

# Green Muscle Manuel 2000



CAB International



IITA



LUBILOSA (LUtte Biologique contre les LOcustes et les Sauteriaux)  
Biological Locust and Grasshopper Control Project

## Table de matières

<b>1. Introduction</b>	<b>2</b>
<b>2. Résultats des Essais aux Champs</b>	<b>3</b>
<b>3. Stockage</b>	<b>5</b>
<b>4. Formulation</b>	<b>6</b>
<b>5. Application</b>	<b>6</b>
<b>6. Échantillonnage de Résultats d'Application</b>	<b>7</b>
<b>7. Identification et Qualités Standards</b>	<b>8</b>
<b>8. Production</b>	<b>9</b>
<b>9 Régulations importantes</b>	<b>9</b>
<b>Appendice</b>	<b>10</b>
<i>I. Test de germination</i>	<b>10</b>
<i>II Glossaire/Acronymes</i>	<b>11</b>
<i>III. Adresses de LUBILOSA</i>	<b>12</b>

Vers 5, Niamey, Juin 2000  
Dr J. Langewald, IITA,  
Douro Kpindou, IITA,  
O. Zakaria, AGRHYMET.



## 1. Introduction

Le projet de Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux (LUBILOSA) a été initié en 1989 en vue de répondre aux soucis de préservation de l'environnement liés à l'utilisation accrue des insecticides chimiques contre les locustes et sauteriaux lors des invasions survenues durant la période 1986-1989. Financé par les gouvernements Canadien, Néerlandais, Suisse, Britannique ainsi que les USA, le projet est exécuté par le laboratoire britannique (Ascot) de l'Institut International pour la Lutte Biologique (CAB International), l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) station de Cotonou, INSAH (CILSS) à Bamako, Mali, AGRHYMET/DFPV (CILSS) à Niamey, Niger et GTZ (Coopération Allemande) à Eschborn, Allemagne.

Au début du projet, des micro-organismes bénéfiques ont été choisis comme agents biologiques pour la lutte contre les sauteriaux et les criquets. Ces insectes ont été considérés comme étant trop mobiles et se reproduisant trop rapidement pour permettre une lutte biologique classique en utilisant des hyménoptères, par exemple. Dans le cadre de la lutte par la méthode augmentative ces micro-organismes doivent être pulvérisés. Ils ont l'avantage d'être produits en grandes quantités sur un milieu artificiel.

Les micro-organismes, agents de lutte microbiologique, n'ont pas été suffisamment exploités dans les pays industrialisés parce que leur exploitation posait un certain nombre de problèmes. Les champignons en particulier ont toujours été perçus comme étant difficiles à manipuler et nécessitant des conditions d'humidité particulières pour être efficaces. L'un des principaux succès du projet LUBILOSA a été de montrer que la nécessité d'une forte humidité ambiante peut être contournée par une pulvérisation des spores du champignon sous forme de suspension huileuse. Le "Green Muscle®" peut être appliqué contre les locustes même sous les conditions désertiques.

Green Muscle® consiste en des spores du champignon *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en forme de poudre sèche (formulations TC) ou en forme de concentration huileuse de spores (formulations OF). Les souches du champignon *Metarhizium* utilisées dans "Green Muscle®" infectent et tuent les locustes et les sauteriaux. "Green Muscle®" s'applique sous forme de suspension huileuse à l'aide d'atomiseur à disque rotatif. Bien que son application soit similaire à celle des insecticides chimiques en formulation Ultra Bas Volume, "Green Muscle®" n'agit pas instantanément. En effet, les locustes et sauteriaux peuvent mettre 6 à 10 jours avant de succomber à l'action du champignon; toutefois, ils sont progressivement paralysés durant cette période. La consommation et le déplacement des insectes sont considérablement réduits 3 à 4 jours seulement après l'application. L'un des plus importants avantages est que, contrairement aux insecticides modernes dont l'effet ne dure pas sur la zone traitée, les spores elles peuvent survivre pendant plusieurs semaines selon les conditions environnementales et continuer d'infecter des sauteriaux sains. Cet effet permet d'éviter les traitements multiples qui sont souvent nécessaires dans le cas de l'utilisation des insecticides modernes.

Sur le plan toxicologique, "Green Muscle®" présente moins de risque que les insecticides synthétiques et il peut être utilisé aux abords des zones aquatiques. Les études éco-toxicologiques menées aux champs n'ont pas révélées des effets néfastes sur les insectes non cibles. Des tests sur des organismes non cibles ont été réalisés par LOCUSTOX au Sénégal par Agriculture Canada et par LUBILOSA. Aucune infec-

tion n'a été enregistrée sur les oiseaux, les poissons, les coléoptères (Coleoptera) et les punaises (Heteroptera). Néanmoins, à l'issue des tests de laboratoire à forte exposition (tier I) certains hyménoptères exposés incluant des parasites et des abeilles ont été infectés à un niveau très bas par *Metarhizium*.

Le *Metarhizium* a été largement testé pour sa sécurité d'emploi par un laboratoire indépendant (IITRI, Chicago). Aucune souche ne s'est avérée infectieuse pour les mammifères et les souches recommandées pour l'emploi ne comportent aucun effet secondaire indésirable. Cependant, les mesures de protection sont recommandées pendant l'application pour éviter des réactions allergiques.

Le projet se trouve actuellement dans sa quatrième phase. Au fur et à mesure que l'on développait le "Green Muscle®" et que des essais se réalisaient sur le terrain, le projet publiait plusieurs documents scientifiques (une liste complète est disponible sur demande) et participait à des colloques et réunions. Le projet s'est également engagé dans la formation des chercheurs nationaux. Le développement de "Green Muscle®" a compris la collecte des isolats du champignon à travers un réseau de laboratoires en Afrique; la sélection des meilleures souches pour l'utilisation contre les acridiens, le développement d'une méthode de production de masse; la recherche des voies et moyens de stockage des spores; enfin des études sur la sécurité toxicologique non seulement pour l'homme mais également pour les autres organismes non cibles ainsi que pour l'environnement. Des essais aux champs et des études écologiques ont été effectués. Des essais participatifs ont été conduits en collaboration avec les paysans, les ONG et les services nationaux. Au cours de la présente phase de LUBILOSA, le projet envisage de stimuler la demande, d'assurer la provision, de concevoir et de défendre les stratégies d'utilisation. Les études socio-économiques réalisées ont permis de définir le rôle que "Green Muscle®" peut jouer dans le domaine de la lutte intégrée contre les sauteriaux et les criquets. Toutes les études ont été menées en collaboration avec les pays suivants: Bénin, Ghana, Niger, Mali, Mauritanie, Sénégal, Burkina Faso, Madagascar, Afrique du Sud et Australie.

## 2. Résultats des Essais aux Champs

"Green Muscle®" est efficace contre tous les stades de développement, (larves et adultes) des sauteriaux.

Les premiers bons résultats de "Green Muscle®" ont été obtenus sur les acridiens non migrateurs comme le criquet puant (*Zonocerus variegatus*), le criquet du riz (*Hieroglyphus daganensis*) au Bénin et le criquet *Phaulacridium* en Australie. Avec des parcelles plus grandes et des méthodes d'échantillonnage améliorées, de bons résultats ont également été obtenus avec des sauteriaux du Sahel du genre *Krausella amabile*, *Kraussaria angulifera* et *Oedaleus senegalensis*.

Les essais contre les bandes larvaires du criquet pèlerin en Mauritanie ont également été couronnés de succès suite à l'élimination de ces bandes par le champignon; il en est de même pour le criquet

*Locustana pardalina* en Afrique du Sud et le criquet *Chortoicetes terminifera* en Australie.

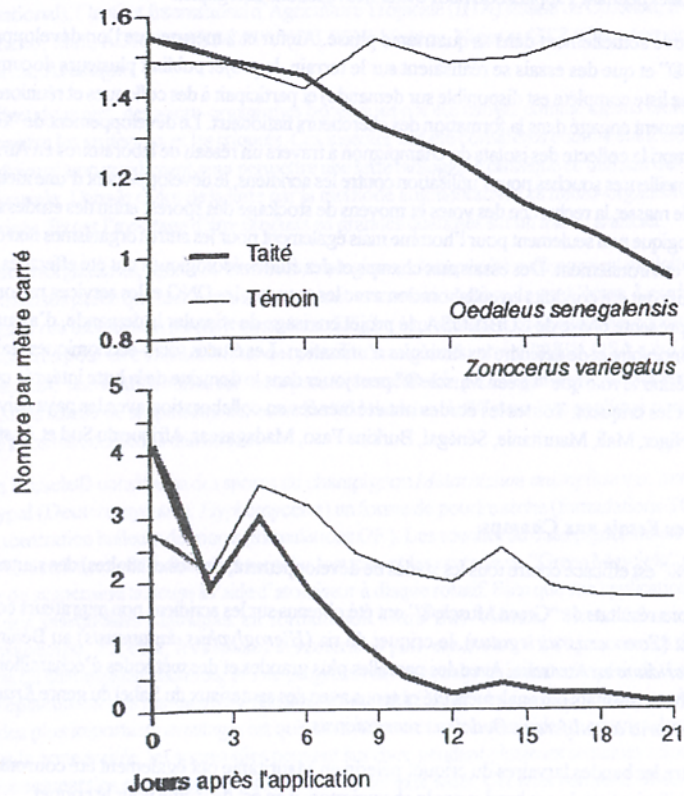
Les données des applications à partir de véhicules ou d'avion, en collaboration avec la Direction de Protection des Végétaux contre le criquet sénégalais (*O. senegalensis*), entre 1995 et 1997 au Niger, dans des parcelles de 50 à 800 ha montrent une baisse de la population après un traitement avec la souche IMI 330189.

Les données d'un essai aux champs contre *Z. variegatus* en 1994 au Bénin montrent une baisse de la

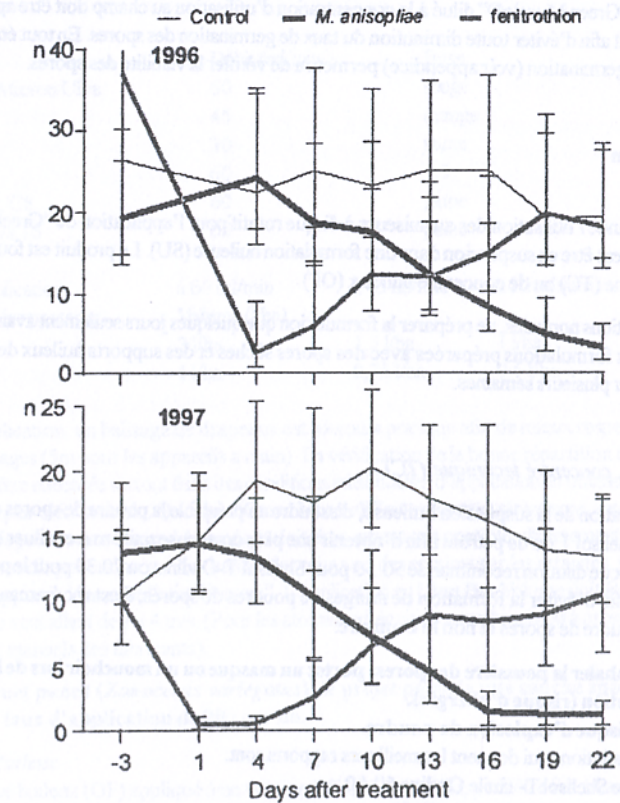


population après un traitement avec la souche I 91609. Le graphique ci-dessus montre que *Z. variegatus* est plus susceptible que *O. senegalensis*.

Baisse de la population après l'application de "Green Muscle®"



Baisse de la population après l'application de "Green Muscle®" en comparaison avec Fenitrothion sur des parcelles de 50ha et 800ha



3. Stockage

Le "Green Muscle®" est fourni sous forme de poudre sèche (formulation TC) mélangé avec du silica gel et mis dans des sachets hermétiquement fermé, à l'abri de l'air et de l'humidité.

Les emballages doivent rester étanches jusqu'à l'utilisation. Si toutefois, le paquet est ouvert ou percé par inadvertance, mettre tout le paquet dans un sachet plastique ou un emballage hermétique.

Le paquet doit être conservé autant que possible dans un endroit frais. Le tableau ci-dessous donne, à titre indicatif, la durée de stockage des spores du champignon (>80% viabilité) en fonction de la température.

Température (°C)	4°	26-32°	40°	50°
Temps de stockage (mois)	>42	12	1	1 semaine



“Green Muscle®” est également fourni sous forme de concentré huileux (OF) qui peut être entreposé sous les mêmes conditions que la poudre sèche.

Par contre, le “Green Muscle®” dilué à la concentration d'utilisation au champ doit être appliqué dans la semaine qui suit afin d'éviter toute diminution du taux de germination des spores. En tout état de cause, un simple test de germination (voir appendice) permettra de vérifier la viabilité des spores.

#### 4. Formulation

Il est recommandé l'utilisation des atomiseurs à disque rotatif pour l'application de “Green Muscle®” et les spores doivent être en suspension dans une formulation huileuse (SU). Le produit est fourni sous forme de poudre sèche (TC) ou de concentré huileux (OF).

Dans les conditions normales, ne préparer la formulation que quelques jours seulement avant l'application; néanmoins, les formulations préparées avec des spores sèches et des supports huileux de bonne qualité pourraient tenir plusieurs semaines.

##### *Poudre sèche, concentré technique (TC)*

Pour la préparation de la suspension huileuse, dissoudre au préalable la poudre de spores dans une petite quantité de Shellsol T ou de pétrole afin d'obtenir une pâte onctueuse uniforme et diluer ensuite jusqu'à requérir le taux de dilution recommandé 50:50 pour Shellsol T-Ondina, ou 70:30 pour le pétrole et l'huile d'arachide. Afin d'éviter la formation de nuages de poudres de spores, il est recommandé d'ajouter le liquide à la poudre de spores et non le contraire.

**!!! Évitez d'inhaler la poussière de spores; portez un masque ou un mouchoir lors de la préparation de la formulation (risque d'allergie).**

**Évitez tout risque d'explosion de poudre.**

Les deux formulations qui donnent les meilleurs rapports sont:

- Huile Shellsol T- Huile Ondina 50:50
- Huile d'arachide- Pétrole 70:30

La formulation finale diluée est référée comme SU suspension huileuse.

Le pétrole pourra être remplacé par le gasoil et l'huile d'arachide par l'huile du maïs. En cas d'utilisation d'ingrédients non connus, il est préférable de vérifier si chacun des composants n'est pas nocif aux spores; ce qui pourra être fait par un simple test de germination. (voir appendice).

Le volume d'application recommandé est de 0.5-2l/ha avec une dose de 100g de spores sèches par ha soit 100g pour 0.5-2l de solution. Une application de 50g par ha est suffisante dans certains cas.

#### 5. Application

Il est recommandé d'appliquer “Green Muscle®” à un volume de 0.5 à 2 l/ha. Quelques paramètres d'utilisation de certains atomiseurs manuels à disque rotatif sont mentionnés dans le tableau ci-dessous. Mais il faut toujours prendre soin de bien calibrer le pulvérisateur au champ (Voir Bulletin Technique No.

4 pour plus d'information). Pour la calibration des pulvérisateurs sur véhicule voir le bulletin technique No. 4 ou les manuels des fabricants.

Choix de la buse

Pulvérisateur	Débit (ml/min.)	Buse
Ulva plus ou Micron Ulva	60	rouge
	45	orange
	30	jaune
Turbair XJ	60	1.3
Berthoud C5, C8	60	jaune
Ulva 8 ou Ulva 16	60	jaune

Volume d'application	à 60 ml/min	à 45 ml/min	à 30 ml/min
Espace entre les passages	Volume (l/ha)		
5m	2 l/ha	1.5 l/ha	1 l/ha
10m	1 l/ha	0,75 l/ha	0.5 l/ha

En cas d'application, un balisage de drapeaux est toujours pratique afin de mieux respecter la distance entre les passages (5m pour les appareils à main). La vérification de la bonne répartition des gouttelettes doit toujours être effectuée surtout dans des conditions inhabituelles d'application en utilisant soit un traceur UV soit du papier oléo-sensible. Quoique “Green Muscle®” ait une action rémanente, son principal mode d'action se fait par contact direct. L'épandage doit être, autant que possible, directement effectué sur les insectes. En cas d'application sur des bandes larvaires ou des essaïms sur les arbustes, il est préférable d'utiliser un appareil dénommé “mist blowers”. L'application en Ultra Bas Volume doit être effectuée avec une vitesse du vent allant de 1 à 4 m/s. (Pour les atomiseurs équipés sur véhicule ou à pression entretenue, se référer aux manuels des fabricants).

**Pour le criquet puant (*Zonocerus variegatus*), le projet possède une souche spécifique qui est utilisée à un taux d'application de 20g par ha.**

##### *Concentré Huileux*

Si le concentré huileux (OF) appliqué à un volume inférieur à de 2l/ha, peut être fait à base de pétrole ou de gasoil (voir fiche technique).

#### 6. Échantillonnage de Résultats d'Application

Pour évaluer les effets de “Green Muscle®”, plusieurs semaines sont nécessaires sur le terrain. Le comptage des sauteriaux doit être fait dans au moins 20 carrés (1 m<sup>2</sup>) fixes avant l'application et au moins 2 fois par semaine après le traitement au cours des 10 premiers jours.

La prise d'échantillons en cages est recommandée afin de vérifier si l'application a bien réussi et constater l'effet du “Green Muscle®”. Il est nécessaire de protéger les cages contre les fourmis, d'enlever les cadavres, de nettoyer les cages chaque jour et de donner de la nourriture fraîche aux insectes. A l'ombre et au laboratoire, la mortalité intervient plus tôt dans les cages qu'au champ.

Les cadavres placés sur un substrat humide sporulent après quelques jours et montrent des champignons en forme de conidies vertes.



On peut ramasser les cadavres dans les champs mais il ne faut pas être surpris de ne pas en trouver à cause des fourmis et autres prédateurs.

Il est important de suivre l'action de "Green Muscle®" pendant quelques semaines pour bien percevoir son efficacité.

### 7. Identification et Qualités Standards

Le genre *Metarhizium* appartient à l'ordre des Hyphomycètes du sous groupe des Deuteromycotina. Les champignons Deuteromycètes n'ont pas de phase de reproduction sexuée durant leur cycle si bien que le concept d'espèce ne peut être utilisé de façon convenable pour ce type de champignons.

Dans le genre *Metarhizium* la situation n'est pas très claire. L'espèce *M. anisopliae* est très variable. La variété *acridum* comprend des souches qui attaquent les sauteriaux et les criquets. Des méthodes biochimiques doivent être appliquées pour faire la distinction entre les différentes souches.

Les spores produites doivent être strictement considérées comme des conidies. Le genre *Metarhizium* est un groupe très distinct parmi les Hyphomycètes; il possède des spores vertes et ovales qui poussent sur de longs fils (voir couverture); d'autres champignons du même ordre ont de spores blanches (*Paecilomyces*, *Beauveria*) noires, brunes ou jaunes (*Aspergillus*) ou vertes, roses (*Penicillium*, *Nomurea*) (Voir Bulletin technique N°2 de LUBILOSA).

Le projet LUBILOSA possède une collection de près de 150 isolats de *Metarhizium* prélevés sur les locustes et sauteriaux. Ces isolats ont été testés sur le criquet pèlerin et les plus virulents ont été examinés de manière plus étroite. Les isolats suivants ont été les plus testés:

- IMI 330189 isolé à partir d'*Ornithacris cavroisi* au Niger
- 191-609 isolé à partir de *Zonocerus variegatus* au Bénin.

#### Spécifications Techniques de "Green Muscle®"

Viabilité (du produit emballi)	>90%
Humidité pendant emballage	<5%
Ingrédients actifs ( <i>M. flavoviride</i> spores)	>99%
Largeur de Particules (par diamètre)	<60µm >99.9%
Poids des Spores	5x10 <sup>10</sup> spores/g

Virulence: 95% de mortalité des adultes de Criquet Pèlerin à 5x10<sup>4</sup> spores par insecte formulé dans l'huile à 30°C pendant 5 jours.

Les spores doivent avoir une couleur vert-clair, ne pas être agglutinées et faciles à mélanger dans une formulation huileuse. Les paquets de spores qui apparaissent grises ou agglutinées peuvent avoir

### 8. Production

"Green Muscle®" est actuellement produit par l'unité pilote de production IITA/IIBC à la station de recherche IITA Cotonou et au DFPV à Niamey grâce à une technologie appropriée basée sur la production de spores sur support de riz dans des bassines plastiques. Le projet LUBILOSA est à la recherche de partenaires industriels pour la production en Afrique.

#### Enlèvement

Les restants de "Green Muscle®" doivent être retournés à la station IITA en vue de prendre les dispositions nécessaires pour les stériliser ou les brûler; les spores en solution dans du pétrole peuvent être versées sur un combustible comme le bois, la paille ou le papier pour être brûlées.

### 9 Régulations importantes

#### Quarantaine , Import/Export "

"Green Muscle®" est un agent biologique vivant et son importation dans tout pays doit respecter la réglementation de la FAO en matière d'importation d'agents de lutte biologique exotiques. Ceci doit normalement faire l'objet de la délivrance d'un permis par les services nationaux de protection des végétaux ou par les services de quarantaine. En Afrique, le service doit ensuite informer le Conseil Phytosanitaire Inter-Africain de l'OUA.

#### Application

Cette technologie étant nouvelle, peu de pays possèdent une réglementation en matière d'application des biopesticides. Les applications doivent se conformer à la réglementation relative à l'épandage des pesticides. *Metarhizium anisopliae* (*flavoviride*) var. *acridum* 330189, "Green Muscle®" 189SV a eu l'approbation des autorités canadiennes pour une utilisation à usage expérimental sur des superficies de plus de 1000 ha. "Green Muscle®" est enregistré depuis 1996 sur la liste des insecticides pour la lutte anti-acridienne recommandés par la FAO. Au Royaume Uni une demande de brevet sur la technologie d'application a été déposée par CAB International. L'objectif de ce brevet de protection est d'assurer les droits des chercheurs à travailler avec "Green Muscle®" sans aucune restriction. Toute information publiée par LUBILOSA est publique et peut être exploitée librement. Le nom de "Green Muscle®" est une marque déposée et ne peut être utilisé sans autorisation préalable de LUBILOSA.



## Appendice

## I. Test de germination

Des boîtes de Pétri et un microscope sont nécessaires à la conduite de ce test qui doit être réalisé en laboratoire. Le manipulateur doit également être capable d'examiner les boîtes sous le microscope. Les spores de champignons sont des organismes vivants, leur viabilité (proportion de spores vivantes) diminue avec le temps et dépend des conditions dans lesquelles les spores sont gardées. Il est donc essentiel de savoir quelle est la proportion de spores viables avant de les utiliser; si le pourcentage de spores viables a diminué, la concentration de spores peut être augmentée en conséquence lors de la formulation pour l'application au champ. Toutefois, si le pourcentage de spores viables est approximativement en dessous de 70%, ces spores ne doivent pas faire l'objet d'une utilisation.

Mettez de l'agar contenant un antibiotique ("Molisch" ou "Sabouraud dextrose agar") dans de petites boîtes de Petri.

Mettez en suspension une petite quantité de spores dans du pétrole.

Versez 1/10ème de ml de cette suspension de spores sur l'agar, mettez le couvercle et bien étaler la suspension. Utilisez le microscope pour vérifier si les spores sont bien réparties sur l'agar et à une bonne concentration. Si ce n'est pas le cas, il faut diluer ou au contraire augmenter la quantité de spores selon que la concentration est forte ou faible.

Incubez à 25°C. vingt quatre heures après, utilisez le microscope pour le comptage des spores ayant germé ou non. Il faut respecter le temps avec la plus grande attention. Toute spore gonflée et qui bourgeonne est considérée comme ayant germé. Comptez au minimum 200-300 spores (germées et non germées) en faisant un balayage du champ du microscope afin de couvrir une surface importante de la boîte de Pétri.

Calculez le pourcentage de germination en procédant comme suit:

$$[a/(a+b)] * 100 = \% \text{ de germination}$$

Où a= nombre de spores ayant germé et b= nombre de spores n'ayant pas germé.

## II. Glossaire/Acronymes

AGRHYMET:	AGRONomie, HYdrologie, MÉTéorologie
CILSS:	Comité Inter-Etat de Lutte Contre la Sécheresse au Sahel
Conidies:	Spores asexuées
DFPV:	Département de Formation en Protection des Végétaux
FAO	Programme des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture
GTZ	Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (Coopération Allemande)
IIBC, CAB:	Institut International de Lutte Biologique
IITA:	Institut International d'Agriculture Tropicale
INSAH	Institut du Sahel de CILSS
Isolat:	Champignon récolté dans un endroit particulier
LUBILOSA:	Lutte Biologique contre les LOcustes et les SAuteriaux
OAU	Organisation de l'Unité Africaine
OF	Concentré à mélanger dans huile
Spores:	Stade de reproduction et de repos d'un champignon
Souche:	Isolat dont les observations ont montré qu'elle est distincte d'autres isolats
SU:	Suspension Huileuse
TC:	Concentré Technique (poudre des spores sèche)
ULV:	Ultra Bas Volume.

## Informations complémentaires et "feed-back"

Des bulletins techniques plus détaillés et des publications sont disponibles à IIBC, à l'IITA, au CILSS et GTZ ou directement auprès du personnel de LUBILOSA. Toute information utile, tout résultat d'essai, tout commentaire et/ou suggestions sont les bienvenus au projet LUBILOSA.



**III. LUBILOSА Adresses****Biological Control Products SA (Pty) Ltd. (BCP)**

PO Box 1561  
Pinetown 3600  
South Africa  
Tel: (031) 700 4525  
Fax: (031) 700 1338  
Em: bcp-dn@dbnpop01.iafrica.com  
Contact Dr. Di Neethling

**Natural Plant Protection (NPP) / Calliope**

Route d'Artix, BP 80, 64150, Nogueres  
France  
Tel: (33) 559 84 1045  
Fax: (33) 559 84 8955  
Email: cal20@calliope-sa.com  
Contact Mr. Michel Guillon

**CABI Biosciences**

Silwood Park, Ascot, Berks. SL5 7TA  
Tel: (44) 344 872999  
Fax:  
Email N.Jenkins@cabi.org  
Contact Dr. Nina Jenkins

**International Institute of Tropical Agriculture**

Plant Health Management Division  
08 BP 0932 Tri Postal  
Cotonou  
Benin  
Tel: (229) 350553  
Fax: (229) 350556  
Email: j.langewald@cgiar.org  
Contact Dr. Jürgen Langewald

**GTZ (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit)**

Dag-Hammarskjeld-Weg 1-2  
Postfach 5180 Eschborn 1  
D 6236 Germany  
Fax : 061 96 797150- 791115  
Tel : 061 96 790 Tlx : 4075010  
Email: Matthias.zweigert@gtz.de  
Contact Matthias Zweigert

**CILSS/AGRHYMET/DFPV**

BP : 11011 Niamey  
Tel : 227 733116  
Fax: 227 73 24 35  
Email: lubilosa@sahel.agrhymet.ne  
Contact: Zakaria Ouambama

Visitez le site web de LUBILOSА pour toutes les informations sur LUBILOSА:  
<http://www.cgiar.org/iita/research/lubilosa/index.htm>