

DESCRIPTION

Utilisation du composé chimique alpha-zingiberene comme agent répulsif et insecticide dans les cultures de tomates.

Domaine technique

La présente invention concerne une méthode pour repousser Tuta Absoluta et d'autres insectes nuisibles aux plants de tomates à l'aide du composé chimique alpha-zingiberene et d'huiles essentielles contenant les huiles essentielles. La présente invention concerne un procédé pour repousser Tuta Absoluta et d'autres insectes nuisibles aux plants de tomates à l'aide du composé chimique alpha-zingibérène et des huiles essentielles qui le contiennent. L'alpha-zingibérène est applicable à la protection des plants de tomates contre les insectes.

État de l'art

Le principal problème technique abordé par cette invention est qu'il n'existe actuellement aucune solution définitive pour la lutte contre les insectes de la famille des Tuta sur les cultures de tomates.

Des stratégies de "lutte intégrée contre les ravageurs" ont été mises au point, combinant l'utilisation de phéromones synthétiques pour la détection précoce et la surveillance des populations. Cependant, ces phéromones ont parfois un effet d'appel qui peut être très négatif pour la culture.

D'autre part, l'utilisation d'"organismes de contrôle biologique" (micro-organismes, champignons, insectes parasites et prédateurs) peut être très négative pour la culture. L'utilisation d'organismes de contrôle biologique (micro-organismes, champignons, insectes parasites et prédateurs) est actuellement en phase d'essai et il n'existe pas de solution commerciale.

Quant aux traitements avec des produits phytopharmaceutiques chimiques de contact et systémiques autorisés, ils posent parfois un problème en raison de l'adaptation rapide du ravageur.

Études génétiques sur la résistance de la tomate à différents insectes

Comme information pertinente pour l'argumentation de ce rapport, il est important de souligner certaines études sur l'amélioration génétique de la tomate pour obtenir une résistance variétale à Tuta Absoluta, réalisées par Giustolin et Vendramin et de Azevedo S.M., où l'utilisation de variétés de tomates résistantes à l'insecte est considérée comme une alternative pour la gestion et le contrôle de Tuta Absoluta (Giustolin et Vendramim 1994, Leite et al. 1995, Picanço et al 1995).

En conséquence, l'étude a montré que la tomate sauvage *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* (PI 134417) a montré une résistance à ce papillon (Giustolin et Vendramim 1994, Leite et al. 1995).

Cette résistance de *Lycopersicon hirsutum* à Tuta Absoluta a été attribuée à la présence des allèles chimiques trideca-2-none (2-TD) et undeca-2-none (2-UD) présents dans les exsudats produits par les trichomes glandulaires des feuilles (Giustolin et Vendramim 1994). Une autre variété de tomate résistante est *Lycopersicon hirsutum* var *hirsutum* (PI 127826) pour laquelle des études ont été développées qui reconnaissent sa résistance à Tuta Absoluta grâce à l'action du Zingiberene, un sesquiterpène présent dans ses trichomes glandulaires présents dans toutes les espèces de tomates à des concentrations différentes (étude d'Azevedo S.M. Et al).

D'autres études ont conclu que, dans la nature, certaines autres espèces de tomates sauvages telles que *S. habrochaites* var. *typicum* portent des allèles qui conditionnent des teneurs élevées en zingibérène (Rahimi et Cárter. 1993). Cet allèle chimique se trouve principalement dans les trichomes de type IV et VI (Campos. 1999) ; il confère une résistance à *Leptinotarsa decemlineata* (Gianfagna, Cárter et Sacalis, 1992), *Spodoptera exigua* (Eigenbrode et Trumble, 1993), *Tetranychus urticae* (Guo, Weston et Zinder, 1993), *T. evansi* (Campos, 1999), *Tuta Absoluta* (Azevedo et al, 1999) et *Bemisia* sp. (Freitas et al, 1999).

En outre, il est important de noter que l'alpha-zingibérène est impliqué dans les mécanismes de résistance de la tomate à différents insectes tels que : Bemisia Tabaci (Joelson A. Freitas et al.).

Leptinotarsa decemlineata (doryphore)
Tetranychus urticae (araignée rouge)
Tetranychus evansi
Neoleucinodes elegantalis
Spodoptera exigua (Noctuelle exigüe)

Informations sur l'alpha-zingibérène

L'alpha-zingibérène est un sesquiterpène monocyclique composé de trois unités d'isoprène dont la formule moléculaire est C₁₅H₂₄. C'est le composant prédominant de l'huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*), dont il tire son nom, on le trouve également dans d'autres espèces végétales des Zingiberaceae, Asteraceae, Umbelliferae et on le trouve aussi dans les trichomes glandulaires des Solanaceae, un point important pour l'argumentation scientifico-technique de la présente invention.

Cet hydrocarbure peut être purifié jusqu'à 99% par des méthodes chimiques décrites par Jocelyn G. Millar, Dept. of Entomology, Riverside University, 1998. Mais les huiles essentielles de gingembre, de curcuma et de cardamome contiennent un pourcentage élevé de ce composé, qui se situe entre 5 et 30 % en volume selon l'origine, ce qui rend possible l'utilisation de ces huiles dans les applications.

Une recherche d'informations sur le statut de l'Alpha-Zingiberene a été effectuée dans l'EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) et nous avons vérifié que dans le catalogue "Product Information", cette substance n'est pas classée dans l'annexe I de la directive 67/548/CEE en tant que telle mais peut être incluse dans l'une des entrées de groupe.

En ce qui concerne les "Informations sur la classification et l'étiquetage", cette substance n'est pas classée dans l'annexe I de la directive 67/548/CEE en tant que telle, mais peut être incluse dans l'une des entrées de groupe.

En ce qui concerne les "Informations sur l'exportation et l'importation de produits chimiques dangereux" (règlement (CE) n° 689/2008), cette substance n'est pas répertoriée à l'annexe I du règlement (CE) n° 689/2008, comme indiqué ci-dessus.

En ce qui concerne son volume de production élevé ou faible, cette substance n'a pas été déclarée par l'industrie de l'UE en tant que HPVC ou LPVC. De même, aucune information n'est disponible dans les bases de données IUCLID et OCDE.

L'alpha-zingibérène est une substance volatile très répandue dans le règne végétal et peut donc être trouvée dans divers types d'huiles essentielles de plantes, l'huile essentielle de gingembre étant l'une des plus fortes concentrations d'alpha-zingibérène dans la nature. Nous ferons une mention spéciale et pertinente à la famille et à l'huile essentielle de gingembre.

Informations sur les Zingiberaceae et leurs huiles essentielles

Zingiberaceae est le nom d'un taxon végétal appartenant à la catégorie taxonomique de la famille, utilisée dans les systèmes de classification modernes tels que le système de classification APG II de 2003[1] et l'APW[2], qui le placent dans l'ordre des Zingiberales des monocotylédones. Il existe plus d'un millier d'espèces réparties en 50 genres. De nombreuses espèces de Zingiberaceae ont une valeur ethnobotanique, soit comme épices (dont le gingembre, *Zingiber officinale*, le curcuma, *Curcuma longa* et la cardamome. *Elettaria cardamomum*), soit comme plantes ornementales (comme *Alpinia* et *Hedychium*).

En raison de la taille de la famille botanique, il serait fastidieux de mentionner les utilisations et les applications des différentes huiles essentielles. Nous nous contenterons donc de mentionner l'huile essentielle de gingembre, dont la concentration en zingibérène est comprise entre 20 et 30 %. Cette huile est traditionnellement utilisée dans l'alimentation (conserves, épices, confitures, boulangerie et confiserie), dans les boissons (boissons gazeuses (ginger ale), bières (ginger beer) et liqueurs), dans la parfumerie et dans la médecine (en tant qu'intrants pour les produits pharmaceutiques).

Cependant, il n'existe pas d'usage reconnu par la coutume d'une population, l'industrie agricole ou la recherche qui puisse revendiquer ce qui est envisagé, exposé et revendiqué dans ce mémoire.

La composition de l'huile essentielle de gingembre peut varier légèrement en fonction du lot d'huile essentielle, pour cette raison et afin d'obtenir la plus grande précision dans les résultats des expériences réalisées, des volumes d'huiles appartenant au même lot ont toujours été utilisés. Le composant chimique d'intérêt pour notre invention est l'Alpha-Zingiberène. L'huile essentielle de gingembre utilisée dans les essais a été acquise auprès de l'entreprise Laboratoris Dicana S.L. bien qu'elle puisse être facilement acquise sur le marché par le biais d'autres entreprises.

Description détaillée de l'invention

L'application exogène d'alpha zingibérène sous sa forme pure ou isolée, ainsi que sous sa forme naturelle, avec des huiles essentielles contenant cette molécule à des concentrations appropriées, s'est révélée être un répulsif et un insecticide contre Tuta Absoluta et d'autres insectes.

Il a été démontré que l'application exogène d'alpha-zingibérène diminuait de manière significative l'activité alimentaire de Tuta Absoluta et augmentait la mortalité des larves. On peut donc dire que l'alpha-zingibérène est un répulsif et un insecticide en soi ou en complément d'autres substances.

Cette molécule organique biologiquement active est présente dans différentes espèces végétales et les huiles essentielles sont le moyen le plus accessible, le moins cher et le plus rapide de l'obtenir à des concentrations élevées.

Surtout s'il s'agit d'huiles essentielles de la famille des zingibéracées, et plus particulièrement de l'huile essentielle de gingembre, dont le chénotype du principe actif est la molécule d'alpha-zingibérène.

Par conséquent, l'alpha-zingibérène purifié et l'huile essentielle de gingembre, en raison de leur richesse en cette molécule organique, constituent un moyen efficace de lutte contre les insectes de la tomate et plus particulièrement contre Tuta Absoluta.

La description de l'invention montre que Tuta Absoluta diminue son activité de reproduction et sa capacité d'alimentation, augmentant ainsi sa mortalité et même sa disparition de l'environnement où l'application d'alpha-zingibérène est effectuée.

Description de la méthode de mise en œuvre de l'invention

L'application exogène d'alpha zingibérène s'est avérée avoir un fort pouvoir répulsif et insecticide contre Tuta Absoluta et d'autres insectes. Il a été démontré que Tuta Absoluta réduit son activité de reproduction et sa capacité d'alimentation, augmentant ainsi sa mortalité et même sa disparition de l'environnement où l'alpha-zingibérène est appliqué.

À cette fin, différents essais biologiques ont été réalisés pour déterminer l'antixénose et la toxicité sur Tuta Absoluta, ainsi que des essais sur le terrain. Comme il s'agit d'un composé organique d'origine naturelle présent dans les plants de tomates, il évite les problèmes de résistance acquise par le vecteur.

L'application exogène de cette molécule, soit pure, soit sous forme de composé d'une huile essentielle, est relativement facile à mettre en œuvre comme pour tout produit phytopharmaceutique.

Essai biologique pour la détermination de l'antixénose

Développement d'un essai biologique pour déterminer la préférence en matière d'alimentation et d'oviposition dans un test de libre choix.

Le test a été réalisé à l'aide de 4 cages en bois de 1 x 1 x 1 m recouvertes d'un filet anti-trips, dans chacune desquelles ont été introduits 4 plants de tomate du même génotype sensible à Tuta Absoluta, un plant témoin (sans traitement) et 2 plants avec un traitement d'Alfa-Zingibérène pur à différentes concentrations et un quatrième plant avec un traitement d'huile essentielle de gingembre, les traitements ont été réalisés deux heures avant l'introduction des plants dans les cages (voir Tableau 3).

Tableau 3

Plante	Concentration de Zingibérène
1	0,00%
2	0,10%
3	0,20%
4	Huile essentielle de gingembre 0,30%

Trois feuilles par plante ont été choisies, numérotées par ordre décroissant à partir de la première feuille ouverte (bourgeon), car ce sont les feuilles les plus préférées par Tuta absoluta pour la ponte (Arias, 1995).

À l'intérieur des cages, les plantes ont été placées à hauteur égale et réparties en cercle pour donner à chaque plante une chance égale d'être cueillie.

L'infestation des plantes par cage a été réalisée avec 100 adultes de Tuta Absoluta, capturés au hasard avec un aspirateur à l'aide de pièges lumineux à partir de populations établies dans les cultures de tomates de la région.

Les insectes ont été relâchés au centre de la cage sur un plateau en plastique noir, afin qu'ils puissent choisir l'endroit où se percher et pondre sur chacune des plantes.

Les variables évaluées sont

1) Nombre d'insectes perchés sur la plante 48 et 96 heures après l'infestation.

2) Le nombre d'œufs oviposés sur chaque plante après l'élimination des insectes à 96 heures. Le comptage des insectes perchés sur chaque génotype a été effectué visuellement le matin. La quantification du nombre d'œufs pondus sur la face inférieure des feuilles de chaque plante a été effectuée sous un stéréoscope et à l'aide d'un compteur, en retirant les feuilles dans l'ordre numérique de haut en bas.

Pour comparer les plantes en termes de préférence alimentaire et de ponte totale, une analyse de variance a été réalisée en transformant logarithmiquement les valeurs et en les augmentant d'une unité ($\log(x+1)$), afin de réduire la variabilité à l'intérieur des plantes et entre les plantes. Lorsque la valeur F était significative, les moyennes ont été séparées à l'aide du test de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGW).

Pour l'analyse des variables relatives à l'alimentation et à la ponte, une transformation logarithmique ($x+1$) a été utilisée, suivie d'un test d'intervalle multiple REGW, révélant qu'il existe une différence statistique significative pour l'alimentation ($P < 0,0001$) et pour la ponte ($P < 0,0006$).

Résultats

La différence statistique dans la préférence alimentaire se maintient sur les trois essais. Les plantes n'interagissent pas avec l'essai, les feuilles, ni avec le moment de l'évaluation, la plante NON TRAITÉE étant celle qui a une plus grande préférence pour l'insecte à nourrir, par rapport aux autres plantes, qui ne présentent pas de différences statistiques entre elles. Le modèle d'analyse pour l'alimentation a montré une interaction entre la préférence pour l'insecte et l'alimentation.

Le modèle d'analyse de l'alimentation a montré une interaction entre le temps d'essai et la feuille, qui peut être résumée comme suit : la première feuille (bourgeon) est celle qui est préférée par l'insecte pour s'alimenter et cette activité n'a pas changé entre 48 et 96 heures. Les deuxième et troisième feuilles, avec un niveau de préférence plus faible, ont montré une différence entre les deux temps d'évaluation (48 et 96 heures), ce qui indique que les insectes circulent entre les feuilles, à la recherche d'un endroit pour se nourrir.

Le modèle d'analyse de l'oviposition a montré une interaction entre l'essai et la plante. La préférence pour la ponte est différente dans les trois essais. Elle change en fonction de la position des feuilles et des plantes.

La plante 4 a montré la préférence la plus faible pour la ponte, par rapport au témoin non traité, qui a montré la préférence la plus élevée. Les autres plantes 2 et 3 ont eu un comportement similaire à celui de la plante 4.

Les insectes adultes utilisés dans le processus d'infestation provenaient d'une colonie établie dans une culture de tomates sensibles depuis plusieurs générations. La plante non traitée ou sensible avec un taux de ponte moyen de 120 œufs a été préférée par *Tuta absoluta* pour la ponte, tandis que la plante 4 avec une moyenne de 5 œufs a été moins préférée pour cette activité.

En général, la ponte la plus élevée a été observée sur les plantes où la présence de l'insecte était la plus forte, c'est-à-dire que le nombre d'œufs pondus est le reflet du nombre d'insectes perchés sur chacune d'elles.

Test de toxicité du zingibérène sur les œufs et les larves de *Tuta absoluta*

Suivant le protocole déterminé par De Souza, Viana-Bailez et Blackmer (2002), nous avons évalué la toxicité de l'alpha-zingibérène sur les œufs et les larves néonates de *Tuta Absoluta*. Pour ce faire, nous avons effectué un test en quatre exemplaires avec trois concentrations différentes d'alpha-zingibérène sous sa forme naturelle par application d'huile essentielle de gingembre.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 4).

Oeufs	
Solution	Mortalité
0,10%	15%
0,20%	18%
0,50%	21,5%
Larves néonates	
Solution	Mortalité
0,10%	23,00%
0,20%	40,00%
0,50%	60,50%

Essais expérimentaux sur le terrain

L'essai a été réalisé dans une serre avec deux modules attachés de 2000 m chacun avec un total de 4000 plants de tomates respectivement dans chaque module. La méthode de culture était conventionnelle et les mêmes techniques de culture (fertilisation, traitements phytosanitaires conventionnels et gestion) ont été appliquées aux deux modules. L'infestation était naturelle.

Dans le module "A", les traitements à l'Alfa-Zingibérène ont été appliqués et le module "B" était le module de contrôle où aucun traitement à l'Alfa-Zingibérène n'a été appliqué. Toutes les cultures de tomates environnantes ont été attaquées par Tuta Absoluta et ont subi d'importants dégâts à cette époque.

Quatre pièges à phéromones ont été placés dans chaque module pour détecter les individus adultes de Tuta Absoluta.

Dans le module "A", les traitements ont commencé dès qu'environ 15 individus ont été capturés dans les pièges.

Le comptage des individus piégés et l'observation des dommages causés aux plantes ont été effectués tous les 7 jours, les pièges à phéromones ont été remplacés par de nouveaux à chaque comptage dans les deux modules afin de voir l'évolution de la population de Tuta absoluta.

Dans le module "A", un total de 4 traitements à l'alpha-zingibérène ont été effectués pendant la saison de croissance à une concentration de 0,20%.

Dans le module "B", aucun traitement à l'alpha-zingibérène n'a été effectué.

Dans les résultats du module "B" utilisé comme contrôle, l'infestation a commencé 14 jours après la transplantation avec une moyenne de 3 individus capturés dans les pièges à phéromones.

Le nombre d'individus capturés a augmenté progressivement à chaque comptage. A 40 jours, le nombre moyen d'individus capturés était de 26, à 80 jours la moyenne était de 65 individus et les dommages aux fruits sont devenus évidents, les dommages à la plante ont commencé à devenir critiques, perte de bourgeons et perte de mésophylle de la feuille avec une grande diminution de la production.

La production a fortement diminué. Le nombre moyen de captures après 120 jours était de 85 individus et les dommages à la culture étaient énormes, presque une perte totale de la culture.

Dans les résultats du module "A" utilisé pour le traitement, l'infestation a commencé 14 jours après la transplantation au même moment que dans le module B avec une moyenne de 4 individus capturés dans les pièges à phéromones.

Après 28 jours, le nombre moyen de captures était de 16 individus et les dégâts commençaient à devenir visibles, c'est pourquoi des traitements à l'alpha-zingibérène ont été entrepris et répétés tous les 15 jours.

Après 35 jours, le nombre moyen de captures est tombé à 6 individus, après 42 jours le nombre moyen de captures est tombé à 1 individu et les captures suivantes sont devenues anecdotiques et l'infestation du module "A" a complètement disparu.

Les dégâts sur la plante et les fruits sont nettement moins importants que dans le module "B".

Application industrielle de l'invention

Application dans la production agricole. En particulier dans les cultures de tomates en tant que produit de lutte contre Tuta Absoluta et d'autres insectes.

Conclusions

L'alpha-zingibérène est un séquestrépène, un composant majeur des volatiles des Zingibéracées et le plus important dans l'huile essentielle de gingembre. Des études sur la sélection des tomates montrent que ce séquestrépène existe également dans les espèces de tomates sauvages et qu'il est le composé chimique responsable de la résistance à Tuta absoluta dans le germoplasme de tomate. Les essais décrits dans le présent document ont démontré que l'application exogène de ce composé sur les plants de tomates est efficace pour lutter contre Tuta Absoluta.

L'application d'Alfa-Zingiberene a les effets suivants contre Tuta Absoluta lorsqu'il est appliqué de manière exogène à des plants de tomates sensibles à cet insecte :

- Provoque un effet non-préférence (non-hôte) sur les plants de tomates traités.
- Réduit de manière significative la ponte des adultes de Tuta absoluta sur les plants de tomates.
- Les larves réduisent leur activité alimentaire sur les plants de tomates traités, entraînant un pourcentage de mortalité.
- Alfa-Zingiberene provoque la mortalité des œufs et des larves néonates dans des pourcentages qui dépendent des doses appliquées.

(Je zappe toutes la partie « revendications » qui ne concerne que les aspects « protection de la propriété intellectuelle » par le brevet.)