

Activité comparée de différentes variétés de *Bacillus thuringiensis* Berl. chez deux Lépidoptères ravageurs du cotonnier, *Earias biplaga* Wlk. et *Earias insulana* (Boisd.)

R. Frutos¹, P. Jacquemard² et A. Amargier³

1 et 3. Station de Recherches de Pathologie comparée INRA-CNRS, 30380 St-Cristol-lès-Alès.

2. Laboratoire d'Etudes sur les Entomopathogènes, Centre de Recherches du CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

RÉSUMÉ

Une étude comparée de l'action de 16 variétés de *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis des Lépidoptères Noctuides *Earias biplaga* Wlk. et *Earias insulana* (Boisd.) fait apparaître une sensibilité particulière de ces deux espèces aux sérotypes H 5a5b, variété *galleriae* et H 7, variété *aizawai*.

L'évaluation des doses létales fait ressortir l'intérêt que peut apporter l'utilisation du sérotype 7 pour la lutte contre les *Earias*. Ce sérotype se révèle être respectivement 10 fois et 100 fois plus

actif que les sérotypes H 3a3b variété *kurstaki* et H 1 variété *berliner* utilisés habituellement en expérimentation sur le terrain.

Ce travail est complété par une étude de l'évolution des symptômes de la maladie en relation avec la dose administrée à l'insecte. Un examen de coupes histopathologiques permet d'évaluer l'intensité des lésions et leur vitesse d'installation en fonction de la virulence de la variété.

MOTS CLÉS : cotonnier, lutte biologique, *Bacillus thuringiensis*, *Earias insulana*, *Earias biplaga*.

INTRODUCTION

Plusieurs espèces de Lépidoptères du genre *Earias* Hübn. figurent parmi les nombreux déprédateurs des cultures cotonnières. La lutte chimique contre ces ravageurs a atteint une forte intensité avec, dans certains cas précis (Madagascar), dix à douze applications par campagne.

DELATRE (1972), ainsi que BOURNIER et PEYRELONGUE (1974) signalent des résistances très nettes à différents insecticides chimiques.

A l'heure actuelle, les pyréthrinoides donnent une réponse satisfaisante au problème posé par *Earias*, mais il est permis d'envisager que d'ici à quelques années le phénomène de résistance puisse de nouveau se manifester.

Certains auteurs (BURGERJON et GRISON, 1959; RAMAKRISHNAN et PANT, 1971) ont noté que l'utilisation d'un insecticide biologique tel que *Bacillus thuringiensis* Berliner présente une faible activité vis-à-vis d'*Earias*. AL AZAWI (1964) apporte un résultat différent, tout comme JACQUEMARD (1982) qui, en Afrique, au cours d'essais de

lutte biologique a montré que l'utilisation de *B. thuringiensis* donne des résultats satisfaisants sans toutefois atteindre l'efficacité des insecticides chimiques. Cependant, les variétés de *B. thuringiensis* utilisées lors de ces différents travaux appartenaient soit au sérotype 1 soit au sérotype 3 sur plus d'une vingtaine actuellement connus.

Une étude comparée de l'action pathogène des différentes variétés de *B. thuringiensis* s'avérait nécessaire afin de préciser leur efficacité sur les deux espèces d'*Earias* étudiées.

SALAMA et FODA (1983), partant du même principe, ont testé la sensibilité de différents ravageurs du cotonnier à *B. thuringiensis* avec des résultats encourageants.

Les travaux présentés dans cet article ont porté sur l'étude comparée de l'action de 16 variétés de *B. thuringiensis* vis-à-vis de deux espèces de Lépidoptères Noctuides, *Earias biplaga* Wlk. et *Earias insulana* (Boisd.).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des souches

Les souches bactériennes utilisées se présentent sous forme de poudres contenant le complexe spore-cristal. Elles nous ont été fournies par H. DE BARJAC de l'Institut Pasteur, par la Société BIOCHEM et par la Société ABBOTT (tabl. 1).

Les insectes à partir desquels nous avons réalisé notre élevage ont été fournis par le Laboratoire d'Élevage et de Nutrition des Insectes du CIRAD. Ces souches sont originaires des pays suivants :

E. biplaga : Côte-d'Ivoire, Station IRCC de Bingerville. Cette souche est élevée depuis avril 1982.

E. insulana : Cameroun, Station de Maroua. Cette souche est élevée depuis décembre 1981.

Technique d'élevage des insectes

Nous avons utilisé une méthode d'élevage individuel sur milieu synthétique du fait de la grande facilité d'utilisation de ce dernier lors des infections.

Cette technique d'élevage nous a permis de travailler sur une population « présumée saine », c'est-à-dire exempte de toute mortalité attribuable à *B. thuringiensis*.

Le milieu nutritif utilisé est celui mis au point par COULLLOUD et GIRET. La composition est la suivante :

support	eau	1 l
	agar	23,3 g
substances phagostimulantes et nutritives	maïs broyé	186,7 g
	germes de blé	46,7 g
	levure de bière	50 g
	sels minéraux	13,3 g
	complexe vitaminé (vitamin diet)	13,3 g
	jaune d'oeuf	8,3 g
	acide ascorbique	16,7 g
agent conservateur	huile de maïs	5 ml
	acide sorbique	4 g

Les nymphes sont prélevées et disposées à raison de 30 par boîte. Les pondoirs sont des boîtes en polystyrène transparent, dont le couvercle a été découpé pour l'aération, et dans lesquelles sont déposés les nymphes et un tube rempli d'eau miellée à 10 % d'où dépasse une mèche. Une gaze servant de support de ponte est placée entre la boîte et le couvercle. La ponte est favorisée, tout au moins chez *E. biplaga* par un effet de groupe (NGUYEN-BAN, 1977). Une ampoule de 25 W de couleur bleue placée dans la cellule éclaire légèrement pendant la scotophase et favorise l'accouplement des adultes.

Les gazes sur lesquelles les œufs ont été pondus sont relevées quotidiennement. Après 24 h, elles sont placées dans une boîte en polystyrène dont le fond a été remplacé par un grillage fin, afin de permettre de plonger les œufs dans une solution désinfectante pendant 4 minutes : hypochlorite de sodium (47/50 chloro) 5 ml ; eau distillée 100 ml ; Hexagon 1 ml. Chaque ponte désinfectée est placée dans une boîte au fond de laquelle se trouve du milieu nutritif. La gaze est maintenue par le couvercle de la boîte qui est percé d'une ouverture recouverte de grillage fin. Il faut veiller à ce que la gaze ne touche pas le milieu, afin d'éviter l'humidification néfaste aux embryons. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité.

Le premier stade larvaire s'effectue dans la boîte où les œufs ont éclos. Les chenilles sont prélevées au deuxième stade et placées en élevage individuel dans des loges rectangulaires en matière plastique contenant du milieu nutritif. Les boîtes sont ensuite recouvertes d'un grillage plastique fin et d'une plaque de plexiglass perforée. Le milieu est renouvelé tous les huit jours.

Toutes les phases de l'élevage, y compris les manipulations, s'effectuent dans des cellules climatisées réglées à : température 25°C ; humidité relative 65 % ; photopériode-scotopériode 12-12.

Cultures bactériennes

Nous avons utilisé les milieux de culture suivants :

— Milieu solide LPGA : extrait de levure 5 g, peptone 5 g ; glucose 5 g ; agar 30 g ; eau distillée 1 litre. Le milieu est autoclavé avant d'être coulé en boîte de Pétri ou en tube.

— Milieu liquide UG (LARGET, 1981).

Le nombre de spores viables des poudres ou des cultures est déterminé après dilutions successives et ensemencement.

Technique d'infection

Les infections sont réalisées selon la technique suivante : dans le milieu nutritif artificiel, l'acide sorbique est remplacé par la Nipagine et l'acide benzoïque aux doses respectives de 2,5 et 2 g/l. Le pH est ajusté à 6. Une suspension connue de spores de *B. thuringiensis* est ajoutée et mélangée par agitation au milieu encore liquide qui est ensuite coulé dans la boîte et pressé pour obtenir une épaisseur constante de 1 mm (BURGERJON, communication personnelle).

L'étude comparée de l'activité de 16 variétés de *B. thuringiensis* a été effectuée à partir de lots homogènes de 50 larves de 3^e stade contrôlés pendant 8 jours. Pour chaque variété, nous avons réalisé des infections avec deux doses différentes : une dose considérée comme forte avec 10⁵ spores par millilitre de milieu nutritif et une dose dite faible avec 10³ spores par millilitre de milieu.

Pour chaque infection nous avons réalisé un lot témoin. Les résultats présentés expriment des pourcentages de mortalité cumulés après correction par la formule d'ABBOTT (1925), compte tenu de ses limites d'utilisation :

$$\text{mortalité corrigée \%} = \frac{\text{mortalité du test \%} - \text{mortalité du témoin \%}}{100 - \text{mortalité du témoin \%}} \times 100$$

TABLEAU I

Les différentes variétés de *Bacillus thuringiensis* Berl. utilisées sur *Earias biplaga* Wlk. et *Earias insulana* (Boisd.).
Varieties of *Bacillus thuringiensis* Berl. used on *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* (Boisd.).

Sérotype	Variété	Référence	Provenance	Nombre de spores par g de poudre
H 1	<i>berliner</i>	E. 61 étalon	Institut Pasteur	5,5 10 ⁹
H 1	<i>berliner</i>	E. 1.66	Institut Pasteur	4,5 10 ⁹
H 2	<i>finitimus</i>	E. 15.66	Institut Pasteur	2,6 10 ¹⁰
H 3a	<i>alesti</i>	E. 14.66	Institut Pasteur	3,0 10 ⁹
H 3a3b	<i>kurstaki</i>	E. 17.66	Institut Pasteur	6,4 10 ⁹
H 4a4b	<i>dendrolimus</i>	E. 13.66	Institut Pasteur	3,5 10 ⁹
H 4a4c	<i>kenyas</i>	E. 10.66	Institut Pasteur	8,0 10 ⁹
H 5a5b	<i>galleriae</i>	E. 9.66	Institut Pasteur	3,0 10 ⁹
H 6	<i>subtoxicus</i>	E. 11.93.66	Institut Pasteur	2,2 10 ⁹
H 6	<i>entomocidus</i>	E. 6.66	Institut Pasteur	2,3 10 ¹⁰
H 7	<i>aizawai</i>	E. 4.66	Institut Pasteur	3,8 10 ⁹
H 7	<i>aizawai</i>	401-203	Biochem	1,3 10 ¹²
H 9	<i>tothworthi</i>	E. 218.66	Institut Pasteur	7,0 10 ¹⁰
H 10	<i>darmstadtensis</i>	E. 11.6	Institut Pasteur	7,2 10 ¹⁰
H 11	<i>toumanoffi</i>	E. 11.78	Institut Pasteur	5,0 10 ¹⁰
H 12	<i>thompsoni</i>	E. 11.69	Institut Pasteur	3,0 10 ⁹
H 14	<i>israëliensis</i>	vectobac	Abbott	4,4 10 ¹⁰

TABLEAU 2
Mortalité après infection par *Bacillus thuringiensis* Berliner chez *Earias biplaga* Wlk.
Mortality after infection by *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Earias biplaga* Wlk.

Sérotype et variété	Nombre de spores/ml	Nombre de jours après l'infection							
		1	2	3	4	5	6	7	8
H1 E. 61 étalon <i>berliner</i>	10 ³	0	0	2	2	2	2	2	2
	10 ⁵	0	0	0	4,1	6,6	13,2	56,6	80
H 1 <i>berliner</i>	10 ³	0	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
	10 ⁵	0	0	10,2	18,8	22,9	40,5	57,5	78,3
H 2 <i>finitimus</i>	10 ³	0	0	4,2	4,2	4,2	4,2	8,5	8,5
	10 ⁵	2	2	6,1	12,2	12,2	12,2	14,9	14,9
H 3a <i>alesti</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵	2	2	2	10,2	12,2	32,6	55,1	81,2
H 3a3b <i>kurstaki</i>	10 ³	2	2	2	2	2	2	2	2
	10 ⁵	0	4	4	8,2	14,3	42,9	57,1	66,7
H 4a4b <i>dendrolimus</i>	10 ³	0	0	0	2,3	2,3	4,5	4,5	4,5
	10 ⁵	4	12,2	14,3	22,5	23,4	40,4	68,1	80,8
H 4a4c <i>kenyae</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	2,1	2,1
	10 ⁵	0	4,2	12,5	27,1	39,6	45,8	54,2	62,5
H 5a5b <i>galleriae</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵	4	48	75,5	79,2	83,3	85,4	89,6	91,7
H 6 <i>subtoxicus</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	2,1
	10 ⁵	2	36	59,2	64,6	64,6	68,7	72,9	75
H 6 <i>entomocidus</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	2,1
	10 ⁵	0	0	0	16,3	36,2	59,6	83	89,4
H 7 (IP) <i>aizawai</i>	10 ³	6,1	6,1	6,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
	10 ⁵	2	6,1	22,9	39,6	43,8	52,1	56,3	77,1
H 7 (Biochem) <i>aizawai</i>	10 ³	0	0	0	0	0	2	2	2
	10 ⁵	14	48	78	84	90	92	96	100
H 9 <i>tolworthi</i>	10 ³	0	2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	8,5
	10 ⁵	4,3	4,3	13,5	13,5	18	20,3	29,8	42,9
H 10 <i>darmstadiensis</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵	0	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	12,7	12,7
H 11 <i>toumanoffi</i>	10 ³	0	0	0	2,1	2,1	4,5	4,5	8,8
	10 ⁵	4	8	10,2	12,2	12,2	12,2	12,2	14,9
H 12 <i>thompsoni</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	2,1
	10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	2,1
H 14 <i>israeliensis</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵	0	0	4	4	4	4	4	4

TABLEAU 3
Mortalité après infection par *Bacillus thuringiensis* Berliner chez *Earias insulana* (Boisd.).
Mortality after infection by *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Earias insulana* (Boisd.).

Sérotype et variété	Nombre de spores/ml	Nombre de jours après l'infection							
		1	2	3	4	5	6	7	8
H1 E. 61 étalon <i>berliner</i>	10 ³	0	0	0	0	0	4,2	12,1	12,5
	10 ⁵	0	0	2,6	9,5	14,2	20,1	49,3	74,5
H 1 <i>berliner</i>	10 ³	0	0	0	0	0	4,2	4,2	4,2
	10 ⁵	0	2,4	20,1	33,5	37,9	53,4	71,2	86,7
H 2 <i>finitimus</i>	10 ³	0	0	2,5	2,5	2,5	7,5	7,5	7,5
	10 ⁵	0	0	0	0	0	0	5	7,5
H 3a <i>alesti</i>	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵	0	0	0	3,28	25	36,3	7,2	97,6
H 3a3b <i>kurstaki</i>	10 ³	0	0	0	0	0	2,5	4,8	7
	10 ⁵	0	12,8	34,1	46,9	51,1	66	80,9	35,1
H 4a4b <i>dendrolimus</i>	10 ³	0	0	0	0	4,6	9	17,9	22,4
	10 ⁵	0	9	20,1	35,7	42,3	51,2	62,3	68,9
H 4a4c <i>kenyae</i>	10 ³	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	12,5
	10 ⁵	0	0	10	17,5	20	35	57,5	77,5
H 5a5b <i>galleriae</i>	10 ³	0	2,5	2,5	2,5	2,5	5	7,5	12,5
	10 ⁵	0	2,5	67,5	72,5	7,5	87,5	90	97,5
H 6 <i>subtoxicus</i>	10 ³	4	4	8	10	14	18	20	22
	10 ⁵	0	0	4	10	28	38	52	68
H 6 <i>entomocidus</i>	10 ³	0	8,5	19,6	28,3	30,4	34,8	37	45,6
	10 ⁵	0	21,4	39,9	46,8	51,4	65,3	74,6	79,2
H 7 (IP). <i>aizawai</i>	10 ³	0	0	0	0	4	4	4	4
	10 ⁵	10	14	36	36	54	62	76	80
H 7 (Biochem) <i>aizawai</i>	10 ³	0	3,3	16,6	50	66	80	80	86,6
	10 ⁵	10	53	70	80	90	90	96,6	96,6
H 9 <i>tolworthi</i>	10 ³	3,3	6,6	6,6	6,6	10	10	10	16,6
	10 ⁵	0	6,6	13,3	16,6	26,6	33,3	43,3	60
H 10 <i>darmstadiensis</i>	10 ³	0	0	0	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3
	10 ⁵	0	0	0	0	10	23,3	30	33,3
H 11 <i>toumanoffi</i>	10 ³	0	6,7	26,6	26,6	26,6	26,6	30	33,3
	10 ⁵	0	0	6,7	6,7	20	40	43,3	43,3
H 12 <i>thompsoni</i>	10 ³	0	3,3	3,3	6,7	23,3	20	30	33,3
	10 ⁵	0	0	13,3	33,3	46,7	56,7	60	70
H 14 <i>israeliensis</i>	10 ³	0	0	0	0	0	10	10	10
	10 ⁵	3,3	3,3	6,6	6,6	6,6	13,3	20	30

En ce qui concerne les tests de DL 50, les variétés choisies sont les sérotypes H 1 variété *berliner* E. 61 étalon, H 3a3b variété *kurstaki*, et H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM.

Nous avons utilisé des suspensions aux concentrations suivantes : 10^6 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores par millilitre de milieu. Un lot témoin non traité a aussi été constitué et chaque dose a été testée sur un lot de cinquante larves de 3^e stade contrôlé pendant onze jours.

La méthode utilisée pour le calcul des doses létales est celle des Probits.

Techniques d'histopathologie

Les larves présentant les symptômes typiques de l'infection sont prélevées toutes les 12 heures et fixées au Carnoy 2 pendant 24 heures. Les coupes de 5 μ m d'épaisseur ont été colorées par le Giemsa-éosine pour la mise en évidence des bactéries. Les coupes semi-fines de 0,3 μ m ont été colorées au bleu de toluidine.

RÉSULTATS

Numération des spores viables

Les résultats figurent dans le tableau 1.

Comparaison de l'activité des 16 variétés de *B. thuringiensis* vis-à-vis d'*E. biplaga* et *E. insulana* (planches 1 à 4 et tableaux 2 et 3).

Résultats observés à partir des infections à dose élevée (10^6 spores/ml de milieu)

Nous constatons que les courbes de mortalité correspondant à cette dose présentent pour chaque variété des allures similaires chez *E. biplaga* et *E. insulana*, à l'exception du sérotype H 12 variété *thompsoni*.

Nous pouvons distinguer schématiquement trois types de réponses à l'infection.

Un premier type correspond à une lente variation du taux de mortalité au début de l'expérimentation, suivie d'une augmentation très rapide du nombre de morts à la fin du test (sérotypes H 1, H 3a, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 6 *entomocidus*).

Un second type de réponse se traduit par une rapide progression de la mortalité juste après l'infection, qui ensuite se ralentit fortement (sérotypes H 5a5b, H 6 *subtoxicus*, H 7).

Enfin, la dernière catégorie de réponse est caractérisée par une très faible mortalité même au bout de huit jours (sérotypes H 2, H 9, H 10, H 11, H 12, H 14).

Résultats observés à partir des infections à dose faible (10^3 spores/ml de milieu)

Les résultats sont ici totalement différents des précédents puisqu'ils varient en fonction de l'espèce hôte.

Chez *E. biplaga*, la réponse change très peu d'une variété à l'autre. En effet, la mortalité est soit très faible avec les

sérotypes H 1, H 2, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 6 *subtoxicus*, H 7, H 9, H 11, H 12, soit nulle avec les sérotypes H 3, H 5a5b, H 6 *entomocidus*, H 10, H 14.

Chez *E. insulana*, mis à part le sérotype H 3a variété *alesti*, la mortalité n'est jamais nulle et si elle est souvent faible (H 1, H 2, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 5a5b, H 6 *subtoxicus*, H 7, H 9, H 10, H 14), elle peut parfois être plus élevée en fin d'expérience (H 6 *entomocidus*, H 11, H 12), voire même très importante comme dans le cas du sérotype H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM.

Les sérotypes commercialisés, c'est-à-dire les sérotypes H 1 variété *berliner* et H 3a3b variété *kurstaki* provoquent une mortalité relativement faible.

Deux souches, les sérotypes H 5a5b variété *galleriae* et H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM causent des mortalités plus fortes que les autres variétés, entre 90 et 100 %, et en moins de temps.

Le sérotype H 6 variété *entomocidus* présente une activité proche des deux sérotypes précédents mais néanmoins inférieure.

Evaluation de l'activité pathogène de certaines variétés de *B. thuringiensis* vis-à-vis d'*E. biplaga*

Les résultats figurant au tableau 4 et représentés sur la planche 5 montrent sur trois cas précis, caractéristiques d'une forte, moyenne et faible virulence, les très nettes différences dans l'activité pathogène des divers sérotypes utilisés.

Comme précédemment, le sérotype H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM présente une virulence très importante vis-à-vis d'*E. biplaga*.

Les résultats de ce test ont été traduits en nombre de spores par millilitre de milieu nutritif, à la suite de quoi nous avons déterminé le titre biologique d'après la méthode de DULMAGE *et al.* (1971).

TABLEAU 4

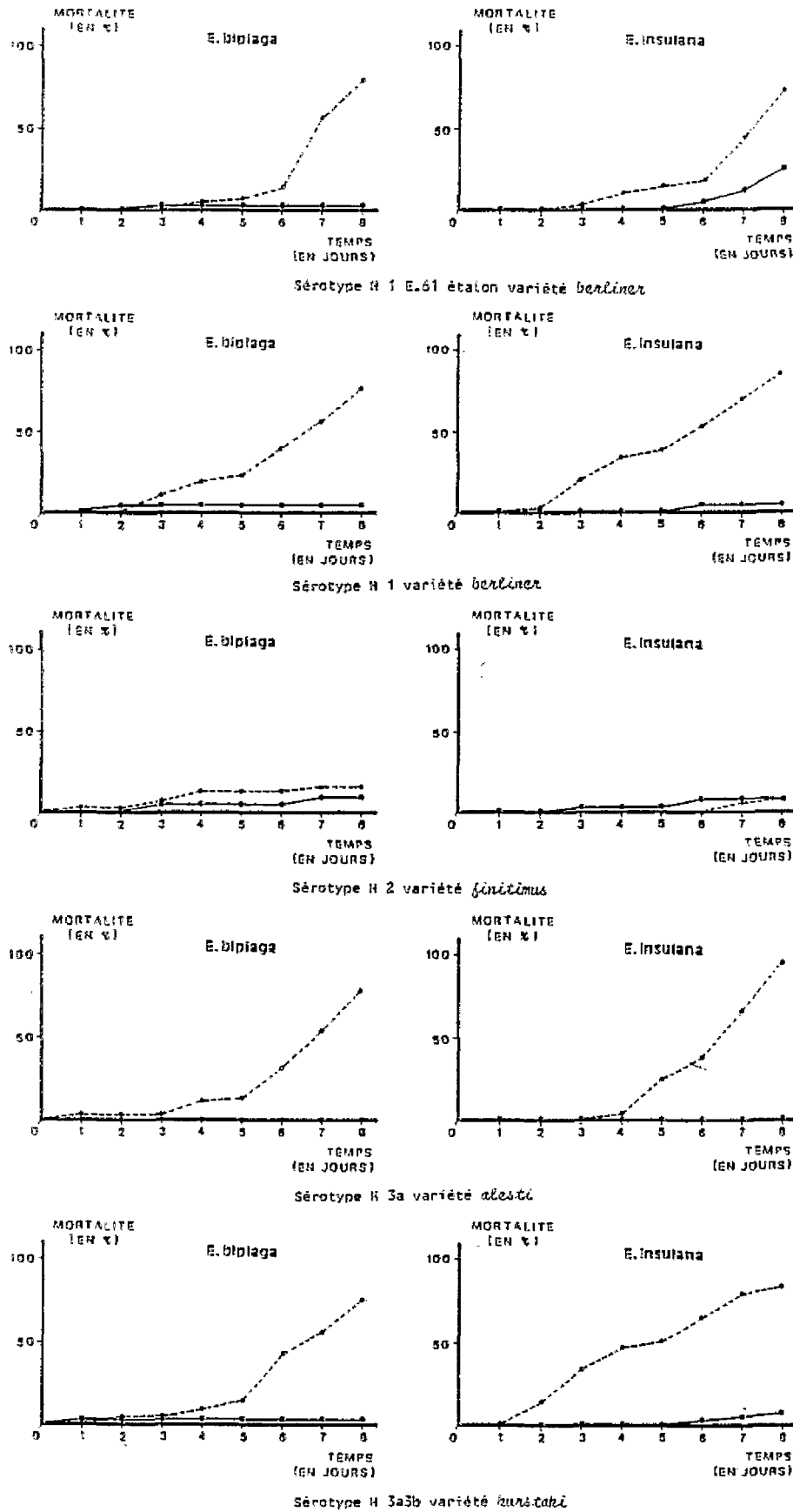
Evaluation des DL 50 et titrages biologiques de trois variétés de *Bacillus thuringiensis* Berl.
Estimate of LD 50 and biological concentrations of three varieties of *Bacillus thuringiensis* Berl.

Sérotypes et variétés	H 1 E. 61 étalon variété <i>berliner</i>	H 3a3b variété <i>kurstaki</i>	H 7 variété <i>aizawai</i> (Biochem)
DL 50 en log Dose	0,331219	0,004368	0,000339
Limite inférieure	0,062887	0,002791	0,000216
Limite supérieure	1,744498	0,006835	0,000532
DL 50 en spores/ml de milieu	$1,3 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$
Titration biologique en UI/mg	10^3	$6,5 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^5$

Courbes de mortalité après infection par *Bacillus thuringiensis* Berliner chez *Earias biplaga* Wlk. et *Earias insulana* (Boisd.).

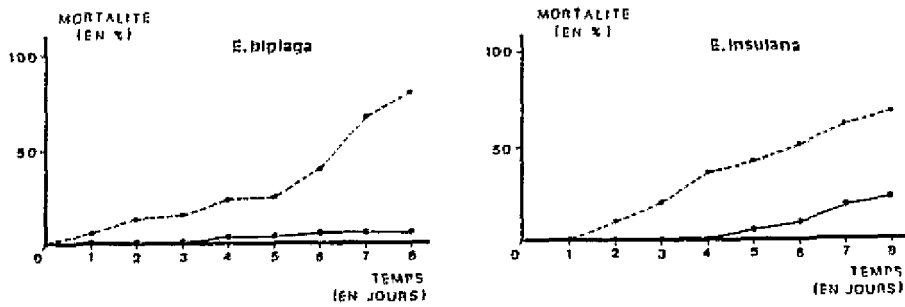
Mortality curves after infection by *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* (Boisd.).

Planche 1

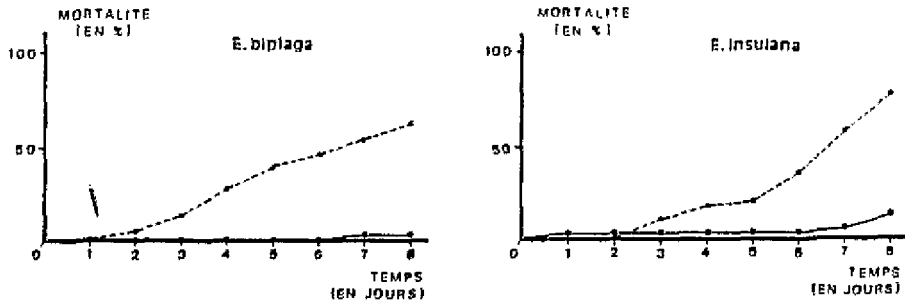


Légende : - - - - 10^5 spores par ml de milieu
 — 10^3 spores par ml de milieu

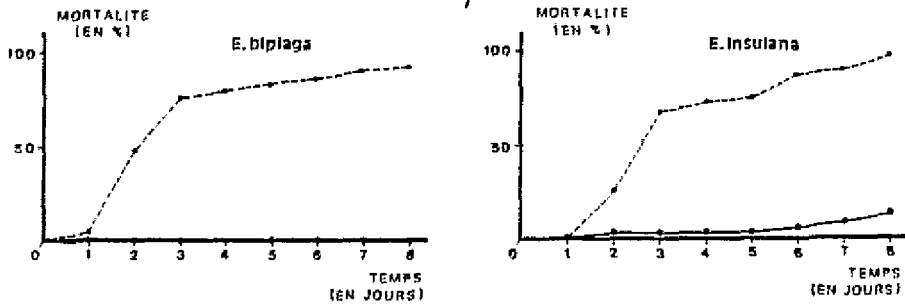
Planche 2



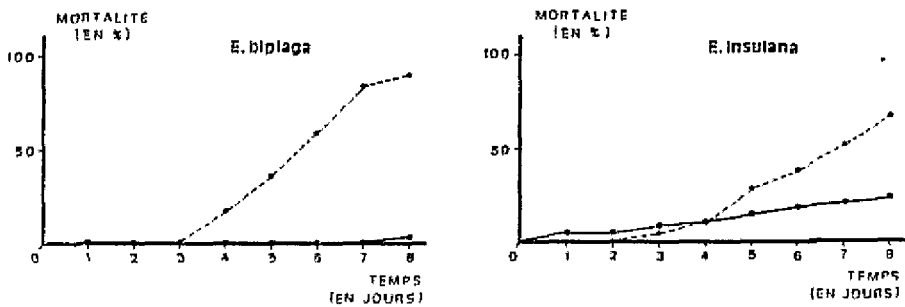
Sérotype H 4a4b variété *dendrolimus*



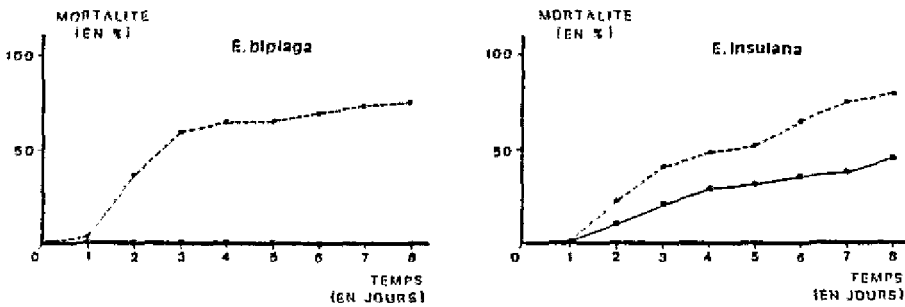
Sérotype H 4a4c variété *kenyaae*



Sérotype H 5a5b variété *galleriae*

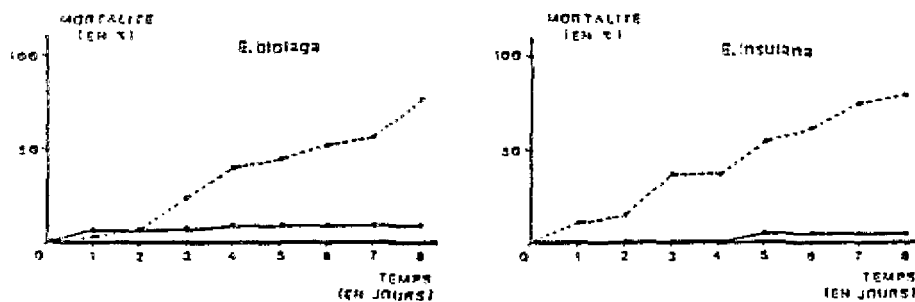


Sérotype H 6 variété *entomacidus*

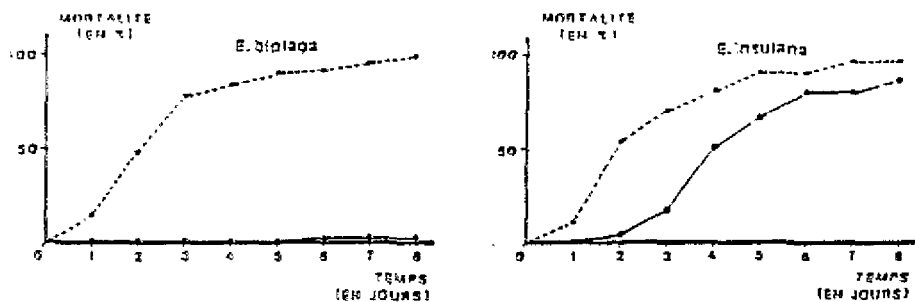


Sérotype H 6 variété *entomacidus*

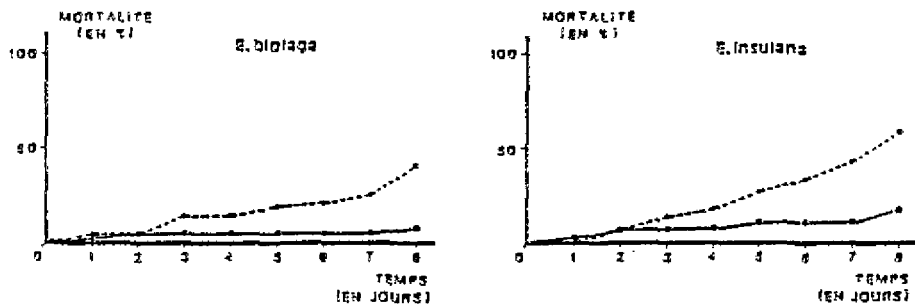
Planche 3



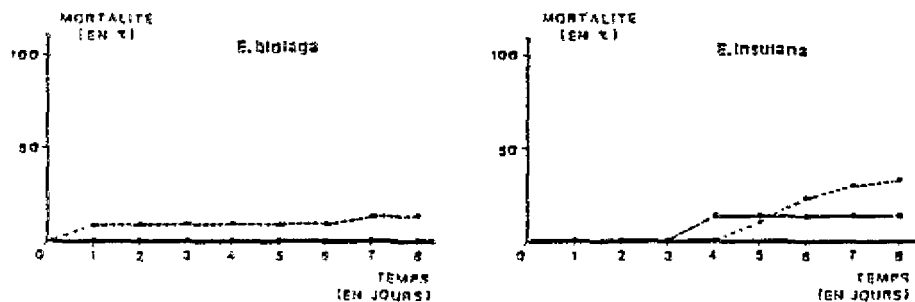
Sérotype H 7 variété *alzuwai*



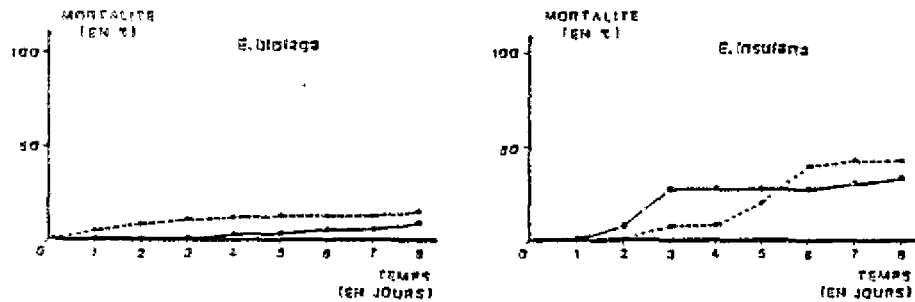
Sérotype H 7 variété *alzuwai* (Biochem)



Sérotype H 9 variété *talwanthi*



Sérotype H 10 variété *dannstadtensis*



Sérotype H 11 variété *caumatoisii*

Planche 4

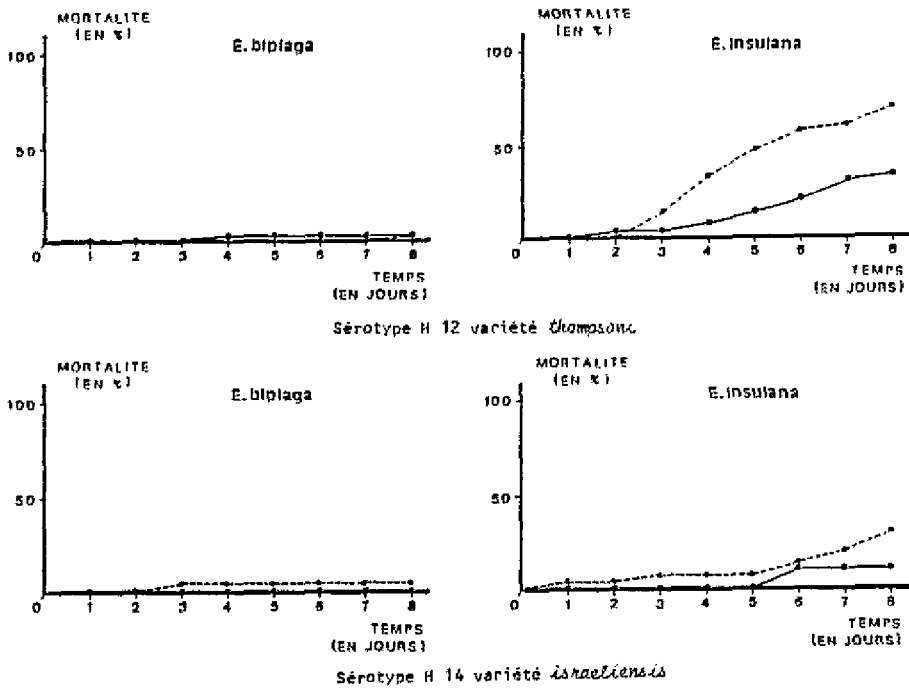
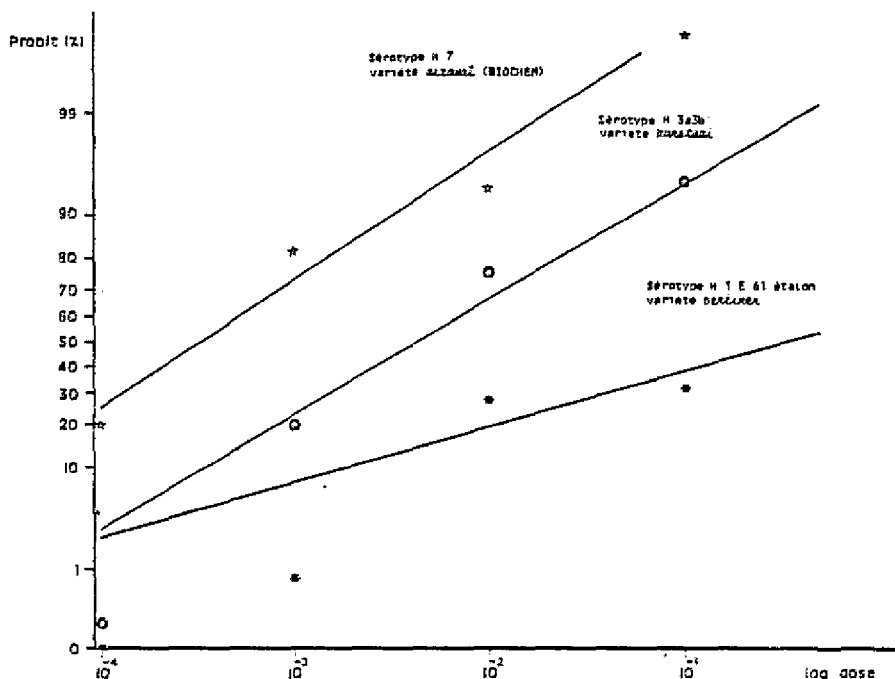


Planche 5

Représentation graphique des DL 50 de certaines variétés de *Bacillus thuringiensis* Berl. sur *Earias biplaga* Wlk.

Graphical representation of the LD 50 of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berl. on *Earias biplaga* Wlk.



Evolution des symptômes et des lésions

Plusieurs étapes typiques de la maladie à *B. thuringiensis* ont été mises en évidence au cours des tests. Ces symptômes ne peuvent être correctement visibles que si la dose infectieuse n'est pas trop élevée, auquel cas, la mortalité relativement rapide perturbe la succession de ces stades.

Nous pouvons distinguer deux évolutions selon que la dose administrée est moyenne, avec comme aboutissement la mort, ou faible et allant de pair avec le développement des insectes.

Première voie d'évolution des symptômes :

- 1^{re} phase — il y a arrêt d'alimentation et les larves prennent un aspect « rugueux », terne et mélanisé. Le comportement est normal.
- 2^e phase — la croissance pondérale aussi bien que la mue sont bloquées. Les animaux n'évoluent pas au-delà du 3^e stade larvaire.
- 3^e phase — les larves sont immobilisées ou ne se déplacent qu'avec une lenteur inhabituelle. Cependant, elles réagissent vivement à la piqure et aux chocs mécaniques.
- 4^e phase — les larves sont paralysées et souvent enroulées sur elles-mêmes. La seule réponse à l'excitation mécanique est le mouvement des pattes thoraciques ou de la tête et cette réaction n'est pas immédiate et exige plusieurs excitations successives.
- 5^e phase — la larve est morte ou tout au moins ne répond plus à aucune excitation mécanique.

Seconde voie d'évolution des symptômes :

- 1^{re} phase — les larves paraissent plus ternes et il y a diminution de la consommation et non arrêt.

2^e phase — les larves sont moins développées que les animaux témoins mais continuent leur croissance.

3^e phase — il y a nymphose et bien que les nymphes soient petites et tardives, elles donnent néanmoins des adultes.

Des larves d'*E. biplaga* présentant des symptômes déjà décrits ont été fixées vivantes et examinées en histologie.

Les prélèvements ont été effectués parallèlement dans des lots non traités et dans des lots infectés avec les sérotypes H1 E. 61 variété *berliner* et H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM. Ces deux variétés ont été choisies afin de comparer la faible activité de la première et la forte pathogénicité de la seconde sur *E. biplaga*.

Quel que soit le moment du prélèvement des larves non traitées, les cellules de la paroi de l'intestin moyen ne présentent pas de lésion, la lumière intestinale est occupée par le bol alimentaire et la membrane péritrophique est intacte (fig. 1).

Les lésions proprement dites, après infection par le sérotype H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM, débutent par la fragmentation puis la destruction de la membrane péritrophique (12 h et 24 h ; fig. 2). Plus tard, les lésions des cellules intestinales deviennent de plus en plus importantes et 60 heures après le début des infections, on peut noter une destruction avancée atteignant même la membrane basale. Les bactéries sont alors présentes dans la cavité viscérale (fig. 3).

Après infection avec le sérotype H 1 variété *berliner* E. 61 étalon, les premières altérations ont lieu après 12 h et sont constituées par un gonflement des cellules, une vacuolisation du cytoplasme et une densification des noyaux (fig. 4). Au bout de 36 h, la pycnose des noyaux est très nette et la vacuolisation du cytoplasme augmente. Ceci se continue par la destruction d'une partie des cellules de la paroi intestinale, sans cependant atteindre l'intensité des destructions décrites précédemment (fig. 5).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats des essais réalisés nous ont amené à moduler leur interprétation en fonction de la dose infectante.

A la suite de l'infection à dose élevée, nous avons observé trois types de réponses des insectes, présentant des allures similaires chez les deux espèces d'*Earias* étudiées.

Ceci est une conséquence de la forte concentration de la suspension infectante. En effet, les réactions propres à chaque espèce d'*Earias* sont masquées par l'action toxémique puissante provoquée par cette dose. Les variations d'activité observées chez les différentes variétés sont le reflet de la différence de virulence de ces dernières pour *Earias*.

Les différentes variétés de *B. thuringiensis* testées doivent être regroupées en trois catégories définies comme suit :

- variétés peu pathogènes ;
- variétés moyennement pathogènes ;
- variétés fortement pathogènes.

Il est intéressant de noter que la deuxième catégorie contient les variétés utilisées contre *Earias* avec de faibles résultats (BURGERJON et GRISON, 1959 ; AL AZAWI, 1964 ; JACQUEMARD, 1982).

En outre, les variétés fortement pathogènes diffèrent de celles décrites par SALAMA et FODA (1983).

Contrairement aux résultats précédents, nous avons pu mettre en évidence, lors de l'infection à dose faible, une différence en fonction de l'espèce-hôte.

L'infection est trop faible pour être rapidement active, ce qui permet aux réactions spécifiques de chaque insecte de s'exprimer.

Alors qu'*E. biplaga* paraît peu ou pas affecté par les différentes variétés, *E. insulana* semble être plus sensible et même plus vulnérable au sérotype H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM.

L'évaluation des doses létales, tout en confirmant l'existence de ce gradient de pathogénicité que forment les différentes variétés de *B. thuringiensis*, met en évidence l'intérêt, pour la lutte contre ces deux espèces d'*Earias*, du sérotype H 7 variété *aizawai* qui se révèle être respectivement 10 fois et 100 fois plus actif que les sérotypes H 3a3b variété *kurstaki* et H 1 variété *berliner* E. 61 étalon précédemment utilisés.

L'étude histopathologique amène, elle aussi, à la même conclusion. Il existe une très nette différence dans l'intensité des lésions et la vitesse d'installation de celles-ci, selon que l'on s'adresse à une variété virulente ou non.

En ce qui concerne l'évolution des symptômes, plusieurs faits sont mis en évidence.

En effet, nous avons décrit dans la première phase de la première séquence évolutive un arrêt de consommation et une variation de l'aspect des chenilles. Cette première phase correspond à la juxtaposition de deux étapes difficilement séparables dans le temps.

La mise en évidence de ce phénomène ne se faisant que par comparaison avec l'alimentation d'animaux normaux, il faut considérer qu'il s'agit là de la révélation tardive d'une altération nettement antérieure et qui est la première manifestation de la maladie.

Cette séquence évolutive est extrêmement proche de celle décrite par ENDO et NISHITSUTSUI-UWO (1980) chez

Coupes histologiques de larves d'*Earias biplaga* Wlk.
 Histological sections of larvae of *Earias biplaga* Wlk.



Figure 1

Paroi intestinale de larve saine.

n. noyan cellulaire, cy. cytoplasme, c. cavité de cellule caliciforme, l.i. lumière intestinale, b.o. bordure en brosse, c.v. cavité viscérale. Semi-fine. Color. bleu de toluidine. G = 1 000.



Figure 2

Paroi intestinale de larve infectée depuis 12 h avec *B. thuringiensis* sérotype H 7 variété *aizawai*, b. bactéries, c.i. contenu intestinal, l.i. lumière intestinale. Color. Giemsa. G = 400.

Figure 3

Cavité viscérale de larve infectée depuis 60 h avec *B. thuringiensis* sérotype H 7 variété *aizawai*. Bactéries (b) dans la cavité viscérale (c.v.) après destruction complète de l'intestin, h. hémocytes, t.a. tissu adipeux. Color. Giemsa. G = 400.



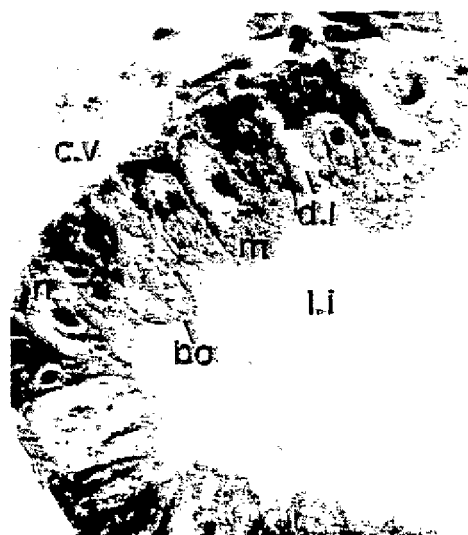


Figure 4

Paroi intestinale de larve infectée depuis 12 h avec *B. thuringiensis* sérotype H 1 E. 61 étalon variété *berliner*. Dissociation locale (d.l.) de quelques cellules. Absence de formes végétatives de *B. thuringiensis*. Altérations cellulaires : pycnose des noyaux (n.) gonflement des cytoplasmes (cy) et des microvillosités (m) formant la bordure en brosse (bo). Color. Giemsa.
G = 400.

Figure 5

Paroi intestinale de larve infectée avec *B. thuringiensis* sérotype H 1 E. 61 étalon variété *berliner* moins altérée qu'après l'infection avec le sérotype H 7 variété *aizawai*. l.i. lumière intestinale. Color. Giemsa.
G = 400.



Bombyx mori L. et correspond à certains symptômes décrits par VAGO (1956) à la suite d'une oligo-infection.

Ceci pourrait amener à penser que la maladie causée par *B. thuringiensis* se déroule avec les mêmes modalités quel que soit l'insecte-hôte. Ceci est en contradiction avec les travaux de HEIMPEL et ANGUS (1959) qui différenciaient trois types d'insectes-hôtes.

Ces différentes expérimentations ont abouti à plusieurs résultats.

En ce qui concerne la recherche appliquée, nous avons ainsi mis en évidence deux variétés agissant beaucoup plus rapidement que celles utilisées précédemment contre *Earias* et avec une intensité supérieure pour une dose moindre. De ces deux souches, la première, le sérotype H 5a5b variété *galleriae* est déjà commercialisée. La seconde, le sérotype H 7 variété *aizawai* souche BIOCHEM, a été retenue pour la lutte contre *Earias*. Ce choix a été dicté par l'efficacité de

cette variété, ainsi que par le fait qu'elle présente également une activité pathogène pour *Spodoptera littoralis* Boisd., autre ravageur du cotonnier.

En ce qui concerne la recherche fondamentale, un résultat important a été obtenu. Les essais à plusieurs concentrations effectués pour chaque variété ont montré lors des infections à faible dose, ou à forte dose avec des souches peu virulentes, l'existence d'une action pathogène lente.

Cet état morbide se rapproche de ce que VAGO (1956) a décrit chez *B. mori* sous le nom de maladie naturelle à *B. thuringiensis*. Il serait donc très utile d'envisager une étude expérimentale détaillée concernant les infections à *B. thuringiensis*, non pas avec une dose insecticide, mais avec une concentration provoquant une infection lente et chronique pour laquelle la forme de syndrome serait un enchaînement de toxicité et de multiplication.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur VAGO pour l'intérêt qu'il a porté à notre étude et pour les conseils

qu'il nous a prodigués au cours du déroulement de nos travaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABBOTT, W.S., 1925. — A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 17, 265-267.
2. AL-AZAWI, A.F., 1964. — Studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berl. on the spiny bollworm, *Earias insulana* Boisd. and other Lepidopterous insects. *Entomophaga*, 9, 137-145.
3. BOURNIER, J.P.; PEYRELONGUE, J., 1974. — Résistance à l'endrine d'*Earias insulana* (Boisd.) et *E. biplaga* (Wlk.), Lépidoptère Noctuidé, à Madagascar. *Cot. Fib. trop.*, 29, 3, 353-356.
4. BURGERJON, A.; GRISON P., 1959. — Sensibilité de différents Lépidoptères à la souche « anduze » de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*, 4, 207-209.
5. CROIZIER, G.; AMARGIER, A.; JACQUEMARD, P.; COUILLOU, R.; CROIZIER, L., 1981. — Polyédrose cytoplasmique d'*Earias biplaga* Wlk. Lépidoptère Noctuidae, due à un Réovirus à tropisme tissulaire large. *Cot. Fib. trop.*, 36, 127-135.
6. DELATTRE, R., 1972. — Parasites et maladies en culture cotonnière. *IRCT*, Paris, 146 p.
7. DULMAGE, H.T.; BOENING, O.P.; REHNBORG, C.S.; HAUSEN D.D., 1971. — A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Invertebr. Pathol.*, 18, 240-245.
8. ENDO, Y.; NISHITSUTSUI-UWO, J., 1980. — Mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin; histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 90-103.
9. HEIMPEL, A.M.; ANGUS, T.A., 1959. — The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *Insect. Pathol.*, 1, 152-170.
10. JACQUEMARD, P., 1982. — Résultats des essais de lutte microbiologique effectués en culture cotonnière au Cameroun en 1979, 1980, 1981. *Cot. Fib. trop.*, 37, 279-293.
11. LARGET, I.; DE BARJAC, H., 1981. — Activité comparée de 22 variétés de *Bacillus thuringiensis* sur trois espèces de Culicidae. *Entomophaga*, 26, 143-148.
12. NGUYEN-BAN, J., 1977. — Contribution à l'étude biologique et écologique d'*Earias biplaga* Wlk., Lepidoptera, Noctuidae, ravageur du cacaoyer. Thèse Doct. Sci. nat., Univ. Toulouse, 178 p.
13. RAMAKRISHNAN, N.; PANT, N.C., 1971. — Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the free amino acids and oxygen consumption in *Earias fabia* (Stoll.). *Indian J. Entomol.*, 33, 312-316.
14. SALAMA, H.S.; FODA, M.S., 1983. — Studies on the susceptibility of some cotton pests to various strains of *Bacillus thuringiensis* Zeit. *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1983, 91, 1, 65-70.
15. VAGO, C., 1956. — L'enchaînement des maladies chez les insectes. Thèse Doct. Sci. nat., Fac. Sci., Univ. Aix-Marseille, Mai 1956. Ed. spéc. Commis. Sér. Internation., Alès, France. *Ann. Epiphyties*, 1959, 10 (N° hors série) 1-181.

Compared activity of various varieties of *Bacillus thuringiensis* Berl. on two lepidopterous cotton pests, *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* (Boisd.)

R. Frutos, P. Jacquemard and A. Amargier

SUMMARY

A compared study on the effect of sixteen varieties of *Bacillus thuringiensis* on *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* (Boisd.) shows these species are particularly susceptible to serotype H 5a5b, *galleriae* variety, and H 7, *aizawai* variety.

Estimating the lethal dose stresses the advantages of using serotype 7 in *Earias* control. This serotype proves to be respectively 10 and 100 times more effective than serotypes H 3a3b, *kurs-*

taki variety, and H 1, *berliner* variety, generally used in field experiments.

This work is completed by a study on the evolution of the disease symptoms as related to the dose administered per insect. Examining histopathological sections allows to estimate the intensity of the lesions and their speed of installation according to the virulence of the variety.

KEY WORDS : cotton, biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Earias insulana*, *Earias biplaga*.

INTRODUCTION

Various Lepidoptera species of the genus *Earias* Hübner are cotton pests. Their chemical control is quite intense and in some countries (Madagascar) ten to twelve applications are made per season.

DELATRE (1972) as well as BOURNIER and PEYRELONGUE (1974) report distinct resistances to different chemical insecticides.

Today, pyrethroids are a good solution to the problem posed by *Earias*, but it is possible that the phenomenon of resistance appears again in a few years.

Some authors (BURGERION and GRISON, 1959; RAMAKRISHNAN and PANT, 1971) have observed that the use of a biological insecticide such as *Bacillus thuringiensis* Berliner had an effect on *Earias*. AL AZAWI (1964) gives a different result, as well as JACQUEMARD (1982) who, during tests on

biological control in Africa, showed that using *B. thuringiensis* gave satisfactory results even if it was not as efficient as chemical insecticides. However, the *B. thuringiensis* varieties used during these works belonged either to serotype 1 or to serotype 3, among more than twenty serotypes known today.

A compared study of the pathogenic effect of *B. thuringiensis* varieties proved necessary as to pinpoint their effectiveness on the two *Earias* species studied.

Working on the same principle, SALAMA and FODA (1983) tested the susceptibility of various cotton pests to *B. thuringiensis* with encouraging results.

The works described in this article deal with the compared study on the effect of sixteen *B. thuringiensis* varieties towards *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* (Boisd.).

MATERIALS AND METHODS

Origin of strains

The bacterial strains used were in the form of powders containing the spore - crystal complex. They were provided to us by M. DE BARJAC from the Institut Pasteur, by the BIOCHEM Company and the ABBOTT Company (Table 1).

The insects from which our rearing started were supplied by CIRAD Insects Nutrition and Rearing Laboratory. These strains came from the following countries :

E. biplaga : Ivory Coast, IRCC Station in Bingerville. This strain has been reared since April 1982.

E. insulana : Cameroon, Maroua Station. This strain has been reared since December 1981.

Insect rearing technique

We used an individual rearing method on a synthetic medium because it is very easy to use in case of infection.

This technique allowed us to work on a population « presumed sound », i.e. free from mortality ascribable to *B. thuringiensis*.

We used the nutrient medium developed by COULLLOUD and GIRET made up as follows :

medium	water	1 l
	agar	23.3 g
phagostimulating and nutrient substances	ground maize	186.7 g
	wheat germ	46.7 g
	yeast	50 g
	mineral salts	13.3 g
	vitamin diet	13.3 g
	yolk	8.3 g
	ascorbic acid	16.7 g
	maize oil	5 ml
preserving agent	sorbic acid	4 g

Nymphs were taken and placed at the rate of 30 per box. The lids of these transparent polystyrene boxes were cut up for aeration purposes. A tube filled with water honeyed at 10 % with a wick jutting out above was also placed in the boxes. A gauze was put between the box and the lid. Laying was promoted at least for *E. biplaga*, by a group effect (NGUYEN-BAN, 1977). A blue-coloured 25 W bulb placed in the cell gave light during scotophase and favoured adult mating.

The gauzes on which eggs were laid were taken out every day. After 24 h, they were placed in a polystyrene box the bottom of which was replaced by a wire mesh, so that the eggs could be dipped into a disinfectant solution during four minutes : sodium hypochlorite (47/50 chloro) ; distilled water 100 ml ; Hexagon 1 ml. Disinfected eggs were put into a box at the bottom of which nutrient medium was placed. The gauze was maintained by the lid of the box having a hole covered by wire mesh. It had to be seen to it that the gauze did not touch the medium, as to prevent the embryos from being humidified. Afterwards, the boxes were placed in the dark.

The first larval stage was carried out in the box where the eggs hatched. The worms were taken at the second stage and individually reared in boxes composed of plastic rectangular compartments containing nutrient medium. These boxes were then covered with a plastic mesh and a pierced plexiglass plate. The medium was renewed every eight days.

All the rearing stages, as well as the infections, took place in air - conditioned rooms adjusted as follows : temperature 25 °C ; relative humidity 65 % ; photoperiod-scotoperiod 12-12.

Bacterial cultures

We used the following mediums :

LPGA solid medium : yeast extract 5 g ; peptone 5 g ; glucose 5 g ; agar 30 g ; distilled water 1 l. The medium was autoclaved and put in a petri dish or a tube ;

UG liquid medium (LARGET, 1981).

The number of viable spores in the powders or cultures was determined after successive dilutions and sowing.

Infection technique

Infections were achieved according to the following technique : in the artificial nutrient medium, sorbic acid was replaced by Nipagine and benzoic acid at 2.5 g/l and

2 g/l respectively. pH was adjusted at 6. A known suspension of *B. thuringiensis* spores was added and mixed by agitation to the liquid medium which was afterwards poured in the box and pressed to obtain a constant thickness of 1 mm (BURGERJON, personal communication).

The compared study on the activity of sixteen *B. thuringiensis* varieties was carried out on homogeneous groups of fifty third-stage larvae controlled during eight days. For each variety, we performed infections with two different doses : one regarded as strong with 10^5 spores per millilitre of nutrient medium and the other regarded as low with 10^3 spores per millilitre of medium.

We had a check group for each infection. The results shown here express pooled percentages of mortality after correction with ABBOTT formula (1925), taking its limits of utilization into account :

$$\% \text{ corrected mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} \times \% \text{ check mortality}}{100 - \% \text{ check mortality}} \times 100$$

As far as LD 50 tests are concerned, the varieties chosen were serotypes H 1 *berliner* variety standard E 61, H 3a3b *kurstaki* variety and H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain.

We used suspensions with the following concentrations : 10^6 , 10^4 , 10^3 and 10^2 spores per millilitre of medium. An untreated check group was also formed and each dose was tested on a group of fifty third - stage larvae controlled during eleven days.

We used the probit method to calculate lethal doses.

Histopathology techniques

Larvae showing typical infection symptoms were taken every twelve hours and fixed with Carnoy 2 during twenty - four hours. Sections of 5 μ m in thickness were coloured by Giemsa - eosine to show bacteria and 0,3 μ m sections were coloured with toluidine blue.

RESULTS

Numeration of viable spores

The results are given in Table 1.

Compared activity of the sixteen *B. thuringiensis* varieties on *E. biplaga* and *E. insulana* (Plates 1 to 4 and Tables 2 and 3)

Results observed on infections with a high dose (10^5 spores/ml of medium)

We can observe that the mortality curves corresponding to this dose are similar for each variety in *E. biplaga* and *E. insulana*, except for serotype H 12 *thompsoni* variety.

Three types of response to infection can be outlined.

The first type corresponds to a slow variation in mortality rate at the beginning of the experimentation, followed by a very rapid increase in the number of dead at the end of the test (serotypes H 1, H 3a, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 6 *entomocidus*).

The second type of response corresponds to a rapid increase in mortality just after the infection which declines markedly afterwards (serotypes H 5a5b, H 6 *subtoxicus*, H 7).

The last type corresponds to a very low mortality rate even after eight days (serotypes H 2, H 9, H 10, H 11, H 12, H 14).

Results obtained on infections with a low dose (10^3 spores/ml of medium)

These results are completely different from those obtained before since they vary with the host-species.

In *E. biplaga*, the response changes very little from one species to the other. Mortality is either very low with serotypes H 1, H 2, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 6 *subtoxicus*, H 7, H 9, H 11, H 12 or nil with serotypes H 3, H 5a5b, H 6 *entomocidus*, H 10, H 14.

In *E. insulana*, serotype H 3a *alesti* variety excepted, mortality is never nil. Whereas it is often low (H 1, H 2, H 3a3b, H 4a4b, H 4a4c, H 5a5b, H 6 *subtoxicus*, H 7, H 9, H 10, H 14), it can sometimes be higher at the end of the experiment (H 6 *entomocidus*, H 11, H 12) even considerable as in the case of serotype H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain.

Commercial serotypes, i.e. serotypes H 1 *berliner* variety and H 3a3b *kurstaki* variety produce a relatively low mortality rate.

Two strains, serotypes H 5a5b *galleriae* variety and H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain, produce higher mortality rates than the other varieties, between 90 and 100 % and in a shorter period of time.

The activity of serotype H 6 *entomocidus* variety is similar to that of the two previous serotypes, although lower.

Estimate of the pathogenic activity of some species of *B. thuringiensis* on *E. biplaga*

The results appearing in Table 4 and Plate 5 show on three precise cases, characteristics of a strong, medium and low virulence, the clear-cut differences existing in the pathogenic activity of the various serotypes used.

As in the previous results, serotype H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain is highly virulent on *E. biplaga*.

The results of this test were translated in number of spores per millilitre of nutrient medium ; afterwards, we determined the biological concentration according to the method of DULMAGE *et al.* (1971).

Evolution of symptoms and lesions

Various typical stages of *B. thuringiensis* disease were given prominence to during the tests. These symptoms can be properly visible only if the infectious dose is not too high. Otherwise, relatively rapid mortality disturbs the succession of these stages.

Two types of evolution can be distinguished, if the dose administered is medium, death being the outcome, or low, following insect development.

First type of symptom evolution :

- 1st stage — feeding is stopped and larvae take a rough, colourless and melanized aspect. Behaviour is normal.
- 2nd stage — weight growth and casting are stopped. Larvae do not develop beyond stage 3.
- 3rd stage — larvae are motionless or move with unusual slowness. However, their response to pinching and mechanical shocks is strong.
- 4th stage — larvae are paralysed and often coiled up. The only response to mechanical excitation is thoracic leg or head movement ; this response is not immediate and requires several successive excitations.

The results of the tests carried out led us to adapt their interpretation to the infecting dose.

With the infection by a high dose, we observed three types of response, which were similar in the two *Earias* species studied.

This results from the high concentration of the infecting suspension. The specific reactions of each *Earias* species are hidden by the strong toxic action produced by this dose. The variations of activity observed in the varieties reflect the difference in virulence towards *Earias*.

The *B. thuringiensis* varieties tested should be grouped into three categories :

- relatively non pathogenic varieties ;
- moderately pathogenic varieties ;
- highly pathogenic varieties.

It should be noted that the second category includes the varieties used against *Earias* with poor results (BURGERJON and GRISON, 1959 ; AL AZAWI, 1964 ; JACQUEMARD, 1982).

Besides, the highly pathogenic varieties are different from those described by SALAMA and FODA (1983).

Contrary to the previous results, we could show a difference according to the host-species after the infection with a low dose.

Infection is too low to be quickly active so that the specific reactions of each insect can express themselves.

5th stage — larvae are either dead or without response to mechanical excitations.

Second type of symptom evolution :

- 1st stage — larvae appear more colourless ; consumption is decreased but not stopped.
- 2nd stage — larvae are less developed than check insects but growth continues.
- 3rd stage — nymphosis occurs ; although nymphs are small and late, they give adults.

E. biplaga larvae showing above - mentioned symptoms were fixed alive and examined by histology.

Larvae were taken at the same time from untreated groups and from groups infected with serotypes H1 *E. 61 berliner* variety and H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain. These varieties were selected to compare the low activity of the first and the high pathogenicity of the second on *E. biplaga*.

No matter when untreated larvae were taken, the cells of the midgut wall showed no lesion, the gut cavity was occupied by the bolus and the peritrophic membrane was intact (Figure 1).

The actual lesions, after infection by serotype H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain, started by the fragmentation of the peritrophic membrane followed by its destruction (12 and 24 h ; Figure 2). Later, the lesions of the intestinal cells grew bigger and 60 hours after the beginning of the infections, advanced destruction could be observed, even on the basal membrane. In that case, bacteria were present in the visceral cavity (Figure 3).

After infection with serotype H 1 *berliner* variety standard *E. 61*, the first alterations appeared after 12 hours ; they consisted in swollen cells, vacuolated cytoplasm and densified nuclei (Figure 4). After 36 hours, nuclei pycnosis was distinct and cytoplasm vacuolation increased. This was continued by the destruction of part of the cells of the intestine wall, which however did not reach the intensity of the destructions described above (Figure 5).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Whereas *E. biplaga* seems little or not affected by the different varieties, *E. insulana* seems to be more susceptible and even very vulnerable to serotype H 7 variety *aizawai* BIOCHEM strain.

At the same time as it confirms the existence of this pathogenicity gradient formed by the different varieties of *B. thuringiensis*, the estimate of lethal doses shows the advantage of using serotype H 7 *aizawai* variety to control these two *Earias* species ; this serotype proves to be respectively 10 and 100 times more active than serotypes H 3a3b *kurstaki* variety and H 1 *berliner* variety standard *E. 61* used before.

The histopathological study leads to the same conclusion. A clearcut difference exists in the intensity of the lesions and their speed of installation, depending on whether the variety is virulent or not.

As far as symptom evolution is concerned, several facts are given prominence to.

We have observed in the first stage of the first evolutive sequence that consumption stopped and that the aspect of the larvae changed. This first stage corresponds to the juxtaposition of two stages which are difficult to separate in time.

As this phenomenon is made prominent only by comparison with the feeding of normal insects, it should be considered that we are dealing with the late revelation of a clearly earlier alteration which is the first outward sign of the disease.

This evolutive sequence is very close to that described by ENDO and NISHITSUTSUJIUWO (1980) in *Bombyx mori* L. and corresponds to some symptoms described by VAGO (1956) after an oligo-infection.

This could indicate that the disease caused by *B. thuringiensis* has the same symptoms, whatever the host-insect. This is inconsistent with the works of HEIMPEL and ANGUS (1959) who differentiated three types of host-insects.

These experimentations led to several results.

As far as applied research is concerned, we gave prominence to two varieties acting much more quickly than those used before on *Earias* and with a greater intensity at a smaller dose. The first strain, serotype H 5a5b *galleriae* variety, is already marketed; the second, serotype H 7 *aizawai* variety BIOCHEM strain, was selected to control *Earias*. This choice was conditioned by the effectiveness of

this variety and by the fact it also has a pathogenic activity on another cotton pest, *Spodoptera littoralis* Boisd.

As far as fundamental research is concerned, an important result has been obtained. The tests with several concentrations performed for each variety have shown after infections with a low dose, or a strong dose with varieties of very little virulence, the existence of a slow pathogenic action.

This morbid state is similar to what VAGO (1956) described in *B. mori* under the name of *B. thuringiensis* natural disease. It therefore would be very interesting to carry out a detailed experimental study on *B. thuringiensis* infections, not with an insecticide dose but with a concentration causing a slow and chronic infection for which the form of syndrome would be a sequence of toxicity and multiplication.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are extended to Professor VAGO for the interest he took in our study and the pieces of advice he gave us while we were carrying out our research.

RESUMEN

Un estudio comparado de la acción de 16 variedades de *Bacillus thuringiensis* hacia los Lepidópteros Noctuidos *Earias biplaga* Wlk. y *Earias insulana* (Boisd.) hace aparecer una sensibilidad particular de estas dos especies a los serotipos H 5a5b, variedad *galleriae*, y H 7, variedad *aizawai*.

La estimación de las dosis letales destaca el interés que pueda aportar la utilización del serotipo 7 para la lucha contra las *Earias*. Este serotipo se revela ser respectivamente 10 y 100 veces más

activo que los serotipos H 3a3b, variedad *kurstaki* y H 1, variedad *berliner*, habitualmente utilizados en experimentaciones en el terreno.

Este trabajo es completado por un estudio de la evolución de los síntomas de la enfermedad en relación con la dosis administrada al insecto. Un examen de cortes histopatológicos permite evaluar la intensidad de las lesiones y su velocidad de instalación en función de la virulencia de la variedad.