

Résumé

L'antracnose des baies du caféier, due à *Colletotrichum kahawae*, provoque d'importantes pertes de fruits dans les plantations africaines d'Arabica (Hindorf, 1975). Au Cameroun, cette maladie peut causer jusqu'à 80 % de pertes de récolte dans les parcelles les plus atteintes. Bien que des programmes d'amélioration génétique aient pour objectif d'accroître la résistance des variétés cultivées, la lutte chimique demeure la principale méthode utilisée pour contrôler cette maladie, particulièrement dans les zones les plus affectées.

Pour optimiser les tests des produits fongicides, il est nécessaire de proposer une méthodologie d'échantillonnage destinée à estimer les dégâts dans les parcelles expérimentales. Dans cette perspective, une procédure d'échantillonnage à deux degrés est recommandée à partir des résultats obtenus dans une expérience de traitements. Les nombres de caféiers et de branches par caféier sont déterminés en fonction de différents niveaux de précisions souhaités.

Abstract

Coffee berry disease due to *Colletotrichum kahawae* causes severe fruit losses in African Arabica plantations (Hindorf, 1975). In Cameroon, the disease can cause up to 80% harvest losses in the most severely affected plots. Although genetic improvement programmes are seeking to increase the resistance of cultivated varieties, chemical control remains the main method of controlling this disease, especially in the most severely affected zones. In order to optimize fungicide tests, it is necessary to propose a sampling methodology intended for estimating damage in the experimental plots. To this end, a two-level sampling procedure is recommended, based on the results obtained in a treatment trial. The number of coffee trees and the number of branches per tree are determined according to the different desired levels of precision.

Resumen

La antracnosis de las cerezas del café, causada por *Colletotrichum kahawae*, provoca importantes pérdidas de frutas en las plantaciones africanas de Arabica (Hindorf, 1975). En Camerún, esta enfermedad puede causar hasta un 80% de pérdidas de cosecha en las parcelas las más atacadas. Aunque programas de mejora genética tengan por objetivo incrementar la resistencia de las variedades cultivadas, el control químico permanece el principal método utilizado para controlar esta enfermedad, particularmente en las zonas más afectadas. Para optimizar los tests de los productos fungicidas, es necesario proponer una metodología de muestreo dedicada a estimar los daños en las parcelas experimentales. Con este enfoque, se recomienda un procedimiento de muestreo de dos grados a partir de los resultados logrados en un experimento de tratamientos. Los números de caféos y de ramas por café se determinan acorde a distintos niveles de precisiones deseados.

Méthodologie d'échantillonnage destinée aux essais de contrôle de l'antracnose des baies du caféier Arabica due à *Colletotrichum kahawae*

Régazzoni N.¹, Cilas C.¹, Mouen Bedimo J.A.², Berry D.¹, Bar-Hen A.¹

¹ CIRAD, BP 5035, Montpellier Cedex 1, France

² IRAD, BP 2067, Yaoundé, Cameroun

Les caféiers Arabica (*Coffea arabica* L.) sont cultivés au Cameroun dans les hauts plateaux des provinces de l'Ouest et du Nord-Ouest. Dans cette zone de culture, des pertes importantes de ré-

colte sont occasionnées par des attaques d'antracnose sur baies. Il s'agit d'une maladie cryptogamique due à l'agent pathogène *Colletotrichum kahawae* (Hindorf, 1970, 1975 ; Waller *et al.*, 1993).



D. Bieysse

Anthraxnose des baies du caféier Arabica (*Colletotrichum kahawae*).

Coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) on Arabica coffee trees.

Les variétés locales, et notamment la variété Jamaïque, sont assez sensibles à l'antracnose appelée aussi CBD (*Coffee Berry Disease*). Cette maladie, apparue au Cameroun en 1958 (Muller, 1980), toujours localisée au seul continent africain, peut causer jusqu'à 80 % de perte de récoltes dans les plantations villageoises.

La création de variétés résistantes demeure l'un des principaux objectifs des recherches actuelles pour diminuer l'impact de cette maladie (Van der Vossen *et al.*, 1976, 1980 ; Bella Manga *et al.*, 1997). Cependant, la diffusion de variétés moins sensibles reste limitée et la lutte chimique est actuellement la principale méthode de lutte contre la maladie, particulièrement dans les zones les plus affectées.

Pour améliorer les protocoles d'essais de lutte chimique, il est nécessaire d'améliorer les techniques d'échantillonnage afin d'optimiser les comparaisons de traitements et de diminuer les coûts d'expérimentation. Dans cette étude, la mise au point d'un protocole d'échantillonnage est effectuée à partir des données d'un essai comparatif de traitements fongicides (Régazzoni *et al.*, 1997). L'amélioration du dispositif d'échantillonnage est un préalable indispensable à la définition d'une méthodologie expérimentale. Cette amélioration nécessite de définir le nombre d'arbres par traitement et le nombre de branches à observer sur chaque arbre afin d'obtenir une précision suffisante sur l'estimation du taux de fruits malades par traitement, tout en prenant en compte les coûts inhérents aux expérimentations.

Matériel

Les données analysées proviennent d'un essai de traitements fongicides contre le CBD, réalisé dans une plantation villageoise du nord-ouest du Cameroun. Cette plantation est constituée de 1 200 caféiers Arabica de la variété Jamaïque, sensible à l'antracnose des baies.

L'expérimentation a été réalisée durant deux années consécutives. Les traitements fongicides appliqués en 1993 sont : Octave 50 WP (50 % de prochloraze manganèse), Tilt CT (6,25 % de propiconazole + 37,5 % de chlorothalonil) et Pronader 450 (45 % de prochloraze) en comparaison avec un témoin non traité. Les traitements sont effectués en cinq applications espacées d'environ trois semaines. Le dispositif expérimental utilisé la première année est un plan en randomisation totale

avec des parcelles mono-arbre et 100 arbres (répétitions) par objet. L'essai est donc constitué de 400 arbres utiles, les autres arbres de la parcelle étant utilisés comme bordure des précédents. Les observations se font sur cinq branches tirées au hasard sur chaque caféier.

Quatre objets ont également été comparés en 1994 sur cette même plantation : trois traitements (Octave, Tilt et un traitement avec 4 applications d'Octave) et un témoin non traité. Afin d'étudier les séquences de traitements sur deux ans, les 100 arbres de chacun des quatre objets considérés en 1993 ont été répartis aléatoirement en quatre groupes ; les quatre objets de 1994 sont alors répartis de façon équilibrée sur chacun de ces quatre groupes pour les quatre traitements de 1993. Le dispositif expérimental permet donc d'analyser plus précisément la séquence des deux années de traitement comme une expérience factorielle.

Le rythme des traitements réalisés en 1994 est identique à celui de 1993. Les fréquences des traitements ont été retenues pour assurer une protection des baies jusqu'à la 23^e semaine après la floraison.

Ce dispositif permet donc de définir 16 traitements sur les deux années considérées ; les moyennes du pourcentage de perte et des récoltes par combinaison des traitements entre 1993 et 1994 sont données (tableau 1).

Méthodes

Les données sont issues de dénombrements hebdomadaires des baies saines et malades entre la 4^e et la 27^e semaine après la floraison. Les récoltes ont été enregistrées par branche et par arbre en fin de période de fructification.

Deux variables ont été étudiées :

- le pourcentage de perte de baies, calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ perte} = \frac{BT4 - BT27}{BT4} \times 100$$

avec :

BT4 = nombre de baies total à la 4^e semaine après floraison,

BT27 = nombre de baies total à la 27^e semaine après floraison ;

- le poids de cerises récoltées sur chaque branche de chaque arbre à la fin de la période d'observation.

Le principal objectif de cette étude est de mesurer l'impact de l'échantillonnage sur la précision des comparaisons des différents traitements, la mise en évidence d'effets dus aux traitements ayant été étudiée par ailleurs (Régazzoni *et al.*, 1997).

Pour cela, une analyse de variance à un facteur de classification est réalisée. On détermine l'effet du traitement. Le modèle utilisé est de la forme :

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ik}$$

Tableau 1. Comparaison des pourcentages de perte et des récoltes en fonction des combinaisons de traitements. / Comparison of percentage losses and harvests depending on combinations of treatments.

Traitements Treatments 1993-1994	Pourcentage de perte Percentage loss			Récolte Harvest (g)		
	Moyenne Mean	et / sd	Newman-Keuls (5 %)	Moyenne Mean	et / sd	Newman-Keuls (5 %)
Témoin-Témoin Control-Control	80,31	21,55	a	267	389	def
Octave -Témoin/Control	77,96	27,18	a	116	172	f
Tilt-Témoin/Control	73,05	25,18	a	157	229	ef
Pronader - Témoin/Control	76,81	24,90	a	186	297	ef
Témoin/Control - Octave	40,65	22,91	b	774	1248	ab
Octave - Octave	33,69	25,89	c	669	753	abc
Tilt - Octave	17,45	17,44	fg	615	729	abc
Pronader - Octave	29,17	25,46	cd	625	759	abc
Témoin/Control - Tilt	44,38	28,10	b	832	984	a
Octave - Tilt	30,18	24,44	cd	399	452	cde
Tilt - Tilt	33,45	28,20	c	760	901	ab
Pronader - Tilt	22,79	23,09	def	475	583	bcd
Témoin/Control - Octave2	31,69	21,85	c	775	1325	ab
Octave - Octave2	28,08	25,53	cde	513	710	bcd
Tilt - Octave2	14,46	20,10	g	660	848	abc
Pronader - Octave2	21,15	19,51	efg	517	525	bcd

et : écart type / sd : standard deviation

avec :

Y_{ik} = variable étudiée (% perte, récoltes)

μ = moyenne générale

α = effet des traitements $i=1...16$

ε_{ik} = résidus

Les ε_{ik} représentent tout ce qui n'est pas expliqué par les traitements, dont les erreurs d'échantillonnage. La suite du travail se fera donc principalement sur les résidus.

Un échantillonnage à deux degrés est réalisé, en tirant des unités par sondage aléatoire simple à chaque degré considéré (arbre et branche). Les arbres constituent les unités primaires, notées UP. Au sein de chaque UP, les individus obtenus par tirage aléatoire sont appelés unités secondaires, notées US ; il s'agit ici des branches. On suppose que le coût d'échantillonnage est identique que l'on ait n branches sur 1 arbre ou 1 branche sur n arbres.

L'objectif est donc de déterminer les nombres d'UP et d'US pour une précision donnée. La précision étant obtenue à partir de la variance totale de l'estimation de la moyenne, il faut donc minimiser cette variance.

La variance d'un échantillonnage à deux niveaux (Ardilly, 1994) peut se décomposer en deux termes :

$$V(\hat{y}) = A + B$$

$$A = \frac{1}{N^2} \times \left(1 - \frac{m}{M}\right) \times \frac{s_1^2}{m}$$

$$B = \frac{1}{m} \times \left(1 - \frac{n}{N}\right) \times \frac{s_2^2}{n}$$

avec :

M = nombre total d'unités primaires par traitement (25) ;

m = nombre d'unités primaires à échantillonner ;

N = nombre total d'unités secondaires utilisées (5) ;

n = nombre d'unités secondaires à échantillonner ;

s_1^2 = variance du total inter UP ;

s_2^2 = variance intra UP.

Le terme A ne fait intervenir que des grandeurs liées au premier degré de tirage, on parle de variance inter UP. Le terme B fait intervenir la dispersion de Y au sein de l'UP, on parle de variance intra UP.

A est proportionnel à $1/m$, B est proportionnel à $1/(m \times n)$. Le coefficient $1/(m \times n)$ est en général très inférieur à

$1/m$, surtout lorsque la taille des UP est importante. Une augmentation de m va diminuer à la fois A et B alors qu'une augmentation de n ne diminuera que B . Ainsi, la précision du sondage dépendra principalement du nombre d'UP plutôt que du nombre d'US. Il est donc préférable, pour une taille d'échantillon global donnée, de choisir un m maximum et un n minimum. En effet, l'idéal serait d'enquêter sur le nombre total d'individus en UP. Le fait de prendre $M/2$ UP et $2N$ US diminue déjà la précision des résultats.

L'objectif de l'étude est de mesurer l'incidence d'une diminution du nombre d'US et d'UP sur la précision de la variable étudiée, et d'estimer son impact sur le coût de l'échantillonnage. A cette fin, le nombre de personnes nécessaires pour recueillir les données a été défini par les expérimentateurs ; on admet qu'une personne relève le nombre de baies sur environ 40 arbres par jour.

Résultats

Les résultats concernent le pourcentage de perte de baies due à la maladie. Les comparaisons des 16 traitements prove-

nant de la combinaison des quatre traitements de 1993 et des quatre traitements de 1994 sont présentées pour les deux variables considérées en 1994 (tableau 1). On observe que les séquences « Témoin-Octave » et « Témoin-Tilt » sont aussi intéressantes pour la récolte de 1994 que les séquences de deux traitements consécutifs. Sur le cumul des productions des deux années, les séquences de deux traitements efficaces restent cependant plus intéressantes (Régazzoni *et al.*, 1997), mais un traitement en alternance tous les deux ans pourrait être une solution économiquement viable.

L'évolution de la variance du pourcentage de perte en fonction du nombre d'arbres et du nombre de branches échantillonnés est représentée (figure 1). La variance reste assez faible lorsqu'il y a beaucoup d'arbres, même avec seulement deux branches. Avec peu d'arbres elle est plus élevée et atteint logiquement un maximum pour cinq arbres et une branche.

L'échantillonnage d'une ou deux branches par arbre pourrait entraîner des biais, en raison du risque de choix arbitraire des branches dans les arbres. Cette opération pourrait donc se faire

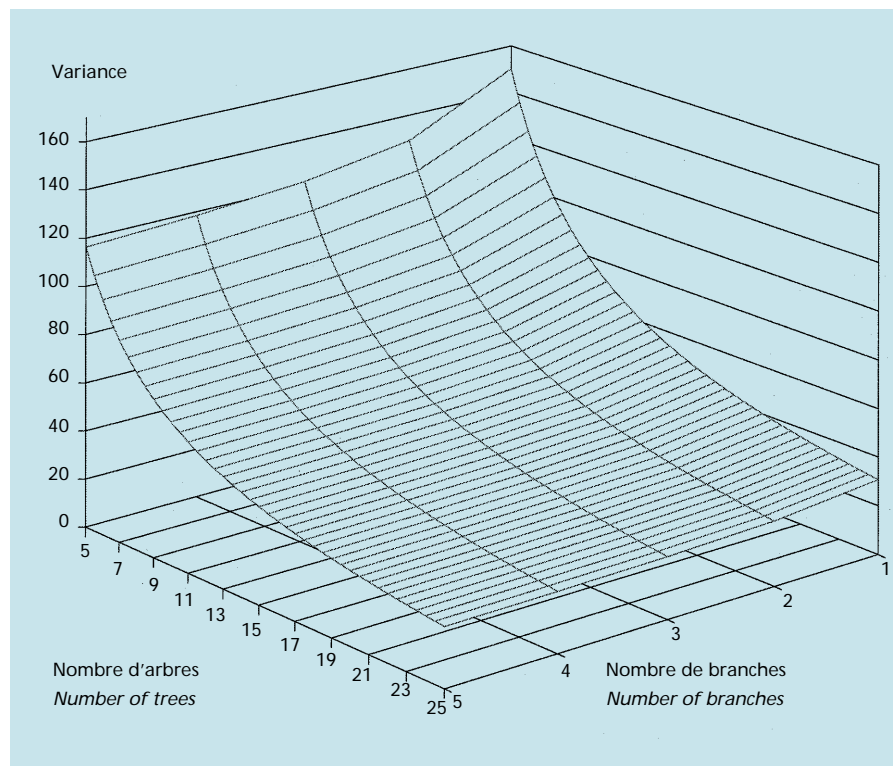


Figure 1. Variance des résidus du pourcentage de perte en fonction du nombre d'arbres et du nombre de branches. / Variance of percentage loss residues depending on the number of trees and number of branches.

sur trois branches sans engendrer une grande différence de variance. En effet, la variance obtenue sur 25 arbres et 5 branches (24,02) est de même ordre de grandeur que celle obtenue sur 25 arbres et 3 branches (25,14). L'échantillonnage de trois branches semble donc acceptable.

Il s'agit maintenant de déterminer le nombre minimum d'arbres à observer par traitement. Le calcul de la plus petite différence significative (PPDS) permet de déterminer ce nombre en fonction de la précision souhaitée par l'expérimentateur.

La PPDS est calculée par la formule suivante :

$$PPDS = \sqrt{\frac{2 \times \text{variance}}{m}} \times 2$$

avec :

m = nombre d'arbres par traitement.

La PPDS correspond à la valeur au-dessus de laquelle toute différence entre deux moyennes μ_1 et μ_2 sera significative au seuil de 5 %.

En considérant que les observations se font sur trois branches par arbre, il s'agit donc de déterminer un nombre d'arbres minimum à échantillonner par traitement.

L'évolution de la PPDS du pourcentage de perte en fonction du nombre d'arbres permet de déterminer un effectif d'arbres à échantillonner par traitement (figure 2). Si l'on veut détecter des différences de pourcentage de perte inférieures à 4 %, il est alors suffisant d'observer environ 20 arbres par traitement.

En réduisant l'échantillonnage à 3 branches sur 20 arbres par traitement, une précision correcte est conservée sur les comparaisons entre traitements.

Discussion et conclusion

Les procédures d'échantillonnage destinées aux expérimentations de lutte chimique contre l'antracnose des baies ont été précisées. Ces procédures nécessitent la mise en œuvre d'un échantillonnage à deux degrés, correspondant à l'échantillonnage d'arbres dans les parcelles et de branches fructifères dans les arbres. Les résultats indiquent qu'il est possible de diminuer le nombre de branches échantillonnées tout en gardant une précision suffisante dans la comparaison des traitements.

Le choix entre une diminution du nombre d'arbres ou une diminution du nombre de branches par arbre peut être raisonné. En terme de coût d'échantillonnage, éliminer 2 branches sur les 25 arbres par traitement correspond à éliminer 10 arbres en gardant le nombre initial de branches. Les résultats indiquent qu'il est préférable d'échantillonner 3 branches sur 25 arbres (variance = 25,14) plutôt que 5 branches sur 15 arbres (variance = 39,41). L'évolution de la PPDS montre que si l'on conserve 3 branches par arbre, on peut échantillonner 20 arbres par traitement, soit 320 arbres pour l'ensemble de l'expérimentation, en gardant une précision correcte.

Il faut ensuite tenir compte du coût de l'échantillonnage. En moyenne, une personne relève le nombre de baies sur environ 40 arbres en une journée.

Le dispositif de base nécessitait donc l'emploi de 10 personne-jour. Sous l'hypothèse qu'échantillonner 400 arbres avec 5 branches consiste à échantillonner 2 000 branches sur un nombre d'arbres indéfini, on en déduit que l'observation de 3 branches par arbre sur 320 arbres représente un travail de 4 à 5 personne-jour.

Dans le coût de l'échantillonnage, il faut aussi prendre en compte les coûts des traitements fongicides. En moyenne 0,8 litre de bouillie fongicide est pulvérisé sur chaque arbre lors des cinq applications. La réduction du nombre de branches observées n'influe pas sur la quantité de fongicide nécessaire pour traiter les arbres. En revanche, l'élimination de 80 arbres permet une économie de 64 litres de bouillie, soit 4 pulvérisations de 15 litres.

D'un point de vue théorique, on a supposé que les variances ne traduisent que les erreurs d'échantillonnage et que les récolteurs et opérateurs de saisie n'introduisent aucune erreur d'observation. Toutefois, il est fréquent d'observer que le taux d'erreurs augmente avec la quantité de données. Ainsi, une réduction de la taille de l'échantillonnage peut permettre de mieux contrôler les erreurs de ce type. Cette réduction peut également permettre d'envisager des essais sur plusieurs parcelles représentatives d'une zone de culture et ainsi étudier la reproductibilité des effets des traitements, notamment si plusieurs souches coexistent dans un agrosystème donné (Rodrigues *et al.*, 1991). ■

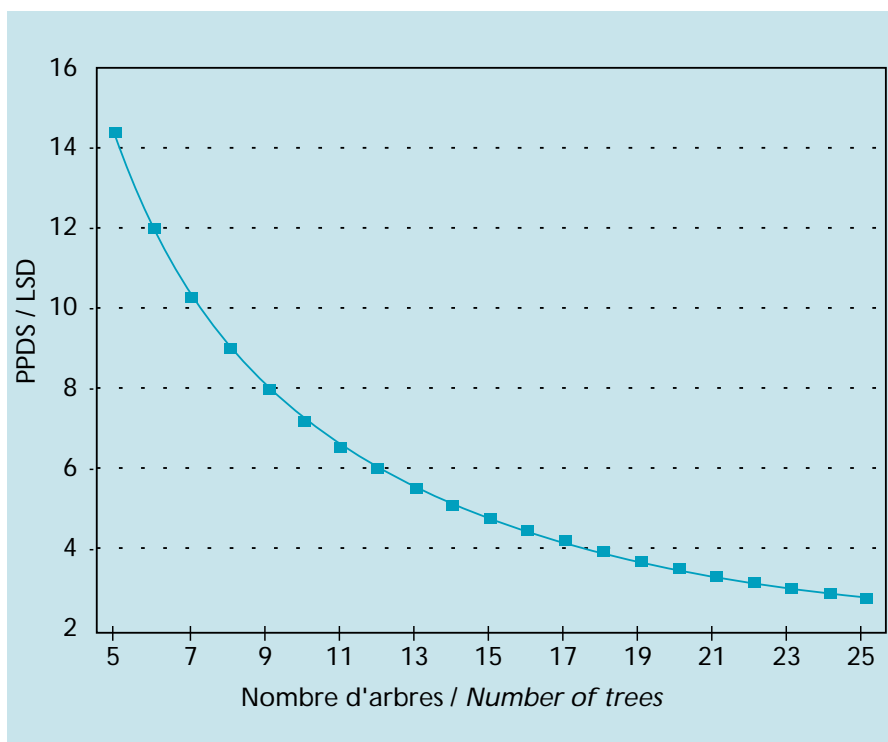


Figure 2. Plus petite différence significative (PPDS) sur le pourcentage de perte en fonction du nombre d'arbres échantillonnés. / LSD (least significant difference) in percentage loss depending on the number of trees sampled.

Bibliographie / References

- ARDILLY P., 1994. Les techniques de sondages. Paris, France, Editions Technip, 393 p.
- BELLA MANGA, BIEYSSE D., MOUEN BEDIMO J.A., AKALAY I., BOMPARD E., BERRY D., 1997. Observations sur la diversité de la population de *Colletotrichum kahawae* agent de l'anthracnose des baies du caféier Arabica. Implications pour l'amélioration génétique. In : XVII^e Colloque scientifique international sur le café, Nairobi, Kenya, 20-25 juillet 1997. Paris, France, ASIC, p. 604-612.
- HINDORF H., 1970. *Colletotrichum* spp. Isolated from *Coffea arabica* in Kenya. Z. Pflanzenkrk. Pflanzenschutz. 77 : 328-331.
- HINDORF H., 1975. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: A review. J. Coffee Res. 5 : 43-56.
- MULLER R.A., 1980. Contribution à la connaissance de la phytomycocénose constituée par *Coffea arabica* L., *Colletotrichum coffeanum* Noack (*sensu* Hindorf), *Hemileia vastatrix* B. et Br., *Hemileia coffeicola* Maublanc et Roger. Bulletin IFCC, n°15, 174 p.
- RÉGAZZONI N., MOUEN BEDIMO J.A., BAR-HEN A., BERRY D., CILAS C., 1997. Mise au point de protocoles de traitements contre l'anthracnose des baies (CBD) du caféier Arabica au Cameroun. In : XVII^e Colloque scientifique international sur le café, Nairobi, Kenya, 20-25 juillet 1997. Paris, France, ASIC, p. 708-713.
- RODRIGUES C.J., VARSEA V.M., HINDORF H., MEDEIRES E.F., 1991. Strains of *Colletotrichum coffeanum* Noack causing coffee berry disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenyan strain. J. Phytopathol. 131 : 205-209.
- VAN DER VOSSEN H.A.M., COOK R.T.A., MURAKARU G.N.W., 1976. Breeding for resistance to coffee berry disease by *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. Euphytica 25 : 733-745.
- VAN DER VOSSEN H.A.M., WALYARO D.J., 1980. Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance for the resistance. Euphytica 29 : 777-791.
- WALLER J.M., BRIDGE P.D., BLACK R., HAZIKA G., 1993. Characterisation of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycol. Res. 97(8) : 989-994.

Sampling methodology intended for trials to control coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae* in Arabica coffee trees

Régazzoni N.¹, Cilas C.¹, Mouen Bedimo J.A.², Berry D.¹, Bar-Hen A.¹

¹ CIRAD, BP 5035, Montpellier Cedex 1, France

² IRAD, BP 2067, Yaounde, Cameroon

Arabica (*Coffea arabica* L.) coffee trees are grown in Cameroon in the highlands of the western and northwestern provinces. In this cultivation zone, major harvest losses are caused by coffee berry disease attacks. It is a fungal disease caused by the pathogen *Colletotrichum kahawae* (Hindorf, 1970, 1975; Waller *et al.*, 1993). The local varieties, and notably the Jamaica variety, are quite susceptible to CBD (coffee berry disease), which appeared in Cameroon in 1958 (Muller, 1980) and is still limited to the African continent, where it can cause up to 80% harvest losses in smallholdings.

The creation of resistant varieties remains one of the main aims of current research to reduce the impact of this disease (Van der Vossen *et al.*, 1976, 1980; Bella Manga *et al.*, 1997). However, the dissemination of less susceptible varieties remains limited and chemical control is currently the main way of controlling the disease, especially in the most severely affected zones.

In order to improve chemical trial protocols, sampling techniques need to be improved to optimize comparisons between treatments and reduce trial costs. In this study, a sampling protocol was developed based on data from a trial comparing fungicide treatments (Régazzoni *et al.*, 1997). Improvement of the sampling procedure was an essential prerequisite for defining an experimental methodology. Such an improvement involved defining the number of trees per treatment and the number of branches per tree to be observed in order to obtain sufficient accuracy in estimating the number of diseased fruits per treatment, whilst bearing in mind inherent trial costs.

Material

The analysed data were from trials testing fungicide treatments against CBD, conducted on a smallholding in northwestern Cameroon. The smallholding had 1 200 Arabica coffee trees of the Jamaica variety susceptible to coffee berry disease.

The trial covered two consecutive years. The fungicide treatments applied in 1993 were: Octave 50 WP (50% manganese prochloraz),

Tilt CT (6.25% propiconazole + 37.5% chlorothalonil) and Pronader 450 (45% prochloraz) compared to an untreated control. The treatments were carried out in five applications approximately three weeks apart.

The experimental design used in year 1 was a totally randomized single-tree plot design with 100 trees (replicates) per treatment. The trial thus comprised 400 useful trees, with the other trees in the plot used as border trees. Observations concerned five branches taken at random on each tree.

Four treatments were also compared in 1994 at the same plantation: three chemical treatments (Octave, Tilt and a treatment with four Octave applications), plus an untreated control. To study treatment sequences over two years, the 100 trees in each of the four 1993 treatments were randomly split into four groups; the four 1994 treatments were then evenly split between those four groups. The experimental design thus enabled a more precise analysis of the two-year treatment sequences as a factorial trial. Treatment intervals in 1994 were the same as in 1993. The treatment frequencies were chosen so as to protect the berries up to the 23rd week after flowering.

This design enabled the definition of 16 treatments over the two years in question; the mean percentage losses and harvests per combination of treatments between 1993 and 1994 are given (table 1).

Methods

The data were obtained from weekly counts of healthy and diseased berries between the 4th and 27th week after flowering. Harvests were recorded per tree at the end of the fruiting period.

Two variables were studied:

- percentage loss of berries, calculated as follows:

$$\% \text{ loss} = \frac{TB4 - TB27}{TB4} \times 100$$

where:

TB4 = total number of berries in the 4th week after flowering

TB27 = total number of berries in the 27th week after flowering;

- the weight of cherries harvested from each branch of each tree by the end of the observation period.

The main aim of this study was to measure the impact of sampling on the accuracy of the comparisons between the different treatments, with any treatment effects covered by another study (Régazzoni *et al.*, 1997).

To this end, a single-factor analysis of variance was carried out. The treatment effect was determined. The model used was of the type:

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ik}$$

where:

Y_{ik} = variable studied (%loss, harvests)

μ = overall mean

α = effect of treatments $i=1...16$

ε_{ik} = residues.

The ε_{ik} values represented all that was not explained by the treatments, including sampling errors. The remainder of the work was therefore mostly carried out on the residues.

Two-level sampling was carried out, dividing the population by a simple random draw for each level considered (tree and branch). The trees made up the primary units, abbreviated to PU. Individuals were drawn at random from each PU and called secondary units, abbreviated to SU; in this case, the SU were branches. We assumed that the cost of sampling was identical whether there were n branches on one tree or one branch on n trees.

The aim, for a given precision, was to determine the number of PU and SU. As precision is governed by the total variance for estimation of the mean, such variance had to be minimized.

The variance of a two-level sampling operation (Ardilly, 1994) can be broken down into two terms:

$$V(\hat{y}) = A + B$$

$$A = \frac{1}{N^2} \times \left(1 - \frac{m}{M}\right) \times \frac{s_1^2}{m}$$

$$B = \frac{1}{m} \times \left(1 - \frac{n}{N}\right) \times \frac{s_2^2}{n}$$

where:

M = total number of primary units per treatment (25)

m = number of primary units sampled
 N = total number of secondary units used (5)
 n = number of secondary units sampled
 s_1^2 = total between-PU variance
 s_2^2 = within-PU variance.

Term *A* only brings into play magnitudes linked to the first level of sorting, referred to as between-PU variance. Term *B* brings into play the dispersion of *y* within the PU, referred to as within-PU variance.

A is of the magnitude $1/m$, *B* is of the magnitude $1/(m \times n)$. The coefficient $1/(m \times n)$ is generally much smaller than $1/m$, especially when the size of the PU is large. An increase in *m* will reduce both *A* and *B*, whereas an increase in *n* will only reduce *B*. Thus, survey precision will primarily depend on the number of PU rather than the number of SU. It is therefore preferable, for a given overall sample size, to choose a maximum *m* and a minimum *n*. In fact, the ideal situation would be to investigate the total number of individuals in the PU. The fact of taking $M/2$ PU and $2n$ SU already reduces result accuracy.

The aim of the study was to measure the effect of reducing the number of SU and PU on the precision of the variable studied, and to estimate its impact on the cost of sampling. To that end, the number of people needed to gather the data was defined by the experimenters; it was accepted that one person would record the number of berries on around 40 trees per day.

Results

The results concerned the percentage loss of berries due to the disease. Comparisons of the 16 treatments obtained by combining the four 1993 treatments and the four 1994 treatments are shown for the two variables considered in 1994 (table 1). This shows that the "Control-Octave" and "Control-Tilt" sequences were as effective for the 1994 harvest as sequences of two successive applications. For cumulated yields over the two years, the sequences of two applications were still more effective (Régazzoni *et al.*, 1997), but treating every other year could constitute an economically viable solution.

Changes in variance for the percentage loss depending on the number of trees and branches sampled are shown (figure 1). Variance remained quite low with many trees, even with

just two branches. With few trees, it was higher and logically reached a maximum for five trees and one branch.

Sampling one or two branches per tree may induce bias, due to the random choice of branches in the trees. The survey could therefore be carried out on three branches without generating any great difference in variance. In fact, the variance obtained on 25 trees and 5 branches (24.02) was around the same as that obtained for 25 trees and 3 branches (25.14). Sampling three branches therefore seemed to be a good compromise.

The least significant difference (LSD) was calculated to determine the number of useful trees for sampling, bearing in mind that records referred to three branches per tree.

The next step was to determine the minimum number of trees to be observed per treatment. This can be done by calculating the least significant difference (LSD), according to the accuracy required by the experimenter. The LSD is calculated by the following formula:

$$LSD = \sqrt{\frac{2 \times \text{variance}}{m}} \times 2$$

where:

m = number of trees per treatment.

The LSD corresponds to the value above which any difference between two means μ_1 and μ_2 will be significant at 5%.

Given that the observations were made on three branches per tree, the aim was thus to determine the minimum number of trees to be sampled per treatment.

Changes in the LSD for percentage loss depending on the number of trees were used to determine the number of trees to be sampled per treatment (figure 2). If the aim were to detect percentage loss differences of less than 4%, it would thus be sufficient to observe around 20 trees per treatment.

By reducing sampling to three branches on 20 trees per treatment, satisfactory precision was maintained for the comparisons between treatments.

Discussion and conclusion

The sampling procedures intended for experiments of chemical control of CBD have been determined. These procedures require two-level sampling, corresponding to the sampling of trees in a plot and fruit-bearing

branches on the trees. The results show that it is possible to reduce the number of branches sampled, whilst maintaining sufficient precision in comparisons between treatments.

The choice between a reduction in the number of trees or a reduction in the number of branches per tree can be reasoned. In terms of sampling costs, eliminating 2 out of 25 branches corresponds to eliminating 10 trees while keeping the initial number of branches. The results show that it is preferable to sample 3 branches on 25 trees (variance = 25.14) rather than 5 branches on 15 trees (variance = 39.41). The changes in LSD show that if 3 branches are kept per tree, it is possible to sample only 20 trees per treatment, ie 320 trees for the trial as a whole, whilst maintaining satisfactory precision.

It is then necessary to take into account the cost of the survey. On average, one person records the number of berries on around 40 trees per day.

The basic design therefore required 10 man-days. On the hypothesis that sampling 400 trees with 5 branches consists in sampling 2 000 branches on an indefinite number of trees, it can be deduced that the observation of 3 branches per tree on 320 trees represents 4 to 5 man-days.

In the cost of the survey, it is also necessary to take into account the cost of fungicide treatments. On average, 0.8 litre of fungicide mixture is sprayed on each tree, in five separate applications. Reducing the number of branches observed does not have any effect on the quantity of fungicide required to treat the trees. On the other hand, eliminating 80 trees means a saving of 64 litres of fungicide mixture, i.e. four 15-litre sprayings.

Theoretically, it was assumed that the variance values only reflected sampling errors and that harvesters and recorders did not introduce any observation error. However, it is frequently seen that the error rate increases in line with the volume of data. For instance, a reduction in sample size may also enable more effective control of errors of this type. Such a reduction may also make it possible to plan trials in several plots representative of a cultivation zone, and thereby study the reproducibility of treatment effects, notably if several strains exist side by side in a given agrosystem (Rodriguez *et al.*, 1991). ■