

## Compte rendu d'activité – Projet Protect' Agrumes – Année 2019

### **I. Introduction**

La protection des cultures est amenée à évoluer vers des stratégies innovantes visant à diminuer l'utilisation d'intrants chimiques de synthèse. En effet, l'importance de la contamination des milieux et des productions, les incidences sur la santé humaine et des écosystèmes génèrent une attente sociétale forte pour un nouveau mode de gestion des bioagresseurs des cultures. L'ambition du projet Protect' Agrumes est la mise au point de systèmes de production à bas intrants, en favorisant des stratégies de biocontrôle. Il associe les acteurs publics et privés de la recherche (UMR « Institut Sophia Agrobiotech », Université de Corse, UCPP), de la recherche appliquée (AREFLEC) et du développement agricole (INTERBIO Corse, IBC) ainsi que des partenaires professionnels (agriculteurs et entreprises). Ce projet mobilise des compétences provenant de disciplines complémentaires telles que la chimie du vivant, la biologie végétale, des organismes et des populations, la biochimie et microbiologie. Par le lien amont-aval, il garantit le transfert des innovations et la création de valeurs ajoutées pour une agriculture corse durable et compétitive.

### **II. Etats des lieux de l'action et prévisionnel 2019**

L'année 2018 a vu le démarrage du projet Protect' Agrumes avec la réunion de lancement le 23 Octobre. Au cours de cette réunion de lancement, les différents partenaires ont défini un calendrier des tâches en rapport avec les différentes thématiques du projet et conformément au programme proposé aux financeurs. Le projet s'articule autour de 2 grands axes, **I. Méthodes de lutte** (partie 1 – Lutte biologique, partie 2 – médiateurs chimiques) et **II. Biostimulants et biocides**. L'ARELEC est impliquée dans chacune des thématiques développées dans le projet. En 2019, les travaux prévus au sein de chaque action étaient les suivants :

#### **Axe I – Méthodes de lutte - Partie 1 – Lutte biologique**

##### **❖ Lutte biologique par augmentation**

- Lutte contre les cochenilles farineuses
  - Finalisation de la confection du matériel d'élevage
  - Collecte sur le terrain des hôtes nécessaires aux élevages d'auxiliaires (*Pseudococcus viburni* et *Planococcus citri* pour l'élevage de *Cryptolaemus montrouzieri* et *Leptomastix dactylopii* et *Ceratitis capitata* pour l'élevage de *psytallia concolor*)
  - Mise en élevage de routine des hôtes
  - Collecte/Achat des auxiliaires et mise en élevage
  - Evaluation du rendement des élevages une fois en production de routine.
  
- Lutte contre les mouches des fruits (*Bactrocera oleae*, la mouche de l'olive et *Ceratitis capitata*, la mouche méditerranéenne des fruits)
  - Confection matérielle d'élevage
  - Recrutements INRAe et mise à disposition à l'AREFLEC

- Collecte sur le terrain et adaptation des souches de Cératites locales aux conditions d'élevage.

❖ Lutte biologique par acclimatation

- Etablissement d'un calendrier avec le partenaire INRA pour la capture et mise en élevage des auxiliaires ainsi que pour les lâchers.

**Axe I – Méthodes de lutte - Partie 2 – Médiateurs chimiques et Axe II – Biocides et biostimulants**

Les actions de l'année 2019 mises en œuvre par l'AREFLEC concernant la partie 2 de l'axe 1 et l'axe 2 viseront à faire les évaluations en laboratoire des substances produites par les partenaires (phéromones, produits végétaux, ...) :

- Mise au point de protocoles (réunion dans ce but en Février 2019 entre les différents partenaires)
- Achat du matériel (si nécessaire)
- Mise en œuvre des tests en laboratoire

**Animation du consortium**

Le comité de pilotage de mi-terme qui s'est tenu entre les quatre partenaires le 7 Février 2020. L'objectif de ce comité de pilotage était de faire un état des lieux de l'avancée des travaux, des difficultés rencontrées et d'apporter collectivement les réponses et les modifications stratégiques pour atteindre les attendus du projet. Bien que s'étant tenue en 2020, il convient de mentionner cette réunion puisque certaines décisions décrites dans le présent document y ont été validées par l'ensemble des partenaires. L'organisation et le compte-rendu de ce comité de pilotage ont été à la charge de l'AREFLEC et seront communiqués par ailleurs.

**III. Bilan des réalisations**

**Axe I – Méthodes de lutte - Partie 1 – lutte biologique**

❖ Lutte biologique par augmentation

➤ Lutte contre les cochenilles farineuses

- *Support végétal*

Les cochenilles sont élevées sur des pommes de terre germées. Deux tonnes de pommes de terre ont été livrées à l'AREFLEC en Janvier 2019 et stockées à  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  d'Humidité Relative. Pour produire un support végétal régulièrement pour la routine d'élevage, le cycle de mise en germination dans la synthèse bibliographique produite en 2018 a été éprouvé. L'activation de la germination se fait par le passage des pommes de terre à  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\% \pm 10\%$  HR pendant 2 semaines. Une fois la germination initiée, les pommes de terre sont placées à  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  HR pour accélérer la croissance des germes pendant 3 semaines minimum (jusqu'à ce que les germes atteignent au moins 10cm).

Bien que le cycle ait pu être éprouvé avec succès, la difficulté principale a résidé dans le maintien des conditions souhaitées. Pendant la période Juin-Septembre, les fortes chaleurs et le niveau d'humidité élevé ont provoqué le développement de moisissures et la dégradation rapide du végétal occasionnant des pertes importantes. Par ailleurs, les tempêtes du début d'année ont provoqué des coupures de courant

et une élévation de la température dans la pièce de stockage, occasionnant encore une fois une dégradation du végétal sur le long terme.

Les limites concernant cette étape clé dans la mise au point des pilotes d'élevage sont donc avant tout techniques et matérielles. Pour pallier à ces contraintes, une procédure de surveillance systématique des chambres de développement été mise au point.

Compte-tenu du retard pris dans la collecte et la mise en élevage des cochenilles (voir paragraphe suivant) Le cycle de germination a été éprouvé sur des petites quantité et mis en routine uniquement à partir de Septembre.

- Collecte et mise en élevage des ravageurs

Comme mentionné dans le compte-rendu de réalisation de 2018, une mise à niveau des pièces climatiques était nécessaire pour permettre une maîtrise de la température et de l'humidité dans chacune de celle-ci. Ces travaux ont été réalisés entre Avril et Aout 2019 et ont retardé la collecte des ravageurs et des auxiliaires sur le terrain et leur mise en élevage. Des prélèvements de cochenilles farineuses ont néanmoins été réalisés à diverses point de la plaine orientale (Figure 1) à partir de juin-juillet pour initier les élevages (maintenus aussi bien que possible sans pièces climatiques). A partir de Septembre, pour augmenter les populations, les élevages ont été placés dans les pièces climatiques selon les conditions décrites dans la synthèse bibliographique produite en 2018 (25°C, 70% d'hygrométrie relative, obscurité totale). En Novembre, 29 femelles adultes ont été isolées pour leur permettre de pondre pendant une semaine (Figure 2). Après une semaine, ces femelles ont été mise en alcool et envoyées à l'INRAe de Sophia-Antipolis pour identification de l'espèce. Toutes les descendance des femelles identifiées de l'espèce *Planococcus citri* (26 sur 29) (Tableau 1) ont été rassemblées et utilisées pour initier l'élevage de masse. Le passage en routine a donc été initié fin 2019-début 2020 (Figure 3).

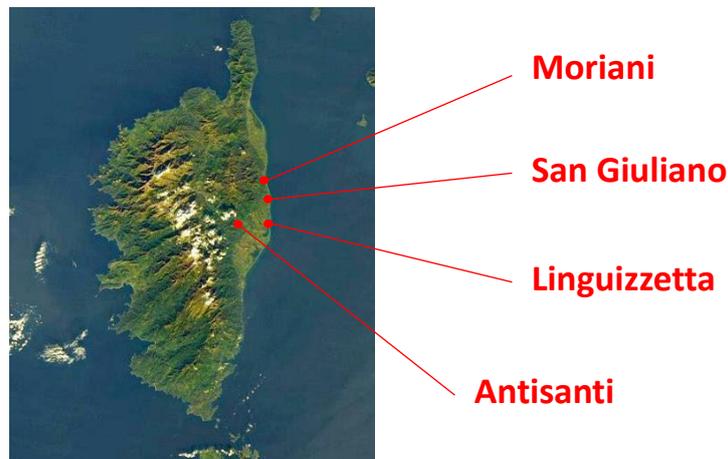


Figure 1 – Sites des prélèvements de cochenilles farineuses illustrés sur la photo satellite de la Corse



**Figure 2 – Photo des dispositifs de ponte des femelles isolées (chaque cylindre contient 2 pommes de terre germées sur lesquelles a été déposé une femelle adulte)**

**Tableau 1 – Identification moléculaire de l'espèce des femelles isolées**

ID extraction	Sexe	Parasitoïde	Cochenille	SEQ	ID BM BLAST
40505	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40506	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40507	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40508	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40509	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40510	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40511	N/A	N/A	+	Failed	___
40512	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40513	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40514	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40515	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40516	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40517	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40518	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40519	N/A	N/A	+	Failed	___
40520	N/A	N/A	+	Failed	___
40521	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40522	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40523	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40524	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40525	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40526	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40527	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40528	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40529	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40530	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40531	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40532	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri
40533	N/A	N/A	+	+	100.0%_LC121493_Planococcus citri



Figure 3 – Photo d’une boîte d’élevage de masse de cochenilles farineuse *Planococcus citri*.

- Collecte et mise en élevage des auxiliaires

Sans production de ravageurs avant la fin de l’année 2019, il était impossible d’espérer produire un élevage d’auxiliaires pour cette année. La collecte d’auxiliaires a donc été repoussée à la campagne de 2020 (Juillet-Octobre). Ce retard a néanmoins permis deux choses :

- La ré-évaluation de la pertinence de l’élevage des auxiliaires envisagés. En effet, l’élevage de deux auxiliaires était envisagé, un prédateur généraliste de cochenilles farineuses, la coccinelle *Cryptolaemus montrouzieri*, et un parasitoïde spécialiste de *P. citri*, *Anagyrus* aff. *Pseudococci* ou *Leptomastix dactylopii*.

Ce choix avait été fait sur 2 critères :

- Efficacité d’un complexe d’auxiliaires comparé à un auxiliaire seul.
- Production locale pour une meilleure adaptation aux ravageurs locaux et une arrivée en meilleur état des organismes sur les exploitations.

Néanmoins, en accord avec l’INRAE, partenaire principal sur cette action, il a été décidé de réorienter le choix des auxiliaires vers *Anagyrus* aff. *Pseudococci* ou *Leptomastix dactylopii*. Ce choix a été motivé par la bonne tenue des coccinelles *C. montrouzieri* déjà commercialisées par plusieurs entreprises, à leur arrivée en Corse, et l’impossibilité d’être concurrentiel face à des entreprises de cette envergure. A l’inverse, les parasitoïdes produits par ces entreprises arrivent souvent en mauvais état et la pertinence d’un élevage local est toujours validée. De plus, *P. citri* étant ultra-majoritaire parmi les cochenilles farineuses sur agrumes en Corse, il est plus judicieux d’orienter les élevages vers des auxiliaires spécialistes de ce ravageur.

- L’utilisation de l’élevage de cochenille en phase de production de masse à partir de Décembre 2019 pour mettre au point des dispositifs « sentinelles » (cochenilles issues de l’élevage placées dans la nature pour être parasitées et recollectées ensuite)

- Perspectives 2020

Bien que les réalisations de l’année 2019 n’est pas pu répondre totalement à l’avancée prévisionnelle des tâches, l’expérience acquise va permettre de mener à bien les pilotes d’élevage en 2020. Dans le but de produire des auxiliaires en masse pour pouvoir effectuer les premières distributions en 2021 à l’issue du projet, la collecte d’auxiliaires et leur mise en élevage seront les principales missions d’un agent recruté en 2020 en CDD (6 mois) dans le cadre du projet.

- Lutte contre les mouches des fruits (*Bactrocera oleae*, la mouche de l’olive et *Ceratitis capitata*, la mouche méditerranéenne des fruits)

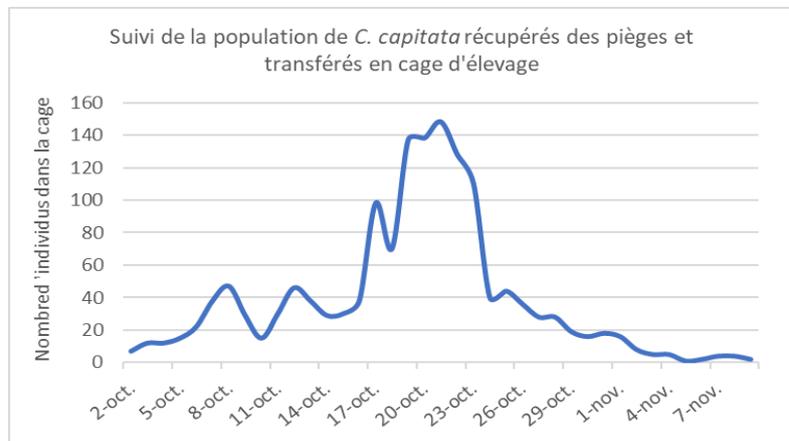
Cette action a été principalement soutenue par Pauline SCHNELL (ingénieure) et Pierre SERIN (technicien) recrutés par l’INRAE en Septembre et mis à disposition de l’AREFLEC. Leurs travaux ont consisté :

- 1- A la fabrication du matériel selon les protocoles établis par l'INRAE et décrits dans la synthèse bibliographique de 2018.
- 2- Aux prélèvements de mouches méditerranéennes des fruits dans les vergers d'agrumes corses.
- 3- L'adaptation de ces souches sauvages aux conditions d'élevage pour initier les élevages de masse.
- 4- La collecte de mouches de l'olive parasitées par des parasitoïdes *Psytalia concolor* pour tenter de maintenir une souche en laboratoire pour éviter de retarder leur prélèvement à 2020.

- **Prélèvement d'insectes dans la nature et initiation des élevages**

Pour récupérer des adultes *C. capitata*, nous avons tout d'abord utilisé des pièges attractifs à *C. capitata* mais sans insecticides afin de collecter des individus vivants. Cette méthode de prélèvement permet d'avoir des individus qui peuvent pondre immédiatement et donc de gagner du temps. Nous avons donc mis en place, d'octobre à décembre, une dizaine de pièges Decis trap sans insecticides dans des parcelles d'agrumes. Nous avons collecté les individus deux fois par jour pour récupérer le maximum de mouches vivantes.

Sur l'ensemble des pièges installés, uniquement quelques pièges ont permis de récupérer des individus vivants. Sur les deux mois de collecte, un total de 476 *C. capitata* ont été capturés. Ces individus ont été transférés dans une cage d'élevage avec de l'eau et de la nourriture. Cependant, cette cage d'élevage a rarement dépassé plus de 140 individus (cf. graphique 1) en raison d'un fort taux de mortalité.



**Figure 4 - Suivi de la population de *C. capitata* en cage d'élevage (capturés par les pièges)**

Les captures à partir de pièges non destructifs ont été arrêtées en raison de la mortalité rapide des individus capturés et de l'absence de ponte des femelles.



**Figure 5 - Boîtes d'émergences avec des fruits infestés par *C. capitata***

En parallèle, de mi-octobre à fin février, nous avons collecté des fruits de saison attaqués par *C. capitata*. Chaque collecte de fruit a été placée dans des boîtes d'émergence avec du sable pour la formation des pupes de *C. capitata* (cf. figure 1). Les boîtes ont ensuite été stockées en pièce climatique (température 22°C et 60% d'humidité relative) pour favoriser le développement des individus.

Au fil des mois, nous avons collecté des citrons, des oranges, des clémentines, des figues, des pomelos, des pommes et des poivrons à des dates et lieux de récolte différents. Les clémentines sont les fruits qui

ont permis de collecter le plus grand nombre de *C. capitata* (cf. tableau 1). Les mouches émergentes de ces fruits ont été indispensables pour l'initiation de l'élevage de *C. capitata*.

**Tableau 2 - Tableau résumant le nombre total de fruits collectés, le nombre de fruits contenant potentiellement des larves et le nombre de *C. capitata* récupérées**

Type de fruits	Nombre de collecte	Nombre total de fruits collectés	Nombre de fruits contenant potentiellement des larves	Nombre de <i>Ceratitis capitata</i> récupérées
Citron	8	8	0	0
Orange	10	35	9	23
Clémentine	37	835	<b>502</b>	<b>454</b>
Figue	1	20	20	58
Pomelo	3	19	0	0
Pomme	3	46	11	4
Poivron	1	11	10	16

Cette méthode de prélèvement des *C. capitata* a été retenue pour les futures collectes de mouches puisque les individus récupérés ont une meilleure longévité que les individus des pièges. De plus, les individus des fruits sont plus actifs, ils s'accouplent entre eux et les femelles pondent des œufs (nécessaire pour l'initiation de l'élevage). L'inconvénient de cette méthode est la dégradation rapide des fruits suite au développement des larves. L'état des fruits doit être surveillé en permanence pour éviter une trop forte décomposition des fruits.

Durant le reste de l'année, nous continuerons à prélever des fruits (pomelo en mars, puis fruits d'été à partir de juin et agrumes à partir d'octobre) afin de récupérer un maximum de *C. capitata* pour augmenter plus rapidement les densités de population des élevages et la production d'œuf.

- **Adaptation de la souche de Cératites aux conditions d'élevage**

Les adultes sont placés dans une cage d'élevage contenant de l'eau et de la nourriture (température 22°C et 60% d'humidité). Les femelles pondent des œufs à travers une maille très fine. Les œufs se retrouvent ensuite dans un bac d'eau situé sous la maille. Ils sont récupérés et transférés sur un milieu de culture artificiel (à base de poudre de carotte, de levure et de flocons de pomme de terre) (cf. figure 3). Les œufs se développent en larve puis en pupes. Entre ces deux stades de développement, le milieu est transféré dans un contenant avec du sable pour la pupaison (cf. figure 3). Après quelques jours, de nouveaux individus émergent et un nouveau cycle de production peut commencer.



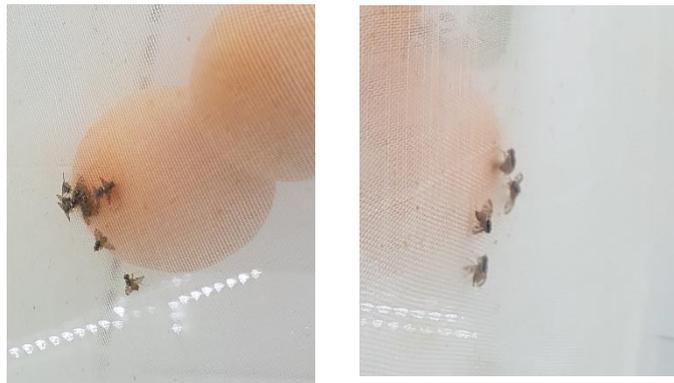
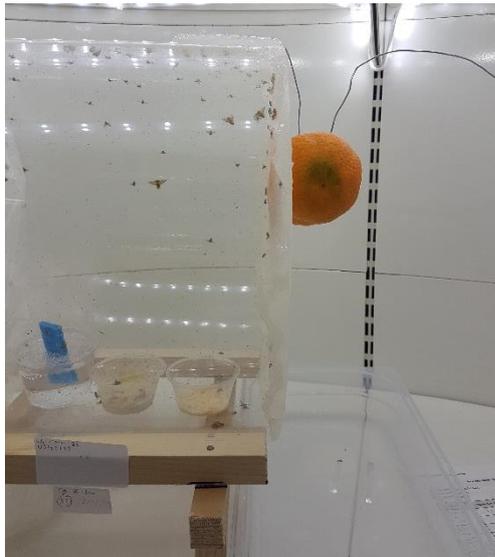
**Figure 6 : Pot avec milieu de culture et œufs - Transfert dans grand pot avec sable pour les pupes - Collecte d'adultes émergents**

Dans la plupart des laboratoires, les élevages de *C. capitata* démarrent avec des mouches domestiquées depuis plusieurs générations, et donc complètement adaptées aux conditions de laboratoire. Dans notre cas, nous ne débutons pas l'élevage avec des individus domestiqués mais avec des individus sauvages

que nous prélevons dans la nature. Ainsi, la difficulté majeure de notre élevage concerne l'adaptation de ces mouches sauvages à des conditions d'élevage artificielles.

#### Problèmes rencontrés : difficulté d'adaptation des mouches à pondre à travers la maille fine

A partir de mi-novembre, les premières émergences de mouches des fruits ont été transférées dans une cage d'élevage. Après quelques jours dans la cage, ces individus ne pondaient toujours pas à travers la maille. Pour stimuler l'oviposition des femelles à travers la maille, nous avons décidé d'accrocher des clémentines fraîches sur la face extérieure de la maille. Suite à la présentation de ces clémentines, nous avons pu observer un regroupement d'individus en face des clémentines et des femelles essayant de pondre à travers la maille dans les clémentines (cf. figure 4).



**Figure 7 : Cage d'élevage avec les clémentines fixées à la maille et bac d'eau situé sous la maille – Regroupement d'individus en face des clémentines – Observation d'une femelle qui pond des œufs dans la clémentine à travers la maille**

A partir de début décembre, nous avons pu collecter les premiers œufs de *C. capitata* dans le bac d'eau et commencer le premier cycle de production. Toutefois, les quantités d'œufs récupérées étaient faibles durant le mois de décembre (cf. graphique 2). Afin d'augmenter la production d'œufs, nous avons cherché une autre méthode permettant de stimuler davantage l'oviposition des femelles et de s'affranchir des fruits périssables. Une étude réalisée par Levinson et al. (2003) a montré que les femelles étaient attirées par la forme ronde et la couleur orange des fruits. Nous avons donc tenté de suspendre des disques orange en papier canson devant la cage. Cependant, nous n'avons pas observé d'effets sur l'attraction des mouches. Une autre étude menée par Ioannou et al. en 2012 a mis en évidence une augmentation de la production d'œuf en présence d'1µL d'huile essentielle d'orange douce. Prochainement, nous allons tester cette huile pour stimuler la ponte de nos individus d'élevage.

D'autre part, nous avons également échangé avec des chercheurs de l'Université de Pise qui possèdent également des élevages de *C. capitata* et de *P. concolor* pour voir d'autres techniques d'élevage. Dans leurs élevages, ils positionnent les sources de lumière en face des mailles des cages pour attirer les individus. Nous avons donc fait de même en ajoutant une source de lumière devant la maille (cf. figure 5). Effectivement, nous avons pu



**Figure 8 : Cage d'élevage avec ajout de clémentines et d'une source de lumière en face de la maille**

apercevoir que les mouches étaient attirées par la lumière et qu'un plus grand nombre d'individus était présent sur la maille (lieu de ponte).

Finalement, en l'espace de trois mois, nous avons pu produire deux générations de descendants. Au fil des générations, nous avons pu observer une augmentation progressive de la production d'œuf. Le graphique 2 montre l'évolution de la production d'œufs dans le temps. Trois pics de production sont identifiables pour chaque mois avec, au cours du temps, une augmentation d'amplitude du pic de production. Ces résultats sont prometteurs pour la suite des élevages de *C. capitata*.

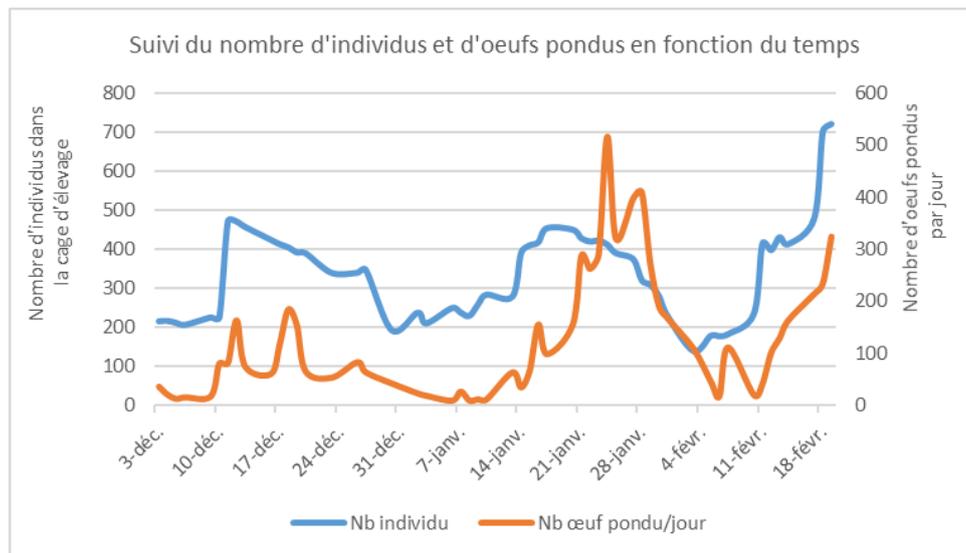


Figure 9 : Suivi du nombre d'individus dans la cage et du nombre d'œuf pondu par jour en fonction du temps

#### Problèmes rencontrés : développement bactérien sur le milieu de culture

- Les premiers œufs récupérés à partir du début du mois de décembre ont été transférés dans des milieux de culture (recette de l'INRAE Sophia Antipolis). Cependant, peu de temps après l'ajout des œufs, des bactéries se sont développées sur ces milieux de culture, empêchant ainsi le développement des individus (cf. figure 6).



Figure 10 : Développements bactériens sur les milieux de culture

Nous avons donc procédé à une série d'expériences pour améliorer la conservation du milieu de culture. Le tableau 3 reprend les modifications mises en place et les observations du milieu après quelques jours de stockage. En reprenant les résultats positifs de certaines de ces modifications, nous avons établi un protocole précis prenant en compte une conservation à température ambiante et un mélange des

ingrédients à froid. Nous avons également amélioré la technique de prélèvement des œufs afin de limiter la propagation de bactéries. Enfin, nous avons choisi de ne pas augmenter les quantités de conservateurs puisque ces derniers peuvent avoir, à plus fortes doses, des effets négatifs sur le développement des larves. L'ensemble de ces mesures nous a permis d'empêcher le développement bactérien sur les nouveaux milieux.

**Tableau 1 : Résultats des améliorations de la recette du milieu de culture**

Modification de la recette	Observations du milieu
Conservation du milieu au réfrigérateur	Condensation
Conservation du milieu à température ambiante	Pas de développement bactérien
Mélange à froid	Pas de développement bactérien
Mélange à chaud	Développement bactérien
Augmentation de la quantité de conservateurs	Pas de développement bactérien

Problèmes rencontrés : mauvaise consistance du milieu de culture

Après des échanges avec les chercheurs et techniciens de l'INRAE Sophia Antipolis, nous avons remarqué que notre milieu de culture était trop compact et empêchait le développement des larves (cf. figure 7). Nous avons donc procédé à une modification de la recette de départ en faisant l'hypothèse que nos flocons de pomme de terre étaient trop absorbants et rendaient le milieu compact. Nous avons donc réduit de moitié la quantité de flocons de pomme de terre (ingrédient de texture). Le milieu obtenu était moins compact, mais les larves avaient encore des difficultés à se déplacer dans le milieu.



**Figure 11 : Milieu trop compact**



**Figure 12 : Milieu adéquat**

Afin de trouver la source du problème, nous avons envoyé des échantillons de nos ingrédients à l'INRAE Sophia Antipolis. Plusieurs expériences ont été menées en remplaçant chaque ingrédient de leur recette par les nôtres. Contrairement à ce que nous attendions, l'ingrédient problème n'était pas la pomme de terre mais la poudre de carotte. Effectivement, après avoir changé le fournisseur de cet ingrédient, nous avons enfin pu obtenir un milieu souple et humide, approprié au développement des larves (cf. figure 8).

Données concernant l'élevage :

Actuellement, nous avons une cage d'élevage qui contient un peu plus de 700 individus, ce qui représente entre 50 et 60% des effectifs recommandés pour une cage (d'après l'INRAE Sophia Antipolis). Depuis une semaine (du 17 au 21 février), la production d'œufs de ces individus augmente. Plus de 200 œufs ont pu être récoltés chaque jour. Le pic de production n'est pas encore atteint mais semble être plus important que pour la génération précédente. D'une génération à l'autre, la productivité des individus domestiqués augmente. Ces résultats sont prometteurs pour la suite de l'élevage de *C. capitata*.

Des améliorations doivent encore être faites pour diminuer la mortalité des œufs et des larves et donc augmenter le taux d'émergence entre le stade œuf et le stade adulte (cf. tableau 4). En moyenne, moins de 30% des œufs récoltés arrivent à se développer complètement jusqu'au stade adulte.

**Tableau 2 : Résumé des données moyennes d'élevage depuis la mise en place en décembre**

Nombre de génération domestiquée	3 générations (parentale, F1, F2)
Nombre moyen d'œuf pondu/jour	Environ 120 œufs
Taux d'émergence moyen entre le stade œuf et le stade pupa	30,7 %
Taux d'émergence moyen entre le stade pupa et le stade adulte	84,1 %
Taux d'émergence moyen entre le stade œuf et le stade adulte	27,2 %
Temps de développement moyen	24 jours

- **Prélèvements d'olives infestées par des larves de *B. oleae***

Entre fin octobre et début novembre, nous avons collecté des olives infestées par *B. oleae* (cf. figure 2) sur six sites de prélèvement en Corse avec plusieurs dates de récolte pour certains sites. Les olives ont été mis dans des boîtes d'émergence dans une pièce climatique pour favoriser le développement des insectes (température 22°C et 60% humidité relative).



**Figure 13 : Emergence d'une Bactrocera oleae d'une olive**

Chaque jour, les insectes émergents ont été collectés, triés et placés dans des tubes pour une future identification moléculaire (par l'INRAE Sophia Antipolis). *P. concolor* a été retrouvé sur tous les échantillons d'olives des six sites de prélèvement (cf. tableau 2). D'autres parasitoïdes de la mouche de l'olive ont été identifiés en quantité plus faible. Finalement, ces résultats d'émergence de *P. concolor* sur tous les sites de prélèvements nous confirment la présence de ce parasitoïde dans la nature. Ces sites serviront de réservoirs pour des futures collectes de *P. concolor* sauvages pour l'initiation de l'élevage du parasitoïde.

**Tableau 5 : Total du nombre d'insectes émergents des olives infestées par *Bactrocera oleae***

Localité	Nombre d'olives	<i>Bactrocera oleae</i>	<i>Psytalia concolor</i>	Autres parasitoïdes
Aleria	1255	173	18	1
Areflec	559	156	252	56
Alistro	820	322	433	21
Bonifacio	936	302	172	38
Fautea	1421	245	93	322
Lumio	3090	3401	230	181

Une grande partie des *P. concolor* collectées ont été utilisées pour l'identification moléculaire (confirmation à 99,8% que les individus sont des *P. concolor*). Les individus vivants restants de *P. concolor* ont été conservés dans une cage d'élevage pour initier un premier élevage du parasitoïde (en sachant tout de même que l'élevage de *C. capitata* n'était pas en forte productivité).

Quelques mots sur les principales étapes de l'élevage de *P. concolor*:

Les adultes sont placés dans une cage d'élevage contenant de l'eau et du miel (température 22°C et 60% d'humidité). Un pondoir, contenant des larves de *C. capitata* et imitant un faux fruit, est placé dans la cage. Les femelles *P. concolor* pondent leurs œufs directement dans les larves de *C. capitata* du pondoir. Ces larves parasitées sont ensuite déposées sur un contenant avec du milieu de culture, lui-même déposé dans un grand contenant avec du sable. Les larves parasitées se transforment en pupe dans le sable. Après quelques jours, les nouveaux adultes *P. concolor* émergent et un nouveau cycle de production peut commencer.



**Figure 14 : *Psyttalia concolor***

Avant de commencer un élevage du parasitoïde, il est primordial d'avoir en amont un élevage de l'hôte en forte production. La production de l'hôte doit combler les besoins pour le maintien de son élevage et les besoins pour le maintien de l'élevage du parasitoïde.

#### Problème rencontré : insuffisance de larves *C. capitata* pour débiter un élevage de *P. concolor*

Au vu du grand nombre de *P. concolor* émergents des olives collectées, nous avons fait le choix de conserver une partie de ces individus vivants pour commencer un premier élevage.

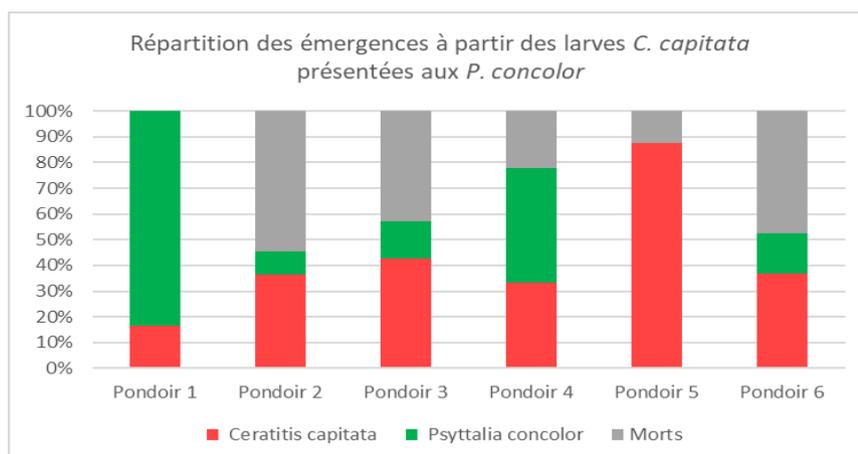
Une cage d'élevage avec en moyenne 70 individus a pu être mise en place entre fin novembre et début décembre. Un premier pondoir (pondoir 1) a pu être confectionné avec des larves récupérées sur des fruits piqués (cf. figure 10). Les résultats sont encourageants puisque sur les six larves présentées, cinq *P. concolor* ont émergé (cf. graphique 3 – pondoir 1).

Cependant, nous n'avons pas pu confectionner d'autres pondoirs en décembre puisque la production de larves de *C. capitata* en élevage était faible et que nous n'avions plus de fruits infestés. Par conséquent, nous avons abaissé la température d'élevage à 19°C afin de conserver ces individus jusqu'à ce que nous atteignions des fortes productions de larves de *C. capitata*.

Suite à cette baisse de température, la population de *P. concolor* a diminué de moitié. Les individus restants ont survécu pendant deux mois, ce qui nous a permis de réaliser cinq autres pondoirs (pondoirs 2 à 6) durant le mois de janvier. Les résultats sont représentés sur le graphique 3. Peu de *P. concolor* ont émergé des pondoirs mais ce résultat montre que des femelles *P. concolor* âgées de deux mois sont encore capables de pondre des œufs.



**Figure 15 : Pondoir dans la cage de *Psyttalia concolor***



**Figure 16 : Répartition des émergences pour différents pondoirs confectionnés**

Nous continuons à maintenir les individus restants de *P. concolor* dans une cage d'élevage. Lorsque nous obtiendrons un grand nombre de larves de *C. capitata*, nous confectionnerons d'autres pondoirs pour tenter de conserver cette souche. Cependant, au vu du faible nombre d'individus *P. concolor*, des collectes massives d'olives sont à prévoir à partir du mois d'août pour réellement démarrer un élevage.

❖ Lutte biologique par acclimatation

➤ Lutte contre la cochenille asiatique *Unaspis yanonensis*

Les objectifs en 2019 de cette action étaient :

- 1- Débuter l'élevage de plants d'Agrumes qui serviront de support à l'élevage des cochenilles asiatiques et des parasitoïdes
- 2- Réaliser le montage des serres d'élevage
- 3- Collecter les cochenilles asiatiques sur le terrain et initier l'élevage
- 4- Collecter les parasitoïdes et initier l'élevage de masse

En concertation avec les agents INRAe partenaires de cette action un calendrier des tâches à mettre en œuvre a été établi comme suit :

2018			2019											
Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Aou	Sep	Oct	Nov	Déc
Élevage des plants d'agrumes qui serviront de support aux cochenilles asiatiques														
Collecte matériel végétal infesté par la cochenille asiatique														
Mise en éclosoir pour s'assurer de l'absence d'ennemis naturels														
Infestation des plants sous serre pour initier l'élevage de masse de cochenilles														
Prospection sur les sites de lâcher de 2007-2008 pour la collecte de cochenilles parasitées par <i>Coccobius fulvus</i>														
Mise en éclosoir des cochenilles collectées sur les sites de lâchers de 2007-2008														

- Montage des serres d'élevage

La cochenille asiatique étant un ravageur redoutable, les plants servant au support des élevage devait être âgés d'au moins 2 ans pour survivre à l'infestation de cochenilles suffisamment longtemps pour la durée du cycle de production. Dès lors, l'élevage en pièce climatique était exclu et a ainsi été prévu en serre. Pour éviter toute fuite des organismes, des cages 'insectproof' ont été montées les unes dans les autres à l'intérieur d'une serre 'tunnel'. (Figure 17).



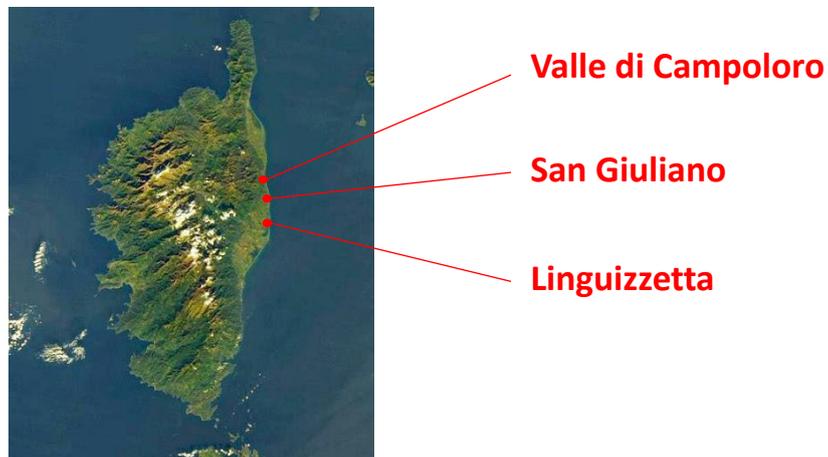
**Figure 17 – Photo des cages insectproof montées dans une serre tunnel pour l'élevage de la cochenille asiatique.**

- Support végétal d'élevage

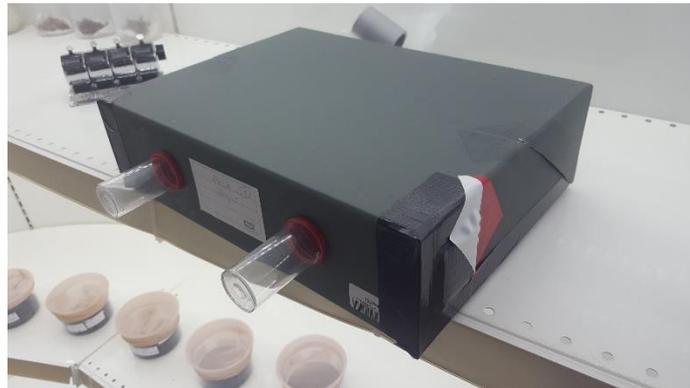
Les plants d'agrumes ont été prélevés et élevés dans la serre de production amplifiée de greffons de l'AREFLEC. Une quarantaine de porte-greffe de bigaradiers ont été mis à disposition et autant ont été semés dès 2018 en prévision des 2 années du projet.

- Collecte des cochenilles asiatiques

Du matériel végétal infesté de cochenilles asiatiques a été prélevé dans la plaine orientale sur 3 sites différents (Figure 18). Ce matériel végétal a été placé en éclosoir en pièce climatique à 25°C pendant 3 semaines pour s'assurer qu'aucun parasitoïde n'était présent dans les cochenilles collectées (Figure 19). Une vingtaine de parasitoïdes de l'espèce *Aphytis yanonensis* ont été collectés dans les cochenilles prélevées à Valle di Campoloro, ce matériel n'a donc pas été utilisé pour initier les élevages de cochenille (les parasitoïdes capturés sont probablement issus des lâchers d'auxiliaires produits par l'ARELFEC). Dans le but d'initier les élevages de masse du ravageur, le matériel végétal infesté par des cochenilles « saines » a ensuite été transféré dans les serres d'élevage sur 2 bigaradiers.



**Figure 18 – Sites des prélèvements de cochenilles asiatiques illustrés sur la photo satellite de la Corse**



**Figure 19 – Photo des dispositifs d'éclosoir pour identifier la présence d'ennemis naturels de la cochenille asiatique. Les prélèvements sont placés à l'obscurité dans la boîte tandis que les ennemis naturels sont attirés dans les tubes par la lumière.**

- Collecte de *Coccobius fulvus* en Corse

En 2007 et 2008, la FREDON Corse, en collaboration avec L'INRA de Sophia-Antipolis avait réalisé des lâchers de *Coccobius fulvus* sur la place diamant à Ajaccio et dans la commune de Talasani. Aucun *Coccobius fulvus* n'avait néanmoins été retrouvé après 2008 lors des prospections réalisées par l'AREFLEC. Les prospections réalisées en 2019 ont été concomitantes avec la collecte de cochenilles asiatiques. Une contrainte importante est rapidement apparue. Suite à l'infestation dans les années 2000, tous les agrumes présents à Talasani ont été détruits et seulement 3 ont été conservés sur le site d'Ajaccio aussi bien qu'aucune cochenille parasitée par *Coccobius fulvus* n'a pu être prélevée.

- Collecte de *Coccobius fulvus* dans les Alpes-Maritimes

L'absence de *Coccobius fulvus* en Corse avait été anticipé, il était prévu de réaliser des collectes de *Coccobius fulvus* dans les Alpes-Maritimes (aire de collecte des précédents lâchers de 2007-2008) mais une problématique réglementaire est survenue. En 2012, la réglementation sur les macro-organismes utilisés en lutte biologique a évolué aussi bien qu'il n'est plus possible d'introduire d'organismes exotiques sans autorisation des autorités (ANSES, Ministères chargés de l'agriculture et de l'environnement). Les organismes lâchers avant cette date en étant dispensés il n'étant pas prévu de soumettre une nouvelle demande d'autorisation. Or, des analyses moléculaires récentes ont montré que la population de *Coccobius sp* prélevée dans les Alpes-Maritimes en 2007 appartenait probablement à l'espèce *Coccobius testaceus* et non pas à l'espèce *Coccobius fulvus*. Il n'est donc plus possible d'introduire cet organisme en Corse depuis le continent sans effectuer cette demande d'autorisation qui prend au minimum 12 mois.

- Perspectives 2020

Face à l'absence de *Coccobius fulvus* en Corse et l'impossibilité d'en introduire depuis le continent pour l'instant, la stratégie pour cette action doit être revue. Pour 2020, deux axes de travail ont été décidé avec le partenaire INRAe lors du comité de pilotage :

- Retrouver le parasitoïde en Corse faciliterait grandement le déroulement de cette action en évitant les procédures administratives pour la réintroduction depuis le continent. Ainsi, la première stratégie est d'augmenter l'effort d'échantillonnage en Corse pour maximiser les chances de retrouver *Coccobius fulvus* s'il est bien présent en Corse. Cette tâche sera dévolue au CDD recruté 6 mois dans le cadre du projet.
- S'il s'agit bien eu erreur d'identification en 2007, faire la preuve de la similarité entre les individus lâchers et les populations présentes dans les Alpes-Maritimes actuellement pourrait

éviter les procédures administratives pour la réintroduction. Les agents INRAe vont donc réaliser des échantillonnages dans les Alpes-Maritimes et comparer les données moléculaires avec une nouvelle analyse morphologique avec le même expert mandaté en 2007.

### Axe I – Méthodes de lutte - Partie 2 – Médiateurs chimiques

#### ➤ Lutte contre la fourmi *Tapinoma magnum*

L'activité de l'AREFLEC a principalement consisté en du conseil auprès de l'université de Corte pour la collecte des fourmis sur le terrain et leur manipulation en laboratoire. L'avancement de la mise au point des produits de synthèses basés sur les extraits phéromonaux n'a pour l'instant pas permis de produire des substances à évaluer par l'AREFLEC.

#### ➤ Lutte contre la mineuse des agrumes, *Phyllocnistis citrella*.

En concertation avec le Laboratoire de chimie des produits naturel de l'UCPP, il a été décidé que l'AREFLEC se chargera des collectes de mineuses, de leur sexage et de l'extraction des phéromones avant envoi à l'Université de Corte pour analyse.

La principale difficulté rencontrée à l'AREFLEC a été de déterminer le sexe des individus collectés sans les tuer. En effet la bibliographie fait état d'un dimorphisme sexuel chez l'adulte mais qui s'avère compliqué à observer chez des individus vivants et mobiles. De plus, les pupes étant enroulés dans le rebord des feuilles avant l'émergence des adultes (Figure 20), il est difficile de les isoler, sans les blesser, afin d'obtenir les individus vierges nécessaires pour l'extraction de phéromones. Puisqu'il existe également un dimorphisme entre mâles et femelles au dernier stade des pupes il a été décidé d'extraire ces dernières des feuilles, juste avant l'émergence des adultes et de les sexer. Devant l'important taux de mortalité des pupes extraites des feuilles enroulées, il a fallu mettre au point une méthode de conservation des pupes pour maximiser leur probabilité de survie et d'émergence des adultes. Trois méthodes (Figures 21 & 22) ont été comparées et une a été retenue après optimisation (Tableau 6).



Figure 20 – Photo d'une feuille d'agrumes infestée par la mineuse. On peut observer l'enroulement caractéristique du rebord des feuilles.

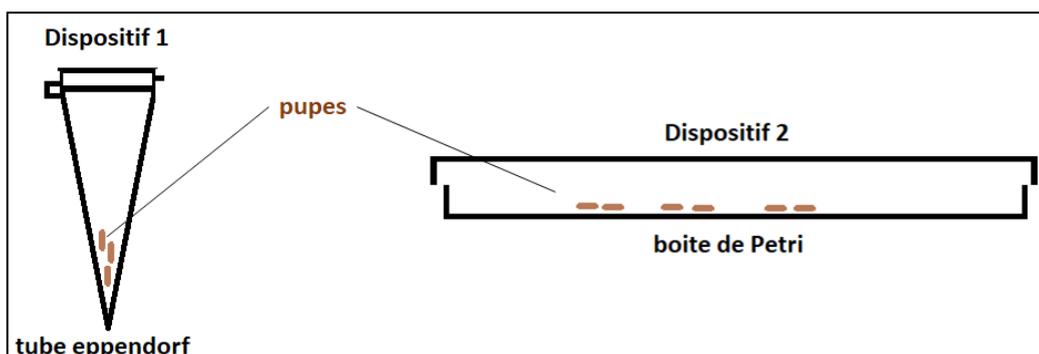


Figure 21 – Schéma des dispositifs 1 & 2 (non retenus) de maintien des pupes de mineuses avant émergence.

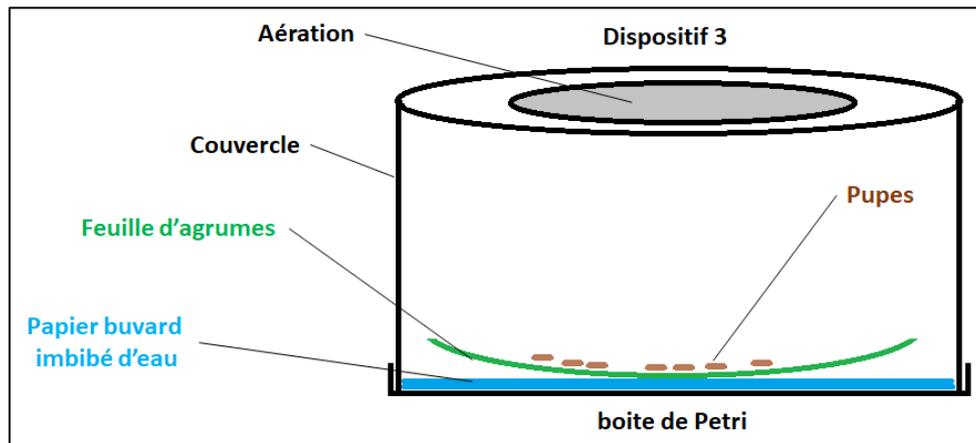


Figure 22 – Schéma du dispositif (retenu après optimisation) de maintien des pupes de mineuse non retenus avant émergence.

Tableau 6 – Efficacité des dispositifs de maintien des pupes avant émergence de l'adulte

Dispositif	Nombre de pupes	Adultes	% émergence	Commentaires
Tube eppendorf	200	12	6%	Dessication rapide et mort des pupes. Les seuls émergents étaient les individus ayant presque terminé leur développement au moment de l'installation dans le dispositif
Boite de Petri	150	6	4%	Dessication rapide encore plus importante que dans les tubes eppendorf.
Boite de Petri avec couvercle	50	26	52%	Avec installation d'un papier buvard, l'humidité reste suffisante pour permettre le développement des pupes. Néanmoins, si les pupes sont en contact avec le papier imbibé, il y a risque de noyade et de développement de moisissures. L'aération du couvercle est nécessaire pour éviter la condensation qui peut coller et tuer les adultes.

Une fois les adultes émergés, les males et les femelles ont été placés dans l'hexane. Cette solution est couramment utilisée pour la fixation des molécules phéromonales mais s'évapore facilement c'est pourquoi les macérats ont été conservés dans des tubes en verre fermés par des bouchons hermétiques.

Compte tenu de la phase de mise au point, à peine une centaine d'individus a pu être placée en hexane et envoyés à l'Université de Corte. Dans la bibliographie, le nombre d'insectes utilisés pour ce genre d'analyse varie entre plusieurs milliers à plusieurs dizaines de milliers. À présent que la méthode d'extraction et de sexage des mineuses est au point, il convient de répéter l'opération en 2020 pour fournir des solutions phéromonales issues d'une quantité d'individus bien supérieure.

## Axe II – Biostimulants et biocides

Plusieurs substances ont été produites par l'InterBio et analysées par l'UCPP. Néanmoins, compte-tenu de l'absence d'élevage encore pérennes et du manque de coordination entre les différents partenaires aucune évaluation en laboratoire n'a été réalisée par l'AREFLEC. Il s'agit clairement d'une thématique du projet sur laquelle une attention particulière va devoir être portée en 2020 et 2021 pour atteindre les objectifs du projet.

#### **IV. Conclusions et perspectives pour 2020**

Il a été convenu lors du comité de pilotage que le travail sur les thématiques 'Médiateurs chimiques' et 'Biocides et biostimulants' avait été mal évalué et la coordination entre l'AREFLEC, l'UCPP, et l'InterBio, sous-optimale. Compte tenu des avancées régulières (non sans difficultés néanmoins) sur la thématique 'Lutte biologique' une attention particulière sera donc portée sur les deux autres thématiques en 2020 pour atteindre les attendus du projet en 2021.