUT sont exprimées en pourcentage et révèlent les impacts des fongicides sur l'état de santé des colonies. Le CNO représente l'état de la ponte de la reine. Le temps d'incubation pour le CO des ouvrières est de 21 jours. Après ce délai, le CO devient abeille d'intérieur (POP) et par la suite abeille d'extérieur (BUT). La POP au complet est ainsi estimée lorsqu'il y a majoritairement ces abeilles d'intérieur avec un peu d'abeilles extérieur.

L'analyse du CNO donne un profile initial du développement de la colonie puisque le CNO reflète le déroulement de la ponte de la reine. Une reine cesse de pondre en raison de son âge avancé, de la saison (automne), d'un manque de ressources alimentaires, un manque d'alvéoles vides dans les chambres à couvain ou d'un traumatisme suite à une intoxication par un pesticide.

3.2. 2 Résultats et discussion

Le développement du CNO aux différentes périodes de l'expérience (début, fin et post traitement), nous exprime l'état de santé de la reine tout au long de l'expérience.

Tableau 18 Analyse du couvain non operculé (CNO), au début, pendant et après les traitements aux différents fongicides (en nombre d'alvéoles non operculées contenant œuf et larve)

CNO	Diffuseur	Elevate	Lance	Captan	Thricoderma	Témoin
Début traitement 31/05	10362	13015	11977	9336	12544	12660
Fin traitement 20/06	12676	14349	18151	10320	14980	15982
Post traitement 7/07	11412	9826	21355	9850	15339	9860
Évolution du CNO Pendant les traitements 31/05-20/06 (21 jours)	+ 22 %	+ 10 %	+ 52 %	+ 11 %	+ 19 %	+ 26 %
Évolution du CNO Post traitement 20/06-7/07 (16 jours)	- 10 %	- 32 %	+ 18 %	- 5 %	+ 2 %	- 38 %
Évolution du CNO Global de l'expérience 31/06-7/07 (37 jours)	+ 10 %	- 25 %	+ 78 %	+ 6 %	+ 22 %	- 22 %

Le couvain non operculé (ponte de la reine) varie de 10 à 52 % entre le début de l'expérience (31 mai) jusqu'à la fin des traitements des fongicides (20 juin) (tableau 18). Durant la période des traitements, les reines du groupe LANCE ont pondu davantage (52 %) par rapport aux autres traitements. De plus, les reines du groupe LANCE pondent davantage en post traitement (18 %) (du 20 juin au 7 juillet). Après 37 jours d'observation, soit du 31 mai au 7 juillet, le CNO du traitement LANCE (78 %) est le plus élevé. Tout au long de l'expérience, la ponte des reines du groupe LANCE est à plein régime comparativement aux autres traitements. On peu ici émettre l'hypothèse que la reine pond pour sauver la pérennité de sa colonie.

Tableau 19 Évolution du développement du couvain non operculé (CNO) à couvain operculé (CO) et à la population d'abeilles adultes (POP) selon les dates (en nombre)

	Diffuseur	**Elevate**	**Lance**	**Captan**	**Thricoderma**	**Témoin**
CNO 31/05	10362	13015	11977	9336	12544	12660
CO 20/06	19862	27086	27979	17613	17472	20841
POP 7/07	28250	32888	23388	24631	35150	37275
% CNO à CO (21 jours)	92	108	134	89	39	65
% CO à POP (16 jours)	42	21	- 16	40	101	79
% CNO à POP (37 jours)	173	153	95	164	180	194

Le traitement LANCE connaît certaines difficultés lors l'incubation des ouvrières. À 37 jours d'âge, la valeur négative (- 16 %) signifie que le CO n'est pas venu à terme puisque de la POP est inférieur à la valeur de CO. Nous avons trois hypothèses pour expliquer ces résultats. Il est possible que les abeilles d'intérieur soient mortes et qu'elles n'étaient pas présentes pour soigner le CO et par conséquent le CO est mort. Il est aussi possible que le traitement LANCE retarde la période d'émergence des ouvrières en augmentant le temps d'incubation (CO). Une autre possibilité est que le LANCE accentue le passage du statut de l'abeille intérieur à celui de butineuse. Notre dispositif expérimental ne nous permet pas de vérifier à ces hypothèses. Toutefois, ce que nous savons, c'est qu'il est certain qu'il y eut un impact observable du LANCE sur le CO.

3.3 Analyse de la production de miel

Au Québec, les colonies augmentent la production de miel avec l'avancement de la saison estivale. Normalement, vers la fin septembre, les colonies cessent l'accumulation de miel et de pollen. Un apiculteur qui serait approché pour utiliser ses ruches pour disperser un produit phytosanitaire par la méthode du distributeur voudrait sûrement savoir si cette méthode pourrait affecter sa production de miel. Il était donc judicieux de vérifier ce paramètre.

3.3.1 Matériels et méthodes

La production de miel a été mesurée avec une balance électronique pour calculer le gain de poids des ruches en présence et en absence de fongicides. Nous avons suivi la production de miel entre le 31 mai et le 7 juillet 2005. Trois mesures de poids ont été prises, soit le 31 mai (poids initial), le 20 juin et le 7 juillet 2005 (poids final). Le poids des colonies a été pris en même temps que l'évaluation des populations.

3.3.2 Résultats et discussion

Le tableau 20 présente un cumulatif des quantités totales de la production de miel que les abeilles ont récoltées durant l'expérience (31 mai au 7 juillet) et ainsi que la moyenne pour chacun des traitements.

Tableau 20 :Poids moyen de la production de miel durant et après l'expérience

	Pendant l'expérience 31/05 au 20/06 (kg)		**Après l'expérience 21/06 au 7/07 (kg)**		**Production totale de miel (kg)**	
Diffuseur	Somme 40,80	Moyenne 10,20	Somme 97,85	Moyenne 24,46	Somme 138,65	Moyenne 34,66
	Écart type : 6,35		Écart type : 11,64		Écart type : 13,14	
Élévate	Somme 38,05	Moyenne 9,51	Somme 155,65	Moyenne 38,91	Somme 193,70	Moyenne 48,43
	Écart type : 4,12		Écart type : 13,35		Écart type : 17,29	
Lance	Somme 40,60	Moyenne 10,15	Somme 91,00	Moyenne 30,33	Somme 126,85	Moyenne 42,28
	Écart type : 6,36		Écart type : 7,40		Écart type : 10,43	
Captan	Somme 19,10	Moyenne 4,78	Somme 57,40	Moyenne 19,13	Somme 68,00	Moyenne 22,67
	Écart type : 4,95		Écart type : 1,55		Écart type : 3,93	
Témoin	Somme 42,40	Moyenne 10,60	Somme 60,25	Moyenne 15,06	Somme 102,65	Moyenne 25,66
	Écart type : 2,84		Écart type : 10,43		Écart type : 8,43	
Thricoderma	Somme 51,90	Moyenne 12,98	Somme 129,45	Moyenne 32,36	Somme 181,35	Moyenne 45,34
	Écart type : 5,57		Écart type : 13,30		Écart type : 17,99	

Nous avons suivi la production de miel durant l'expérience. Trois mesures de poids ont été prises, le 31 mai (poids initial : 0 kg), le 20 juin et le 7 juillet 2005 (poids final).

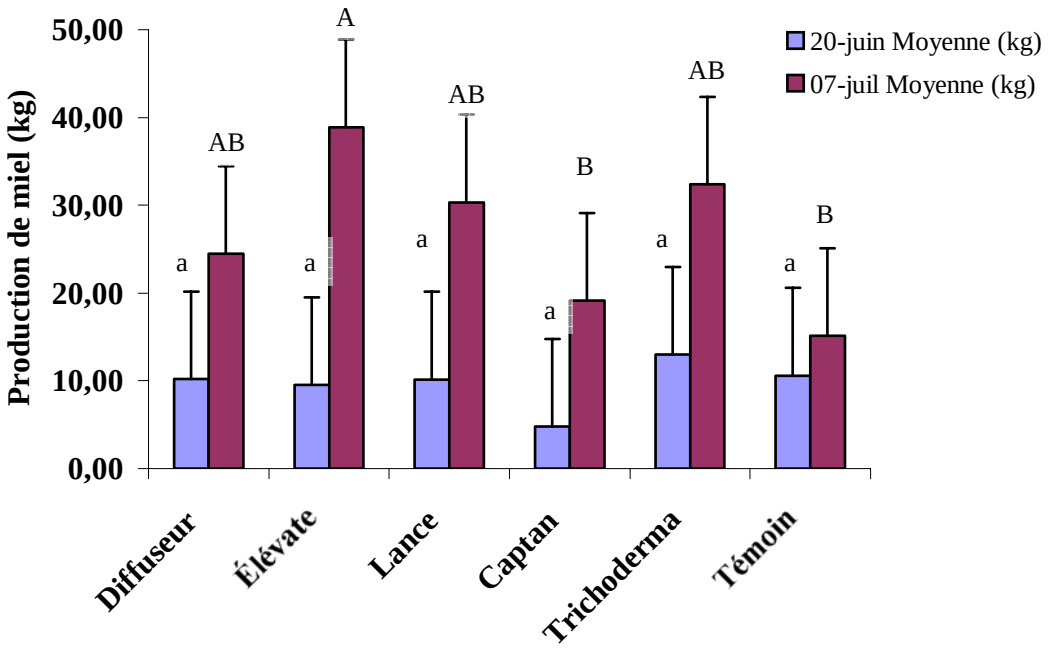

Figure 19 : Production moyenne de miel par traitement (4 colonies/traitement) selon la date (en traitement et post traitement)

Pendant l'expérience (31/05 au 20/06), il n'y a pas de différence significative entre la production de miel au 20 juin 2005 et les différents traitements (F = 2,3251; df = 5; P = 0,0854) (tableau 20). Toutefois, il y a au 7 juillet des différences significatives entre Élevate® (193,70g) et Captan® (68,00g) (P = 0,0132) et entre Élevate® (193,70g) et Témoin (102,65g) (P = 0,0157). Les ruches exposées aux conditions expérimentales au 20 juin, la production de mile est homogène entre tous les groupes, alors que celle du 7 juillet a des différences significatives. ELEVATE produit environ 25 kg de plus de miel que le groupe témoin. En général, le groupe témoin produit moins de miel que tous les autres traitements.

En ce qui concerne le bourdon, les tests de toxicité par ingestion et par contact ne démontrent aucun effet nocif, significativement différent des témoins, pour les trois fongicides testés, et ce pour les deux essaies effectués

4. Conclusions

En générale, l'état de santé de l'abeille lorsqu'elle transporte des fongicides (Captan®, ELEVATE®, LANCE® et ROOTSHEILD ® au moment de son activité de pollinisation sur les fleurs du fraisier est affecté, mais l'impact négatif sur l'ensemble des colonies d'abeilles semblent être négligeable car il semble que les colonies ont un bon pouvoir de résilience.

Une nouvelle approche pour une meilleure compréhension de la toxicité chez l'abeille avec les pesticides est l'analyse de la grosseur des particules. De plus, le côté laboratoire de cette approche ouvre une avenue de recherche sur l'approfondissement des impacts des propriétés hygroscopique des particules en relation avec leur grosseur et l'anatomie et la physiologie du système de respiration et digestif de l'abeille. Aux tests de toxicités que nous connaissons aujourd'hui dont d'ingestion et par contact, nous pouvons maintenant ajouter le test toxicité par inhalation. Par exemple, nos résultats démontrent en laboratoire que seul le Captan parmi les fongicides utilisés, sous la forme liquide, est toxique à l'abeille alors que sous la forme poudreuse tous les fongicides utilisés pour l'expérience démontrent un taux de mortalité élevé.

Au champ, la nouvelle technique, celle du drap blanc, nous a permis de déterminer les impacts des poudres fongiques sur la santé de l'abeille de manière simple et rapide. Contrairement aux trois mètres de longueur de drap blanc initialement prévu pour ces observations, nous avons observé qu'un seul mètre carré placé devant la ruche serait suffisant pour mettre en évidence des impacts une colonie d'abeille. Dans le cas de la présente étude, les symptômes d'une intoxication à la colonie étaient une augmentation d'abeilles mortes devant de la ruche et par conséquent une réduction du nombre de fèces. Le test du rythme de butinage nous a permis de remarquer que le comportement des abeilles a été modifié lorsque celles-ci étaient en contact avec le diffuseur et les fongicides. Toutefois, après l'expérience, on a remarqué que toutes les colonies sont revenues à la normale montrant un bon pouvoir de résilience. Cela nous explique qu'une colonie qui est en santé a la capacité de se remettre d'un stress temporaire, tel que celui qui pourrait être causé par l'insertion d'un distributeur à l'entrée de sa ruche et le passage régulier des butineuses dans une poudre fine.

En analysant la production de miel des colonies on s'aperçoit qu'il y a eu une meilleure récolte de miel pour les fongicides les plus toxiques. Par exemple, les colonies les plus productives sont celles qui étaient sous traitements : ELEVATE, ROOTSHEILD (*Trichoderma*), LANCE et SUPRA CAPTAN Il nous est difficile d'expliquer les variabilités sur la quantité de miel entreposée entre chacun des traitements, mais nous pensons qu'il pourrait y avoir un effet de surcompensation venant de la colonie. Il est reconnu chez les végétaux qu'un certain stress comme celui de la défoliation provoque une surcompensation se traduisant par une augmentation de biomasse supérieure au témoin (Nunes *et al.*, 1990).

En somme, les tests de toxicité des fongicides sur les abeilles individuelles en laboratoire se sont avérés jusqu'à un certain point néfastes, D'autre part, pour une colonie en santé avec un nombre d'abeilles considérable présentes lors de la pollinisation, ces impacts deviennent possiblement modérés et dans certaines conditions voir même positives.

Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de connaître davantage la relation entre la grosseur minimale des particules et la taille des cavités trachéennes de l'abeille. Ceci nous permettrait de déterminer jusqu'où les particules se rendent et donc recommander des grosseurs précises des particules qui ne seraient pas toxique aux abeilles.

5. Références

Alfonsus, E.C. 1935 The cause of dysentery in honeybees. Journal of Economic Entomology. 28: 568-576.

Bailey, B., Scott-Dupree, C., Harris, R., Tolman, J., Harris, B. 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agent registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. Apidologie 36: 623-633.

Chagnon, M., Gingras, J., De Oliveria, D.D. 1898. Effet of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Visits on the Pollinisation Rate of Strawberries. J. Econ. Entomol. 82 (5) : 1350-1353.

Chapman, R.F. 1982. The insects Sturcture and Function, 3 e edition. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, CRSAD. Rapport d'activités, 1998. Selélection de reines selon le comportement hygiénique et d'autres paramètres liés à la productivité.

Conseil national de recherches du Canada 1981. Interactions entre pesticides et pollinisateurs. Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement. Ottawa.

De Oliveira, D.D., Savoie L. 1991. Pollinators of cultivated Strawberry in Quebec. Acta Horticulturae 288, p.420-424.

Fell, R.D., Rajotte, E.G., Yoder, K.S. 1983. Effects of fungicide sprays during apple bloom on pollen viability and honey bee foraging. Environ. Entomol. 12: 1572-1575.

Fléché, C., Clément, M.C., Zeggane, S., Faucon, J.P. 1997. Contamination des produits de la ruche et risque pour la santé humaine : situation en France, Revue. Scientifique. Tech. Off. Int. Epizoot. 16, 609-619.

Gross, H.R., Hamm, J.J., Carpenter, J.E. 1994. Design and application of a Hive-Mounted Device That Uses Honey Bees (Hymenoptera : Apidae) To Disseminate *Heliothis* Nuclear Polyhedrosis Virus. Environ. Entomol. 23 (2) : 492-501.

Johansen, C.A., Mayer, J.D. 1985. Protecting bees from pesticides. Pacific Northwest cooperative extension insect control handbook, Oregon State Univ., Corvallis. 18-22.

Kovach, J., Petzoldt, R., Harman, G.E. 2000. Use of Honey Bees and Bumble Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to Strawberries for *Botrytis* Control. Biological Control (18) : 235-242.

Kubik, M., Nowacki, J., Pidek, A., Warakomska, Z., Michalczuk, L., Goszczyñski, W., Dwuznik, B. 2000. Residues of captan (contact) and difenoconazole (systemic) fungicides in bee products from an apple orchard. Apidologie. 31 : 531-541.

Malone, L.A., Burgess, E.P.J., Gatehouse, H.S., Voisey, C.R., Tregidga, E.L., Philip, B.A. 2001. Effects, of ingestion of Bacillus thuringiensis, toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. Apidologie. 32: 57-68.

Maccagnani, B., Mocioni, M., Gultino, M.L., Ladurner, E. 1999. Application of *Trichoderma harzianum* by grey mould of strawberry : fisrt results. Integrate Control in Glasshouses IOBC Bulletin. 22 (1) : 161-164.

Malone, L.A., Tregidga, E.L., Todd, J.H., Burgess, E.P.J., Philip, B.A., Marwick, N.P., Poulton, J., Christeller, J.T., Lester, M.T., Gatehouse H.S. 2002. Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. Apidologie. 33: 447-458.

Meselson, M., Seeley, T. 1984. Discovery of massive defecation flights by wild honey bees in Southeast Asia supports view that yellow rain is a natural phenomen. Données non publiées.

Mussen, E. 2003. Effects of selected fungicides on almond pollen germination and pollen tube growth and on the development of larval honey bees, http://entomology.ucdavis.edu/faculty/Mussen/beebriefs/Fungicides.pdf.

Nunes, C. 1990. Réponse du plant de pomme de terre à la défoliation artificielles. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal.

Peng, G., Sutton, J.C., Kevan, P.G. 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Plant Pathology. 14 (2) : 117-129.

Pham-Delègue, M-H., Decourtye, A., Kaiser, L., Devillers, J. 2002. Behavioural methodes to assess the effects of pesticides on honey bees. Apidologie. 33: 425-432.

Pimentel De Carvalho, A.C, Dejair, M. 2004. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae Mimosoideae) which causes scrabrood-like symptoms. Apidologie 34.

Stefanidou M., Anthanaselis S., Koutselinis A. 2003. The toxicology of honey bee poisoning. Veterinary and Human toxicology. 45 (5) 261-265.

Stoner A., Wilson W.T. 1985. Toxicity effects and chalkbrood incidence in honey bee colonies fed controlled doses of fungicides. J. Entomol. Sci. 20 (2): 172-178.

Taranov, G.F. 1959. The production of wax in the honeybee colony. Bee World. Vol. 40. no.5 : 113-121.

Tasei, J-N. 1992. Équipe pollinisation, Laboratoire d'apidologie, INRA, 1992.

Von Frisch, K. 1967. The dance language and orientation of bees. Belknap Press, Cambridge.

Whitecomb, W. Jr., Wilson, H.F. 1929. Mecanics of digestion of pollen by the adult honey bee and the relation of undigested parts to dysentery of bees. Agricultural Experiment Station of the University of Wisconsin, Madison. Researche Bulletin 92.

Figure 20 : Test de toxicité par ingestion. Les abeilles alimentent sur un cube de sucre inbibé d'un fongicide dilué dans l'eau à la dose recommandée au champ.

Figure 21 : Test de toxicité par ingestion et par contact sous température et humidité contrôlées. (Température 28ºC; humidité 60 %)

Figure 22. Remplissage du distributeur devant la ruche.

Figure 23: La technique du drap blanc pour évaluer le nombre de fèces déposées par les abeilles.

SECTION VII

ANALYSE DES CONSTITUANTS DE LA RUCHE

Il avait été prévu de faire des analyses des constituants de la ruche afin de voir si les produits déposés dans le tiroir du distributeur, et qui adhéraient à la surface des abeilles lors de leur passage, étaient introduits dans la ruche par ces dernières. Nous souhaitions faire analyser le miel, la cire et le pollen provenant des ruches qui avaient reçus un distributeur. A cet effet, des échantillons de trois constituants de la ruche ont été récoltés après la miellée. Seulement les cadres qui avaient été remplis par les abeilles durant la période ou les distributeurs étaient en place ont été échantillonnés. Lorsque nous avons remis les échantillons à M. Serge Lantagne, chimiste au Centre d'expertise et d'analyse des aliments du MAPAQ, nous avons appris que ce laboratoire n'avait aucune technique d'analyse au point pour deux des trois fongicides de synthèse qui devaient être analysées. Effectivement, le LANCE et le ELEVATE sont des produits relativement nouveaux sur le marché et sont reconnus pour être sécuritaires. Le besoin de mettre au point une méthode d'analyse de ces produits ne s'était pas encore présenté. Des plus, il semblerait qu'on n'avait pas de méthode d'analyse pour la cire et le pollen. Le développement d'un technique de laboratoire était faisable, mais aurait impliqué plus d'efforts et de temps qui avaient été initialement prévus lors de l'entente de partenariat. Seuls les les analyses des échantillons de miel pour le SUPRA CAPTAN ont été réalisées, ainsi, évidemment, que des échantillons témoins. Les résultats démontrent des résidus de l'ordre de 0,009 mg/kg (tableau 21). Ces chiffres obtenus pour le fongicide qui s'était montré le plus nocif lors de nos tests de toxicité, sont légèrement en dessous des normes d'acceptation de l'ARLA (0,1 mg/kg). Les autres fongicides non analysés étant plus sécuritaires, il est fort probable que des résidus de cet ordre soient plus qu'acceptables.

Néanmoins, ces chiffes démontrent que les fongicides placés dans le tiroir du distributeur aboutissent dans le miel, et probablement dans la cire et le pollen aussi et ceci malgré le fait que les deux distributeurs (pour abeilles et pour bourdons), sont conçus pour éviter que les pollinisateurs passent dans le fongicide à leur retour du champ.

Afin de protéger le consommateur, il serait préférable que l'apiculteur ne dispose pas des hausses à miel sur le dessus des hausses à couvain, de tel forme qu'il n'y aurait pas d'emmagasinage de miel vouée à la consommation humaine.

Tableau 21 : Résultats des analyses de résidus dans le miel pour le SUPRA CAPTAN.

No.ruche	Résultats	Bloc
	(mg/kg)	
205	non détecté	Témoin
212	0,009 ppm	Captan
223	non détecté	Captan
225	non détecté	Témoin
230	non détecté	Témoin
233	0,004 ppm	Captan
248	0,009 ppm	Captan
252	non détecté	Témoin

SECTION VIII
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION DU RAPPORT

Les producteurs de fraises du Québec adoptent assez rapidement les nouvelles technologies de production des fraises telles que la location de ruches durant la période de floraison, la culture sur billon, les nouveaux cultivars, l'utilisation de films plastiques et de l'irrigation goutte à goutte, nouvelles régie de production… Ils demandent sans cesse de nouveaux pesticides moins nocifs pour l'environnement. Cependant, la grande valeur économique de leur production les rend conservateurs ou plus réticents à diminuer le nombre de pulvérisations nécessaires au contrôle des ennemis. Le cas de la Pourriture grise causée par *Botrytis cinerea.* est une bon exemple : Même si les recherches des dernières années ont prouvé hors de tout doute que la période de floraison est très importante pour provoquer dans les fruits la plupart des infections latentes qui pourront résulter en pourriture des fruits en pré ou post-récolte, ils continuent d'appliquer des fongicides généralement aux 7 jours, après la floraison contre cette maladie. Nous espérons que les résultats supplémentaires obtenus lors de ce projet pourront les convaincre de faire mieux. D'autre part, l'utilisation de l'abeille ou/et du bourdon pour transporter de façon efficace sur les fleurs les produits fongicides pour les protéger conte le *Botrytis* devra être très bien prouvé en parcelles expérimentales et surtout en champ de producteurs, avant son acceptation définitive. Nos recherches ont révélés des problèmes à résoudre mais aussi des opportunités à développer (manque de butinage en fraisières mais assurance de bon butinage en framboisières).

Toutefois, malgré les imprévus, plusieurs points positifs issus de nos travaux sont venus contribuer de façon appréciable à l'avancement des connaissances concernant la méthode de faire distribuer un agent de lutte par des pollinisateurs.

Essais de toxicité des fongicides envers les pollinisateurs et le pollen de fraisiers :

Les deux buts du projet étaient 1) de vérifier si les fongicides utilisés lors de la floraison pour contrôler les infections latentes de *Botrytis* pouvaient être nocifs au pollen (mauvaise pollinisation responsable de difformités des fruits et /ou d'un manque de calibre…..); 2) de vérifier leur toxicité à l'égard des pollinisateurs (abeilles et bourdons), afin de n'utiliser durant la période de floraison, que les produits qui ne leur sont pas nocifs. Le troisième but ou objectif découle des deux premiers : si des fongicides ne sont pas nocifs ni au pollen ni aux pollinisateurs, pourquoi ne pas les faire transporter par les abeilles sur les fleurs, où ils sont indispensables?

Pour être de bons vecteurs de l'agent phytosanitaire choisi, ceux-ci doivent marcher dans le produit sous forme de poudre, impliquant ainsi un contact direct avec l'ingrédient actif et le vecteur. Il va sans dire que les impacts conséquents devaient être négligeables. Par la suite, cette même poudre, par l'intermédiaire de l'abeille ou du bourdon, devait rentrer en contact avec la fleur du plant à protéger. Donc, en plus d'être non nocif à l'abeille et au bourdon, les fongicides choisis devait être non nocifs au pollen porté par les étamines des fleurs visitées.

À part le fongicide biologique ROOTSHEILD, les fongicides utilisés étaient homologués contre la Pourriture grise (*Botrytis cinerea*) en fraisières et framboisières. Des ces 18 fongicides homologués et sélectionnés pour les essais, trois répondent aux attentes de sécurité pour ces deux aspects. Il s'agit des fongicides de synthèse commercialisés sous les noms de LANCE® et ELEVATE®, ainsi que le bio-fongicide Rootshield® (non encore homologué). Le fongicide SUPRA CAPTAN® a causé les impacts les plus fortement perceptibles pour les pollinisateurs ainsi que pour la germination du pollen de la fleur du fraisier. Il a donc été utilisé comme témoin servant à détecter les impacts possibles en situation réelle sur le terrain.

Mesure de la capacité de dispersion du fongicide sur les fleurs par les abeilles

Il avait été prévu de vérifier l'efficacité de distribution des fongicides par les abeilles à l'aide de colorants (marqueurs, pigment) non toxiques. Les pigments testés se sont tous avérés soit impossible à détecter sur les fleurs au champ, soit toxiques pour le pollen des fleurs du fraisier. Cependant, il restait la solution de la culture du bio fongicide sur agar. Il était ainsi possible de vérifier si les pollinisateurs (abeilles et bourdons) vecteurs, ainsi que les fleurs visitées avaient été contaminés par le bio-fongicide en question. Cette technique avait déjà été utilisée par J. Kovac qui avait publié sa méthode. Cependant, le milieu de culture préparé par l'équipe du Dr Kovac était difficile à lire à cause des nombreux agents pathogènes non-prévus qui poussaient sur la culture. Pour cette raison, nous avons entrepris de mettre au point une méthode de culture plus adéquate du *Trichoderma*.

La mise au point de cette technique constitue une contribution importante pour le domaine agricole car ce champignon se retrouve de façon naturelle dans les sols et on tente souvent de déceler sa présence. Aucune autre méthode existante et utilisée présentement au Québec ne permet un succès de culture aussi élevé du *Trichoderma*.

En utilisant cette technique de culture, nous avons pu démontrer qu'en quittant le distributeur Houle, tous les insectes portaient de la poudre fongicide et qu'après une première visite, entre 35 % (abeilles au champ) et 100 % (bourdons en serre) des fleurs visitées par un pollinisateur étaient inoculées. On peut donc présumer que ces fleurs étaient protégées contre la Pourriture grise. Ces pourcentages indiquent toutefois que plus d'une visite de pollinisateur seraient nécessaires pour s'assurer qu'une fleur soit efficacement inoculée. Nos résultats montrent donc que l'abeille domestique, comme le bourdon fébrile, possèdent le potentiel pour acquérir du déposé dans les distributeurs – Houle, et de le disperser dans les fleurs de la culture de fraises. Nous n'avons évidemment pas reproduit ces essais avec d'autres fongicides car les fongicides de synthèse ne possèdent pas l'avantage de pouvoir être mis sur culture. Leur présence, en taux si infimes, sur un pollinisateur ou sur une fleur est donc plus difficile à déceler. Une analyse chimique à taux de détection infiniment précis serait nécessaire car, contrairement à la culture sur agar, il n'est pas possible d'amplifier une présence du produit chimique. Toutefois, vu la nature physique similaire (poudres) des produits testés, il est probable que la dispersion serait comparativement efficace.

Le distributeur et les impacts sur la colonie d'abeilles

Nous avons été satisfaits de la dernière version du distributeur Houle utilisé durant les essaies de l'été 2005. Le seul problème qui subsistait après les modifications techniques était celui de l'accumulation d'humidité dans le tiroir. Un choix d'emplacements pour les ruches qui assurerait une exposition au soleil tôt le matin serait la meilleure façon de contrer à ce problème. Le distributeur Houle est un concept unique à notre projet par le fait qu'il sépare adéquatement les entrées et les sorties des abeilles sur la plate-forme d'envol de la ruche. On évite ainsi un passage des abeilles dans le produit avant de pénétrer à l'intérieur de la colonie. Nonobstant, des traces du fongicide SUPRA CAPTAN ont pu être décelées, dans le miel des ruches utilisées lors des essais. Toutefois, les analyses des accumulations de SUPRA CAPTAN dans le miel démontrent que malgré un usage continuel du distributeur durant 3 semaines les résidus de SUPRA CAPTAN sont demeurés de beaucoup au deçà du seuil accepté par l'ARLA. Ce fait démontre que l'utilisation d'un distributeur pouvant séparer les entrées et les sorties est essentielle à la sécurité de l'abeille. De plus, le produit ainsi dispersé par un pollinisateur doit être le moins nocif possible pour la santé des organismes le dispersant et pour les consommateurs des produits de la ruche.

Tout en se concentrant principalement sur l'efficacité de répression de cette méthode contre le ravageur ou le pathogène visé, il demeurera toujours important de tenter de minimiser les impacts négatifs sur la colonie d'abeilles.

Nous avons découvert que la grosseur des particules ainsi que la capacité hygroscopique du produit utilisé était très importante en regard de l'effet nocif que le produit pouvait avoir sur l'abeille. Le contact direct de l'abeille avec une poudre trop fine cause de la mortalité, même si cette poudre est inerte, car elle pénètre probablement dans le système trachéen. Le pouvoir hygroscopique de la poudre vient empirer les choses. En plus, une poudre qui a une capacité supérieure de retenir l'eau devient plus problématique au point de vue technique, lorsque des problèmes d'accumulation d'humidité surviennent. Ces observations doivent être prises en considérations lors de la mise au point ce cette méthode de dispersion de tout autre produit phytosanitaire par les pollinisateurs. Ainsi, peu importe l'ingrédient actif du produit phytosanitaire ainsi appliqué à une culture, une attention doit être portée à ses propriétés physiques. Les particules doivent être assez petites pour pouvoir être transportées par les pollinisateurs, mais assez grosses pour ne pas pénétrer aisément la trachée et les stomates des insectes qui seront en contact très étroits avec la poudre à disperser. Le respect de ces marges est facilement réalisable, il s'agit seulement d'en être conscient et de l'appliquer. Il serait important de connaître davantage la relation entre la grosseur minimale des particules ainsi que la taille des cavités trachéennes de l'abeille afin de déterminer jusqu'où les particules se rendent et donc recommander des grosseurs précises des particules qui ne seraient pas létales aux abeilles.

Nous réalisons que présentement, d'autres équipes de recherche envisagent des essais similaires dans d'autres cultures, avec d'autres types de produits de lutte. Les résultats de nos travaux permettront un choix éclairé des types de produits adéquats pour usage avec des distributeurs.

En ce qui concerne les impacts sur la santé des colonies d'abeilles, certains impacts négatifs ont été perçus lors de la période durant laquelle les distributeurs étaient fixés aux ruches. des ruches munie du dispositif de dispersion de produire autant que les colonies témoin. En somme, les fongicides sont jusqu'à un certain point néfastes, mais pour une colonie en santé avec un nombre considérable d'abeilles lors de la pollinisation, ces impacts deviennent modérés. Il va sans dire que ces résultats ne sont valables que pour les produits utilisés dans le cadre de notre étude, qui avaient été sécuritaires lors d'essais préliminaires.

Afin de protéger le consommateur, il serait préférable que l'apiculteur ne dispose pas des hausses à miel sur le dessus des hausses à couvain. Ainsi, n'y aurait pas d'emmagasinage de miel voué à la consommation humaine.

Le temps d'application des fongicides en champ : la surprise du projet !

Lors des tests de toxicité des fongicides sur le pollen, nous avions noté que la viabilité du pollen était fortement influencée par sa durée d'exposition à une forte humidité ou à la présence d'eau, ce qui pourrait avoir une répercussion évidente sur la gestion des applications de fongicides (temps d'application, toxicité, rémanence, efficacité, etc…) et leur efficacité de contrôle de la Pourriture grise. Ces observations ont mené à une autre série de tests concernant l'efficacité de l'application des fongicides Boscalide et de CAPTAN sur les fleurs de fraisiers, pour lutter contre la Pourriture grise des fruits. Afin de confirmer que les infections par *Botrytis* avaient lieu durant la floraison et de bien vérifier l'efficacité des fongicides à ce stade, nous avons déterminé le % d'infections latentes de Botrytis sur les jeunes fruits verts provenant 5 à 7 jours plus tard de fleurs traitées ou non avec ces fongicides. Le pourcentage des infections latentes de *Botrytis* détectées sur les très jeunes fruits verts issus de fleurs non traitées, que ce soit des parcelles témoins ou de fleurs apparues après les traitements fongicides, est toujours très élevé (65 à 100 %), dépendant des conditions météorologiques et de l'importance de l'inoculum

Ces résultats nous indiqueraient que quatre applications de fongicides, au lieu de 2, durant la floraison des cultivars conventionnels, seraient nécessaires pour assurer une bonne protection des fruits contre la Pourriture grise. Il est probable que toutes les autres applications seraient peu ou pas rentables. Il semblerait également qu'il vaudrait mieux appliquer les fongicides après plutôt qu'avant une pluie. Ces résultats devraient être confirmés en fraisières de producteurs et, ils devraient être aussi réalisés en framboisières, où les mêmes conditions se retrouvent aussi.

Conclusion

En général, les travaux effectués dans le cadre de ce projet ont démontré que la méthode de distribution de fongicides, ou tout autres produit phytosanitaire disponible sous forme de poudre, pouvait être dispersé adéquatement sur des fleurs à l'aide d'un distributeur placé à l'entrée d'une ruche d'abeilles domestiques standard ou d'une ruchette de bourdons commerciale. Nos résultats soulignent cependant qu'il faut porter attention à la nature du

produit à être dispersé pour la sécurité des pollinisateurs et la germination du pollen des cultures à protéger.

Tel que mentionné à quelques reprises dans le présent rapport, les périodes de terrain en fraisières n'ont pas été aussi fructueuses que nous l'aurions souhaité à cause de la rareté des abeilles qui butinaient sur les fleurs. Des essais en framboisières durant l'été 2004 nous portent à croire que cette méthode de distribution d'un produit phytosanitaire serait plus efficace sur cette culture qui est reconnue pour être plus attractive que la fraise. Il aurait donc été souhaitable de pouvoir reprendre nos travaux plus à fond sur la framboise. Nous espérons pouvoir poursuivre des essais sur cette dernière culture dans un avenir rapproché.

SECTION IX
DIFFUSION DES RÉSULTATS

Thibodeau, Pierre O. 2003. La gestion des pesticides pour le contrôle de la Pourriture grise de la fraise, et de la brûlure des dards du framboisier Les Journées horticoles des Laurentides des **22**, 23, 24 janvier 2003 (Saint-Eustache)

Thibodeau, Pierre O - 2003. Premier essai d'introduction de bourdons en fraisières » Semaine horticole 2003 Auberge des Seigneurs de Saint-Hyacinthe. Journée petits fruits du 21 février.

Thibodeau, Pierre O. 2004. Présentation du projet 2070 CDAQ. Les journées de formation du « groupe d'experts en protection des Petits Fruits » du RAP Petits Fruits du MAPAQ. (Mars).

Cadorette, Éric. 2004. Usage des bourdons pour distribuer un fongicide (Conférence à propos de l'élevage des bourdons). Les journées de formation du « groupe d'experts en protection des Petits Fruits » du RAP Petits Fruits du MAPAQ. (Mars).

Thibodeau, Pierre O et Chagnon, Madeleine. 2004. Présentation du projet 2070 CDAQ, comité apicole du CRAAQ, Deschambault (Avril)

Cadorette, Éric et Pierre O. 2004. Thibodeau. Démonstration du distributeur Houle attaché à la ruche, pour distribution de fongicides sur les fleurs pour lutter contre *Botrytis cinerea* » Tournée Phytoprotection du CRAAQ pour les conseillers et conseillères agricoles: Ferme expérimentale de Deschambault : (8 juillet).

Cadorette, Éric et Pierre O. 2006. Utilisation du Bourdon en fraisières. Journées de formations Fraise- du MAPAQ. Organisé par Luc Urbain à Saint-Nicolas. Mars 2006-07-19

Cadorette, Éric. 2005. Écotoxicologie et impact de fongicides et du *Trichoderma harzianum* sur la répression de la Pourriture grise (Botrytis cinerea), sur les insectes pollinisateurs (Apis melifera et Bombus impatiens) et sur la pollinisation du fraisier. Présentation de projet de maîtrise (BVG-63659), Université Laval (Novembre)

Boulianne Jocelyn (2005). Les fongicides dispersés par l'abeille (*Apis mellifera* L.) influencent-ils la santé des colonies. Présentation de projet de maîtrise : Université du Québec à Montréal (Décembre)

Conférences inscrites :

Chagnon, Madeleine. 2006. Utilisation de l'abeille et du bourdon comme vecteurs d'un produit phytosanitaire sous forme de poudre. Réunion conjointe de la Société d'entomologie du Canada et de la Société d'entomologie du Québec qui aura lieu à l'Hôtel Holiday Inn Midtown (420, rue Sherbrooke Ouest, Montréal, Qc) du 18 au 22 novembre 2006.

de Oliveira, Domingos. 2007. L'efficacité de l'abeille pour le transport d'un produit phytosanitaire à partir d'un distributeur installé sur sa ruche. Colloque en apiculture. ITA St Hyacinthe, Samedi le 24 février.

Publications :

Fiche technique de vulgarisation en cours d'élaboration par Éric Bellemare du CRSAD avec la collaboration de l'équipe du projet CDAQ 2070:sous le titre : « Production de fraises : amélioration des rendements et de la qualité des fruits par une gestion écologique et rentable des fongicides des et des pollinisateurs ». La révision du document est en cours.

Les résultats, une fois le rapport approuvé par le CDAQ, seront présentés sur Agri-réseau(CRAAQ).

Les résultats sur l'e nocivité de certains fongicides pour le pollen du fraisier et le temps d'application des fongicides seront présentés dans la revue Primeur (Revue des producteurs maraîchers du Québec)

SECTION X
BILAN DES BIENS LIVRABLES

1. Pièces justificatives : Voir annexe A

2. Compte rendu des activités : Le présent rapport

3. Résultats des essais en serre et en laboratoire sur la toxicité des fongicides
A) Pour les pollens : Section II
B) Pour les abeilles : Section VI

4. Résultats des essais au champ
A) Efficacité de distribution : Section V
B) Effets sur la moisissure grise : Section III

5. Analyse des constituants de la ruche : Section VII

6. Caractéristiques du distributeur mis au point : Section IV et Section VI

7. Recommandations sur une méthode d'application des fongicides à partir d'un distributeur monté sur une ruche : Section VIII

8. Plan de diffusion réalisé : Section IX

BIENS LIVRABLES NON PRÉVUS

1. Mise au point d'une méthode de PCR pour détecter la présence latente de *Botrytis* dans les fruits verts : Section II.

2. Mise au point d'une méthode de culture du *Trichoderma* sur agar afin de pouvoir déceler sa présence sur les abeilles, les bourdons, les fruits et les fleurs : Section V.

3. Vérification de l'impact des propriétés physiques (grosseur, hygroscopie) des poudres fongicides sur la mortalité des abeilles : Section VI.

4. Détermination de la meilleure période d'application des fongicides en relation avec la phénologie du plant de fraise et les conditions d'humidité : Section III.

4. Détermination de l'efficacité des fongicides appliqués durant la floraison sur le contrôle de la Pourriture grise et le nombre d'applications nécessaires à ce stade pour bien contrôler la maladie en pré et post-récolte. Section III

SECTION XI – Plan de financement -

SECTION XI
BILAN DU PLAN DE FINANCEMENT

La gestion du plan financier s'est avérée assez complexe car il impliquait plusieurs partenaires importants, notamment le CRSAD et l'IRDA. Ces organismes se sont montrés fidèles à leurs engagements, fournissant le personnel, les frais de déplacements nécessaires à la réalisation des activités de ces deux années de projet.

Considérant la complexité du budget à gérer, le bilan financier est assez satisfaisant. Pour le CRSAD, les dépassements de coûts ont été surtout au niveau du déplacement du personnel (1491.55$), du déplacement des ruches (124.97$) et de l'achat de matériel de terrain (478.31$). Ces frais ont été absorbés par le CRSAD (tableau 22). Une partie de ces coûts a été récupéré au niveau des honoraires de M. Eric Cadorette (1121,26$). Ce montant, ainsi de que de nombreuses autres dépenses, ont été défrayés par l'IRDA. (tableau 24)

La participation du CRSAD, par son prêt de personnel au projet, montre un bilan presque nul par rapport à son engagement de départ, avec un surplus de moins de 100$ (83,90$). (tableau 23).

Les factures des dépenses inscrites au tableau 22 sont présentées à l'annexe A. Les pièces justificatives confirmant la participation des partenaires, selon leurs engagements de départ, sont aussi présentés dans l'annexe B.

Tableau 22. Bilan financier des dépenses accordées par le CDAQ

FICHE SYNTHÈSE
PROJET 56-2003
PRODUCTION FRAISES ET FRAMBOISES
RÉSUMÉ DES DEPENSES

		2004	2005	
MAIN-D'ŒUVRE	**BUDGET ACCORDE**	**DEPENSES** AN 1	DEPENSES AN 2	SOLDE
MADELEINE CHAGNON	26 400,00 $	16 400,00 $	10 000,00 $	0,00 $
ERIC CADORETE	23 998,29 $	12 558,01 $	10 319,02 $	1 121,26 $
ANNE-MARIE-MORASSE	5 561,71 $		5 561,71 $	
JOCELYN BOULIANNE	20 000,00 $	10 000,00 $	10 000,00 $	0,00 $
AIDE DE TERRAIN (DAVID-SAINT-ONGE) EMILE HOULE	1 660,00 $	1 260,00 $	400,00 $	0,00 $
MAIN D'ŒUVRE PONCTUELLE	780,00 $	780,00 $		0,00 $
SOLANGE LAROCHE				
FRAIS DE LABORATOIRE				
LABORATOIRE ET MIELLERIE	3 000,00 $	1 500,00 $	1 500,00 $	0,00 $
AUTRES FRAIS (achats de fournitures, équipements)				
FRAIS DEPLACEMENT DU PERSONNEL	4 250,00 $	2 040,53 $	3 701,02 $	-1 491,55 $
DEPLACEMENT DES RUCHES	450,00 $	129,60 $	445,37 $	-124,97 $
MATERIEL DE TERRAIN ET LABORATOIRE	1 900,00 $	1 374,32 $	1 003,99 $	-478,31 $
FRAIS ADMINISTRATION	2 000,00 $	1 000,00 $	1 000,00 $	0,00 $
TOTAL	**90 000,00 $**	**47 042,46 $**	**43 931,11 $**	**-973,57 $**

Tableau 23 : Bilan financier de la participation du personnel du CRSAD

	PRÉVU		PARTICIPATION RÉELLE	Bilan
EMILE HOULE (CONTRIBUTION CRSAD)	7 425,00 $		6 809,81 $	615,19 $
MICHAEL BENOIT, (CONTRIBUTION CRSAD)	6 750,00 $		2 084,29 $	4 665,71 $
JEAN-PIERRE LEFEBVRE (CONTRIBUTION CRSAD)	1 456,00 $		5 661,85 $	-4 205,85 $
GABRIEL CALIXTE (CONTRIBUTION CRSAD)	0,00 $		991,15 $	-991,15 $
				83,90 $

Tableau 24 : Bilan financier de la participation de l'IRDA

Salaire Éric Cadorette	**17 976 $**
P.O Thibodeau	**56 532**
François Charrier	**21 378**
Laboratoire et chambre de croissance, IRDA	**12 500**
Matériel pour rapport et diffusion des résultats	**400**
	108 786 $

Rapport financier final non vérifié

Du		**29-sept-03**	**01-juin-04**	**01-déc-04**	**20-août-05**	
au		**31-mai-04**	**30-nov-04**	**19-août-05**	**31-déc-05**	**TOTAL**
Revenus:	**10 470,89 $**		**3 310,36 $**	**11 022,75 $**	**1 732,12 $**	**26 536,12 $**
Dépenses:						
Déplacements	**23,27**		**15,86**	**446,78**	**868,02**	**1 353,93**
Matériel terrain et laboratoire	**1 052,51**		**131,60**	**415,20**	**254,00**	**1 853,31**
Salaire et bénéfices marginaux	**9 395,11**		**3 162,90**	**10 160,77**	**5 216,78**	**27 935,56**
	10 470,89		**3 310,36**	**11 022,75**	**6 338,80**	**31 142,80**
Excédent des dépenses sur les revenus	-		-	-	**(4 606,68) $**	**(4 606,68) $**

Budget du projet moins dépenses comptabilisées **(90000-85772.16)**

Compte à recevoir **4 227,84 $**