ACADEMIA

Accelerating the world's research

Potentiel d'une souche indigène du champignon entomopathogène Beauveria bassiana comme agent de lutte biologique contre le charançon rouge du palmier, Rhynchophorus ferrugineus

Traduit de : Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as a biological control agent against the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus

Oscar Dembilio

Besoin de citer ce document ?

Obtenez la citation dans les styles MLA, APA ou Chicago

Tu veux plus de papiers comme ça ?

Télécharger un pack PDF de documents connexes

Rechercher dans le catalogue de 40 millions d'articles gratuits d'Academia

translated with Academia.edu

Potentiel d'une souche indigène du champignon entomopathogène Beauveria bassiana comme agent de lutte biologique contre le charançon rouge du palmier, Rhynchophorus ferrugineus

Oscar Dembilio

Journal of Invertebrate Pathology

Original Paper

Résumé

Le potentiel d'une souche de Beauveria bassiana (Ascomycota : Clavicipitaceae) obtenue à partir d'une pupe de Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera : Curculionidae) naturellement infectée comme agent de lutte biologique contre ce charançon a été évalué à la fois en laboratoire et en semi-terrain. Les résultats de laboratoire indiquent que cette souche de B. bassiana peut infecter les œufs, les larves et les adultes de R. ferrugineus (LC 50 de 6,3 × 10 7 à 3,0 × 10 9 conidies par ml). Cependant, la mortalité n'était pas le seul indicateur de l'efficacité du traitement car les adultes des deux sexes inoculés avec le champignon transmettaient efficacement la maladie aux adultes non traités du sexe opposé, avec des taux de transmission homme-femme et femme-homme de 55 %. et 60 %, respectivement. De plus, le traitement avec B. bassiana a considérablement réduit la fécondité (jusqu'à 62,6 %) et l'éclosion des œufs (32,8 %) dans les combinaisons d'appariement avec des mâles, des femelles ou les deux sexes infestés de champignons. De même, une augmentation de 30 à 35% de la mortalité larvaire a été observée chez les larves obtenues à partir d'œufs de femelles attaquées par des champignons ou de femelles non traitées couplées à des mâles

inoculés, entraînant une réduction globale de 78% de la progéniture. Des essais préventifs semi-terrain sur des palmiers Phoenix canariensis âgés de 5 ans en pot, avec des efficacités allant jusqu'à 85,7%, ont confirmé le potentiel de cette souche comme agent de lutte biologique contre R. ferrugineus.

Introduction

Le charançon rouge envahissant du palmier, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae), est devenu le principal ravageur des palmiers dans le bassin méditerranéen, où il s'est propagé lentement au milieu des années 1990 et très rapidement au cours des cinq dernières années. Ce ravageur est actuellement largement réparti en Océanie, en Asie, en Afrique et en Europe (OEPP, 2008) et a été trouvé à Curaçao, Antilles néerlandaises, en décembre 2008 (OEPP, 2009. Les femelles pondent leurs œufs à la base des frondes dans des trous séparés faits avec leur rostre. Les larves nouveau-nées pénètrent dans le noyau du palmier et, à la fin du développement, retournent à la base des frondes pour se nymphoser. Une nouvelle génération émerge et les adultes peuvent rester dans le même hôte et se reproduire jusqu'à ce que le palmier meure. Par la suite, les adultes vers de nouveaux hôtes. R. ferrugineus a été signalé sur 19 espèces de palmiers appartenant à 15 genres différents (OEPP, 2008; Dembilio et al., 2009). Plusieurs méthodes de lutte ont été appliquées contre ce ravageur dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée. les principales composantes sont la phyto-assainissement, qui implique l'abattage et le brûlage des palmiers infestés, l'utilisation d'insecticides et l'utilisation de pièges à phéromones pour la surveillance des adultes et le piégeage de masse (Murphy et Briscoe, 1999; Faleiro, 2006).

Peu d'études ont été menées sur les ennemis naturels de R. ferrugineus ou d'autres espèces de Rhynchophorus (Murphy et Briscoe, 1999; Faleiro, 2006). Steinernema carpocapsae (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae) s'est avéré efficace contre R. ferrugineus dans des essais en semi-terrain et sur le terrain comprenant des essais préventifs et curatifs (Lácer et al., 2009; Dembilio et al., 2010). Différentes souches de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sokorin (Ascomycota: Clavicipitaceae) et Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Clavicipitaceae) ont été testées contre R. ferrugineus (Gindin et al., 2006). Le premier s'est avéré plus virulent que B. bassiana et a atteint 100% de mortalité larvaire en 6-7 jours. Cependant, aucune des souches testées n'a été obtenue à l'origine à partir de spécimens malades de R. ferrugineus. En 2005-2006, El-Sufty et al. (2009) ont obtenu une mortalité de 12,8 à 47,1% dans la population adulte de R. ferrugineus lors d'essais sur le terrain utilisant une souche de B. bassiana isolée aux Émirats arabes unis. Plus récemment, Sewify et al. (2009) ont réussi à réduire l'incidence de R. ferrugineus dans des conditions de terrain en Egypte en utilisant une souche native de B. bassiana isolée d'un cadavre de R. ferrugineus.

En 2007, des pupes de R. ferrugineus présumées infectées par des champignons

entomopathogènes ont été collectées dans une palmeraie datter en Espagne près de la ville de Catral (lat. : 38°09 0 29 00 N ; long. : 00°46 0 33 00 W ; alt. : 12 m). L une de ces pupes s est révélée infectée par le champignon entomopathogène B. bassiana. Cette espèce est l un des champignons entomopathogènes les plus répandus au monde et infecte les insectes des zones tropicales, tempérées, humides et désertiques (Zimmermann, 2007), dont certains d'importance agricole, comme le foreur des baies de caféier Hypothenemus hampei Ferrari (De la Rosa et al., 1997) et d'autres Curculionidae (Adane et al., 1996). Dans ces études, les adultes étaient le stade le plus approprié ou le seul possible pour le traitement. Contrairement à d'autres insectes pathogènes, les champignons entomopathogènes infectent l hôte par contact, pénétrant la cuticule de l'insecte. L hôte peut être infecté à la fois par traitement direct et par transmission horizontale d'insectes ou de cadavres infectés à des insectes non traités ou à des stades de développement ultérieurs via la nouvelle génération de spores (Lacey et al., 1999 ; Quesada-Moraga et al., 2004). La transmission mécanique passive des champignons au sein des populations d'insectes a été observée pour divers champignons entomopathogènes, par ex. B. bassiana, M. anisopliae et Isaria fumosorosea (Lacey et al., 1999 ; Quesada-Moraga et al., 2004, 2008. Ces caractères uniques rendent les champignons entomopathogènes particulièrement importants pour le contrôle des insectes cachés. Dans le cas de R. ferrugineus, la majeure partie de son cycle de vie se déroule dans le palmier, ce qui rend le ravageur inaccessible aux traitements par contact direct. Les adultes sont le seul stade exposé et peuvent être infectés dès l émergence. Les preuves d une application réussie de champignons via les adultes ont été obtenues à partir d expériences sur le sténopé foreur, Platypus spp. (Coleoptera : Curculionidae) Les adultes contaminés par les spores de B. bassiana ou de M. anisopliae ont transmis l'infection fongique aux larves, ce qui a entraîné une mortalité larvaire de 50 à 100 % (Glare et al., 2002).

Le but de ce travail était d évaluer en laboratoire les effets létaux et sublétaux d une souche indigène de B. bassiana contre différents stades de R. ferrugineus et de déterminer l efficacité d une formulation de cette souche dans un essai semi-terrain comme première étape pour révéler le potentiel de biocontrôle de cette souche.

Matériels et méthodes

Champignon entomopathogène

La souche de B. bassiana utilisée dans l expérience a été isolée à partir d une pupe infectée initialement collectée dans une palmeraie près de la ville de Catral, en Espagne, et appartient à la collection fongique du Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de l Université de Cordoue (Espagne) avec le code de référence EABb 07/06-Rf. Cette souche a été déposée sous le numéro d accession CECT-20752 le 13 mai 2009, à la

suite du traité de Budapest, dans la Collection espagnole de types de culture (CECT) à l'Université de Valence (Burjassot, Espagne). Les cultures fongiques ont été cultivées sur malt agar (12,75 g/l d'extrait de malt, 2,75 g/l de dextrine, 2,35 g/l de glycérol, 0,78 g/l de peptone de gélatine et 15,0 g/l d'agar) à 25°C dans l'obscurité. Les suspensions de conidies pour les expériences ont été préparées en raclant les conidies de cultures bien sporulées âgées de 15 jours dans une solution aqueuse de 0,2% de Tween 80. Les suspensions ont ensuite été filtrées à travers plusieurs couches d'étamine pour éliminer le mycélium. Pour homogénéiser l'inoculum, ils ont été soniqués pendant 10 min (ultrasons P-selecta, Barcelone, Espagne). Les suspensions ont été préparées indépendamment pour chaque test et, par conséquent, les concentrations de conidies utilisées n'étaient pas exactement les mêmes. Les concentrations de conidies ont été déterminées à l'aide d'un hémocytomètre. Les conidies viables en germination ont été comptées après 36 h d'incubation à 25°C dans de la gélose au malt. La germination des conidies était supérieure à 95%. Les suspensions ont été conservées dans l'obscurité à 4°C avant utilisation (Goettel et Inglis, 1997).

Colonies mères

Des charançons adultes collectés dans la province de Valence dans des pièges appâtés avec du ferrugineol (la phéromone d'agrégation de R. ferrugineus mâle) et des kairomones végétales (acétate d'éthyle et morceaux de feuilles de palmier) ont été utilisés pour démarrer les colonies de stock. Ces colonies ont été établies en 2007 et ont été périodiquement complétées par l'introduction de spécimens sauvages supplémentaires. Les charançons adultes ont été élevés dans une enceinte à environnement contrôlé à 25 ± 1 °C, 75 ± 5% H.R. et une photopériode de lumière de 16 h dans des cages en plexiglas (30 × 30 × 45 cm de profondeur) avec une densité de 120 à 150 charançons par cage. .Ces cages avaient un trou rond (8 cm de diamètre) sur la face supérieure recouverte d'un grillage utilisé pour la manipulation des spécimens et sa face inférieure était constituée d'un grillage métallique de 2 mm utilisé par les femelles pour la ponte. Les cages ont été placées au-dessus d'un plateau contenant un morceau plié de papier filtre humidifié contenant de fines tranches de pomme utilisées par les charançons femelles comme substrat de ponte et par les mâles et les femelles comme nourriture. Les tranches de pomme étaient remplacées trois fois par semaine (Dembilio et al., 2009).

Insectes expérimentaux

Des œufs, âgés de moins de 24 h, ont été obtenus à partir des colonies de stock et utilisés dans nos essais. Si nécessaire, les œufs ont été conservés sur des tranches de pomme jusqu'à l'éclosion ou élevés jusqu'au quatrième stade ou jusqu'à l'âge adulte (essais avec des larves nouveau-nées, des quatrième stades et des adultes élevés en laboratoire, respectivement). Après l'éclosion, les larves nouveau-nées ont été transférées

individuellement dans des flacons de 125 ml contenant 45 à 50 ml de l'alimentation artificielle du charançon (Martín et Cabello, 2006). Les larves ont été déplacées dans un nouveau flacon tous les quinze jours jusqu'à ce qu'elles soient prêtes pour la nymphose (larves âgées de 45 jours). A ce moment, les larves ont été déplacées vers un autre flacon contenant des brins d'alfa sec (Stipa tenacissima L.) utilisés par les larves pour construire un cocon. Environ un mois plus tard, des adultes élevés en laboratoire ont été obtenus. Les adultes collectés dans des pièges sur le terrain comme décrit ont également été utilisés dans nos essais en laboratoire.

Matériel végétal

Des essais semi-terrain ont été effectués sur des palmiers Phoenix canariensis en pot âgés de 5 ans provenant d'une pépinière officiellement inspectée (UE, 2007) et ont donc été présumés exempts de R. ferrugineus. Le stipe de ces palmiers mesurait 0,35-0,55 m de haut et 0,30-0,40 m de large. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine et maintenues à l'intérieur d'une enceinte de sécurité à double maille contenant 24 cages indépendantes (4 × 3 × 3 m). Les palmiers ont été conservés dans des conditions de lumière et de température naturelles pendant l'été et l'automne 2009. La température moyenne pendant les essais était de 24,5 °C (max : 42,2 °C ; min : 6,3 °C). Un toit en plastique protégeait l'enceinte de la pluie.

Essais biologiques

R. ferrugineus est un insecte assez difficile et coûteux à élever en laboratoire. Par conséquent, le nombre d'insectes utilisés dans nos expériences devait être considéré très attentivement. Des tests préliminaires de pathogénicité ont été menés sur les stades adultes et immatures de R. ferrugienus d'une part pour effectuer les postulats de Koch avec la souche indigène contre tous les stades et d'autre part pour définir la gamme de dosages à utiliser dans les tests d'activité biologique. Par conséquent, chaque étape a été testée au moins deux fois avant d'entreprendre les tests de laboratoire décrits ci-dessous. Les essais en laboratoire ont eu lieu dans une enceinte à environnement contrôlé à 25 ± 1 °C, 75 ± 5 % H.R. et une photopériode lumineuse de 16 h, tandis que les essais semi-terrain ont eu lieu à l'Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA) dans le double enceinte grillagée de sécurité décrite ci-dessus.

Virulence contre les œufs

Les œufs, âgés de moins de 24 h, ont été retirés des tranches de pomme avec un pinceau fin. Les répliques consistaient en des groupes de 12 œufs exposés ensemble à des suspensions de conidies de B. bassiana dans un panier de nettoyage en filet d'acier

inoxydable (16 mm de diamètre ; 17 mm de hauteur). Le panier a été immergé pendant 60 s dans une suspension aqueuse de conidies de 6,73 10 6 , 6,73 10 7 , 6,73 10 8 ou 6,73 10 9 conidies/ml ou dans une solution aqueuse témoin. Les solutions traitées et témoins contenaient 0,01% de Tween 80 (Marannino et al., 2006). Trois répétitions par concentration ont été utilisées. Ensuite, les œufs ont été transférés sur un papier filtre stérile humidifié à l'intérieur d'une boîte de Pétri non scellée (2,5 cm de diamètre). Le papier filtre humidifié a empêché la dessiccation des œufs. L'éclosion des œufs a été enregistrée quotidiennement pendant jusqu'à 6 jours et, lorsque elles étaient présentes, les larves nouveau-nées ont reçu des tranches de pomme un jour sur deux. Les larves mortes ont été transférées individuellement sur un papier filtre humidifié dans une boîte de Petri. Lorsque des signes externes d'infection fongique sur les larves n'ont pas été observés au cours des 24 heures suivantes, les cadavres ont été stérilisés en surface avec de l'hypochlorite de sodium à 1% suivi de trois rinçages avec de l'eau distillée stérile, placés sur un papier filtre stérile humidifié dans une boîte de Pétri stérile individuelle scellée avec parafilm et conservés à température ambiante pour vérifier l'implication de B. bassiana dans leur mort. Au total, 144 œufs ont été utilisés dans cette expérience.

Des œufs supplémentaires infectés par B. bassiana ont été fixés pendant une nuit à 4 °C avec du glutaraldéhyde à 0,25% dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,2, puis déshydratés dans une série d'éthanol à 100% d'éthanol. Les spécimens ont été séchés au point critique dans une unité de séchage avec du CO_2 (Balzers CPD-030), recouverts d'or-palladium (20:80) dans une unité de revêtement par pulvérisation Polaron E5100 et visualisés sur un JEOL JSM 6300 SEM à 39 kV.

Virulence contre les larves nouveau-nées

Les larves de nouveau-nés de moins de 48 h ont été traitées par groupes de 12 comme ci-dessus et exposées à une suspension aqueuse de conidies de 3,14 10 6 , 3,14 10 7 , 3,14 10 8 ou 3,14 10 9 conidies/ml ou une solution aqueuse témoin solution. Les suspensions traitées et témoins contenaient toutes deux 0,01% de Tween 80. Trois répliques de 12 larves par concentration testée ont été prises en compte. La mortalité a été enregistrée quotidiennement pendant jusqu'à 8 jours et les spécimens morts ont été traités comme ci-dessus. Au total, 144 larves nouveau-nées ont été utilisées dans cette expérience.

Virulence contre les larves de quatrième stade

Les larves du quatrième stade ont été directement immergées par groupes de 5 pendant 60 s dans une suspension aqueuse de conidies de 4,6 × 10 6 , 4,6 × 10 7 , 4,6 × 10 8 ou 4,6 × 10 9 conidies/ml ou dans une solution aqueuse témoin. Les solutions traitées et témoins contenaient toutes deux 0,01% de Tween 80. Trois répliques de 10 larves par concentration

ont été traitées. Après traitement, les larves ont été transférées individuellement sur un papier filtre humidifié dans une boîte de Pétri (2,5 cm de diamètre) pendant 24 h. Ensuite, ils ont ensuite été transférés individuellement dans des flacons d'élevage de 100 ml. La mortalité a été enregistrée quotidiennement et les spécimens morts ont été traités comme ci-dessus. Au total, 120 larves ont été utilisées dans cette expérience.

Virulence contre les adultes élevés en laboratoire et collectés sur le terrain

Des charançons élevés en laboratoire, âgés de moins de 24 à 48 h, ont été immergés par groupes de quatre pendant 90 s dans une suspension aqueuse de conidies soit de 5,16 10 6 , 5,16 10 7 , 5,16 10 8 ou 5,16 10 9 conidies /ml ou dans une solution aqueuse témoin. Les solutions témoins et traitées contenaient toutes deux 0,02% de Tween 80. Les adultes ont été transférés dans une boîte en plastique (15 × 10 × 10 cm) sur du papier filtre humidifié et des tranches de pomme. La mortalité a été vérifiée quotidiennement. Trois répétitions de 12 adultes par concentration ont été considérées. La même procédure a été appliquée aux adultes collectés sur le terrain, qui ont été exposés à 6,73 × 10 6 , 6,73 × 10 7 , 6,73 × 10 8 ou 6,73 × 10 9 conidies/ml ou à une solution témoin. Au total, 288 adultes ont été utilisés dans ces expériences.

Transmission horizontale chez les adultes et effets sublétaux sur la reproduction

Des adultes de moins de 24 h élevés en laboratoire ont été immergés individuellement pendant 90 s dans une suspension aqueuse de conidies ajustée à une concentration finale de 1,5 × 10 9 conidies/ml. Les solutions de contrôle et traitées contenaient toutes deux 0,02% de Tween 80. Quatre combinaisons d'accouplement ont été établies : (1) femelles non traitées Â mâles non traités, (2) femelles traitées Â mâles non traités, (3) femelles non traitées Â mâles traités et (4) femelles traitées Â traitées mâles. Chaque paire a ensuite été transférée dans une boîte en plastique (15 × 10 × 10 cm) sur du papier filtre humidifié et des tranches de pomme. La mortalité et la ponte ont été contrôlées quotidiennement pendant 21 jours. Les œufs ont ensuite été transférés dans une boîte de Pétri non scellée (2,5 cm de diamètre) sur un papier filtre stérile humidifié. L'éclosion des œufs a été enregistrée quotidiennement pendant jusqu'à 6 jours supplémentaires. Quatre répétitions de 10 couples par combinaison d'accouplement ont été réalisées. Les spécimens morts ont été traités comme ci-dessus pour confirmer l'implication de B. bassiana dans leur mort. Au total, 40 mâles et 40 femelles ont été utilisés dans cette expérience.

Essais semi-terrain

Deux essais préventifs différents utilisant deux méthodes d'application ont été effectués. Le produit (une suspension aqueuse de conidies de B. bassiana ajustée à une concentration finale de 6,4 × 10 8 conidies/ml par dilution avec 0,02% de Tween 80) a été appliqué soit en peignant au pinceau en veillant à ce que le stipe extérieur et la base des frondes ont été recouverts (2000 ml par paume), ou en pulvérisant directement sur le stipe avec un pulvérisateur manuel à dos (Mauricio Ò 18 l Pulverizadores Mauricio S A., Valence, Espagne) (2000 ml par paume).

Le premier test consistait à appliquer jusqu'à quatre traitements à 15 jours d'intervalle sur 45 palmiers infestés au jour 1. Vingt palmiers ont été peints et vingt palmiers ont été pulvérisés, tandis que les cinq palmiers restants n'ont reçu aucun traitement et ont constitué le groupe témoin. Deux heures après l'application du produit, tous les palmiers ont été exposés individuellement à trois femelles vraisemblablement accouplées et à deux mâles de R. ferrugineus par plante dans trois cages séparées (une cage par méthode d'application et témoin). Une semaine plus tard, lorsqu'ils ont été trouvés, les adultes ont été retirés. Les palmiers traités par groupes de cinq ont reçu de 1 à 3 traitements supplémentaires à 15 jours d'intervalle. Un mois après le dernier traitement, les palmiers ont été soigneusement disséqués et vérifiés pour la présence de R. ferrugineus. Tous les spécimens trouvés ont été comptés.

Le deuxième essai, où la persistance du produit a été évaluée, consistait à appliquer un seul traitement par palmier et les infestations suivantes à partir de 15 jours après le traitement, puis tous les 15 jours jusqu'au jour 45. Quinze palmiers non infestés ont été peints et 15 autres ont été pulvérisés comme décrit précédemment. . Quinze palmiers supplémentaires constituaient le groupe témoin. Quinze jours après l'application du produit, cinq palmiers par méthode d'application et le témoin ont été infestés comme ci-dessus. Les 10 palmiers restants par méthode d'application et contrôle ont été infestés à intervalles de 15 jours par groupes de cinq. Les palmiers ont été traités comme avant. Les palmiers témoins et ceux infestés 2 h après le traitement du premier essai ont été inclus dans les analyses statistiques de cet essai.

analyses statistiques

Dans les tests de laboratoire, pour chaque stade/sexe et concentration testés, les durées moyennes de survie (AST) en jours ont été calculées à l'aide de l'analyse de survie de Kaplan-Meier (Kaplan et Meier, 1958). La fécondité, l'éclosion des œufs et les valeurs d'AST ont ensuite été soumises à une analyse de variance (ANOVA ; $P < 0,05$) à l'aide de Statgraphics Plus 4.1 (Manugistics Group Inc., Rockville, MD, États-Unis). Les résultats d'éclosion des œufs ont été soumis à la transformation angulaire avant l'analyse pour répondre aux exigences de

l'ANOVA. Le cas échéant, les moyennes ont été séparées par le test de Duncan (P = 0,05). Pour chaque stade testé, le pourcentage de mortalité a été corrigé (Abbott, 1925), transformé en probits et les lignes probits correspondantes ajustées (LeOra Software Inc., 1987). Un test du chi carré a été utilisé pour prouver la qualité de l'ajustement. De plus, les parcelles de résidus standardisés ont été vérifiées pour leur emplacement dans une bande horizontale de ± 2 unités autour de zéro (Robertson et al., 1994).

Dans les essais semi-terrain, le nombre moyen d'insectes par palmier a été soumis à une ANOVA. Le cas échéant, les moyennes ont été séparées par le test de Duncan (P = 0,05). Lorsque des différences significatives par rapport aux palmiers témoins ont été trouvées, les efficacités ont été calculées selon Abbott (1925).

Résultats

3.1. Virulence contre les stades sélectionnés de R. ferrugineus B. bassiana a infecté tous les stades de R. ferrugineus. Au microscope, des conidies germées pénétrant dans le chorion de bœuf de R. ferrugineus ont pu être observées à toutes les doses testées dès 24 h après le traitement. Plus la dose est élevée et plus le temps écoulé depuis l'exposition est long, plus le pourcentage de conidies établies avec succès est élevé. Les conidies germées pénètrent généralement directement dans le chorion. Cependant, à des doses plus élevées, une certaine croissance des hyphes avant la pénétration dans lhôte a pu être observée. La plupart des œufs traités avec B. bassiana présentaient une décoloration rose interne, une perte de turgescence, un teint terne et un noircissement qui sont apparus 2 à 3 jours après le traitement. Par la suite, la plupart des œufs ont été détruits et ont disparu dans le substrat. Les quelques larves nouveau-nées obtenues à partir dœufs traités sont mortes en moins de 3 jours à toutes les doses testées. Ces larves se sont avérées infectées par B. bassiana. Dans la plupart des cas, la croissance post-mortem des hyphes et la sporulation de B. bassiana ont été observées couvrant les œufs, les larves et les adultes. En général, plus la dose est élevée, plus les taux déclosion des œufs sont faibles et plus les valeurs d'AST enregistrées pour un stade donné sont courtes (tableau 1). Les larves ont répondu plus rapidement à l'infection que les adultes et pour les larves de quatrième stade, il n'y avait pas de différences significatives entre les valeurs d'AST enregistrées pour les deux doses plus élevées testées. Il en va de même pour les adultes collectés sur le terrain. Lorsque les lignes probit correspondantes ont été ajustées (tableau 2), les larves du quatrième stade ont donné la CL 50 la plus faible et les adultes recueillis sur le terrain ont donné la plus élevée. Les adultes élevés en laboratoire ont donné une réponse plus homogène que les spécimens prélevés sur le terrain, comme indiqué par la ligne probit plus raide ajustée, et presque quatre fois plus sensibles à B. bassiana que les spécimens prélevés sur le terrain, comme indiqué par la puissance relative (3,805).

Transmission horizontale chez les adultes et effets sublétaux sur la reproduction

La mortalité des insectes témoins 21 jours après le traitement était inférieure à 5,0% (tableau 3) et était significativement différente de celle des spécimens traités avec B. bassiana, qui variait de 55,0% à 90,0%. Dans tous ces spécimens, une excroissance de B. bassiana a été observée et, par conséquent, l'implication directe de ce champignon dans leur mort a été confirmée. Le sexe et le traitement affectaient significativement ces résultats et l'interaction entre ces deux facteurs était également significative. Pour les couples traités, la mortalité des femelles variait de 55,0% à 75,0% et les différences entre les traitements n'étaient pas significatives. Par conséquent, la mortalité féminine était la même quelque soit le sexe infecté à l'origine (homme ou femme traité). Cependant, l'origine de l'infection était significative pour les mâles des couples traités et la mortalité des mâles était la plus élevée lorsque l'infection provenait d'un mâle traité (85,0-90,0% contre 60,0%). Les valeurs d'AST pour les insectes dans les paires traitées (l'AST pour les insectes témoins n'a pas pu être calculée car la mortalité au jour 21 était inférieure à 50%) ne dépendaient pas du sexe, mais étaient significativement affectées par le traitement et l'interaction entre l'éclosion des œufs à 4 jours et Temps de survie moyen (AST, jours après traitement) pour R. ferrugineus différents stades/stades traités avec B. bassiana en laboratoire. La méthode d'analyse de survie de Kaplan-Meier a été utilisée pour calculer les valeurs d'AST. 58,3 ± 5,9 a 2,5 ± 0,2 a 5,8 ± 0,2 a 6,6 ± 0,1 a c c X 10 7

38,9 ± 6,9 b 1,8 ± 0,1 b 4,5 ± 0,1 b 4,6 ± 0,4 b c c X 10 8 30,6 ± 3,4 b 1,7 ± 0,1 b 3,4 ± 0,3 c 1,5 ± 0,3 c 21,2 ± 0,5 a 22,3 ± 2,0 a X 10 9 5,6 ± 3,4 c 0,5 ± 0,2 c 2,0 ± 0. Valeurs AST limitées à la durée du test. Au sein d'une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes les unes des autres (test de Duncan à P < 0,05). a X = 6,73, 3,14, 4,6, 5,16 et 6,73 pour les œufs, les larves nouveau-nées et du quatrième stade, les adultes élevés en laboratoire et collectés sur le terrain, respectivement. b Les données réelles ont été soumises à la transformation angulaire avant l'analyse. c Les valeurs AST n'ont pas pu être calculées car la mortalité observée était inférieure à 50%. 3,7 10 8 -1,2 10 9 Champ adulte b 21 144 0,861 ± 0,236 0,1217 0,9410 3,0 10 9 1,1 10 9 -1,1 10 10 a Les degrés de liberté étaient de deux dans tous les cas. b Les lignées obtenues pour les adultes collectés sur le terrain et élevés en laboratoire étaient statistiquement différentes ({2 = 11,3846 ; df = 2 ; P < 0,0030). Cependant, ils ont pu être forcés de manière satisfaisante au parallélisme ({2 = 3,0838 ; dl = 1 ; P = 0,079) et la puissance relative des adultes collectés sur le terrain par rapport aux adultes élevés en laboratoire a donné 3,8055 (limites de confiance 95% : 1,5086-9,7317).

les deux facteurs étaient également significatifs. La survie était significativement plus élevée lorsque l'insecte infecté à l'origine appartenait au sexe opposé (19,2-19,6 jours contre 16,1-17,2 jours, tableau 3).

Les paramètres de reproduction des couples témoins non traités étaient toujours significativement différents de ceux des insectes traités (tableau 4). La fécondité et l'éclosion des œufs étaient significativement plus faibles chez les couples traités (52,4% et 32,8%, réductions moyennes respectivement) et des réductions maximales ont été observées lorsque les mâles et les femelles avaient été initialement traités avec B. bassiana (réduction de la fécondité de 62,6%). Des différences significatives ont été observées dans le taux de ponte des couples témoins et traités à partir de 14 jours après le traitement (Fig. 1). À partir de ce jour, la fécondité des femelles témoins a augmenté jusqu'à plus de 3,5 œufs par femelle et par jour, tandis que celle de celles exposées à B. bassiana a diminué à environ 1,5 œufs par femelle et par jour, quelque soit le sexe du parent initialement traité. Des différences dans l'éclosion des œufs ont été observées beaucoup plus tôt (Fig. 2). À partir du jour 4, les œufs obtenus des couples traités ont éclos significativement moins que les témoins. De même, la survie des larves obtenues à partir des œufs pondus par les couples traités était significativement inférieure à celle des insectes témoins (tableau 4) et la réduction (32,5%) était la même quelque soit le sexe du parent initialement traité. Dans l'ensemble, ces réductions ont entraîné une réduction moyenne de 78,4% de la progéniture chez les couples traités.

Essais semi-terrain

Les résultats obtenus ont montré que dans les deux essais, les palmiers traités contenaient significativement moins de spécimens vivants que les témoins. ou non avec B. bassiana en laboratoire. La méthode d'analyse de survie de Kaplan-Meier a été utilisée pour calculer les valeurs d'AST (Kaplan et Meier, 1958). Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions comprenant 10 couples chacune.

Traitement

Mortalité AST Valeurs AST limitées à la durée du test. Pour les couples traités, une excroissance fongique prouvant l'implication directe de B. bassiana dans leur mort a été confimée.

Tableau 4

Taux de ponte (œufs par femelle et par jour), fécondité (œufs par femelle), éclosion des œufs (%) et survie larvaire 6 jours après l'éclosion (%) pour différents types de couples de R. ferrugineus traités ou non avec B. bassiana dans le laboratoire. Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions comprenant 10 couples chacune. Seules les femelles pondeuses ont été prises en compte pour calculer le taux de ponte. Au sein d'une colonne, les données

suivies de la même lettre ne sont pas différentes (P < 0,005). Fig. 1. Taux de ponte (nombre moyen d'œufs par femelle par jour) des femelles R. ferrugineus nourries de tranches de pomme sous quatre combinaisons d'accouplement : (1) femelle non traitée × mâle non traité, (2) femelle traitée × mâle non traité, (3) femme non traitée × homme traité et (4) femme traitée × homme traité.

(Tableaux 5 et 6). De petites galeries incomplètes et d'autres signes de développement précoce de R. ferrugienus où les larves étaient mortes prématurément ont été fréquemment observés dans les palmiers traités. Cependant, il était impossible de récupérer un cadavre immature de ces palmiers car ils étaient déjà décomposés et donc l'implication de B. bassiana dans ces décès ne pouvait pas être directement prouvée. Dans les deux essais, l'efficacité du traitement dépendait de la méthode d'application utilisée, et la pulvérisation était systématiquement plus efficace que la peinture. (1) femme non traitée × homme non traité, (2) femme traitée × homme non traité, (3) femme non traitée × homme traité et (4) femme traitée × homme traité.

Tableau 5

Infestation des palmiers (%) et nombre moyen de stades immatures de R. ferrugineus trouvés chez des P. canariensis âgés de 5 ans après infestation par 3 femelles et 2 mâles par palmier et traitement ultérieur avec B. bassiana ($6,4 \times 10^8$ conidies/ml). Les palmiers ont reçu un à quatre traitements de 2 000 ml par palmier sous forme de peinture ou de pulvérisation à 15 jours d'intervalle. Les efficacités (%) ont été calculées sur la base du nombre total d'individus trouvés. Cinq palmiers (= répétitions) par méthode d'application et nombre de traitements et le contrôle ont été pris en compte.

Dans le premier essai (tableau 5), il n'y avait pas de relation claire entre l'efficacité et le nombre de traitements appliqués (jusqu'à quatre). Les efficacités dans les palmiers peints variaient entre 39,2% et 70,4%, pour 3 et 2 applications, respectivement. Dans le cas du spray, il n'y avait pas de différences significatives entre les traitements et les efficacités variaient de 74,6% à 85,7%.

Dans le deuxième essai (tableau 6), les palmiers infestés à la fin du mois d'août, en coïncidence avec le traitement par B. bassiana, avaient significativement plus d'individus que ceux infestés 15 ou 30 jours plus tard (37,8 contre 20,6-22,0 chez les palmiers témoins, respectivement). Ceux infestés 45 jours plus tard, à la mi-octobre, avaient les records les plus bas (12,4 individus par palmier témoin) et c'est précisément dans ces palmiers que les efficacités étaient les plus élevées (respectivement 82,3 et 88,7% pour les traitements peinture et pulvérisation). L'efficacité la plus faible du traitement à la peinture était de 30,1% chez les palmiers infestés 30 jours après le traitement, tandis que celle du traitement par pulvérisation était de 74,6% chez ceux infestés 2 h après le traitement.

Discussion

Les résultats de laboratoire prouvent que la souche EABb 07/06-Rf de B. bassiana peut infecter les œufs, les larves et les adultes de R. ferrugineus et, dans la plupart des cas, terminer complètement son cycle de vie en sporulant sur les cadavres de R. ferrugineus. Les œufs d'insectes sont généralement le stade le plus résistant à B. bassiana et cela est lié à la présence du chorion (Roberts et Humber, 1981). En conséquence, les œufs de R. ferrugineus étaient moins sensibles que les larves de quatrième stade, mais étaient au contraire beaucoup plus sensibles à l'infection par B. bassiana que les adultes (tableau 2). La souche de B. bassiana utilisée dans cette étude a tué la plupart des œufs de R. ferrugineus lorsque elle a été directement traitée en laboratoire et a infecté les larves de nouveau-nés issues des œufs survivants, ce qui a entraîné un effet combiné sur les deux stades de 100% de mortalité en moins de 72 h aux concentrations testées (tableau 1). Ce résultat pourrait s'expliquer par une infection directe des larves nouveau-nées à l'éclosion (ce qui dans nos tests de laboratoire a pris moins de 3 jours), mais aussi par une infection pré-éclosion de l'embryon à l'intérieur de l'œuf, comme observé dans certains cas et confirmé par les tests de reproduction où l'éclosion des œufs et la survie des larves obtenues à partir d'œufs de couples traités ont été significativement réduites (tableau 4).

En termes de mortalité, les adultes élevés en laboratoire étaient presque quatre fois plus sensibles à B. bassiana que les spécimens collectés sur le terrain. Ce résultat peut s'expliquer par des différences de taille (0,48 ± 0,10 contre 1,01 ± 0,11 g pour les spécimens de laboratoire et de terrain, respectivement) (mêmes auteurs, résultats non publiés), mais des différences de rusticité de la cuticule ne peuvent être exclues. Les spécimens de laboratoire étaient âgés de 24 à 48 h lorsqu'ils ont été traités et on sait d'après d'autres coléoptères que plusieurs jours peuvent s'écouler jusqu'à ce que les élytres atteignent leur résistance maximale et deviennent donc moins sensibles à la pénétration (Grosscurt, 1978). Dans des conditions de laboratoire, Martín et Cabello (2006) ont établi la longévité de R. ferrugineus à 199,4 jours pour les mâles et à 144,3 jours pour les femelles. Ces valeurs sont bien supérieures à celles rapportées pour cette espèce en conditions naturelles : 76 et 107 jours pour les mâles et les femelles, respectivement (Menon et Pandalai, 1960), 50-90 jours pour la population adulte en général (Butani, 1975) et 60 jours pour les femelles (Rahalkar et al., 1985). Les valeurs d'AST obtenues dans nos tests de laboratoire pour les adultes traités variaient de 16 à 22 jours (tableaux 1 et 3). Trois semaines après le traitement, la mortalité des insectes traités variait de 55% à 90%, tandis que celle des spécimens élevés en laboratoire et collectés sur le terrain était inférieure à 5% (tableau 3). Ces résultats indiquent que l'infection à B. bassiana chez les adultes de R. ferrugineus peut réduire leur durée de vie de la moitié à près d'un dixième selon la référence utilisée pour la comparaison. Cependant, la mortalité n'était pas le seul indicateur de l'efficacité du traitement. Comme dans des situations similaires (Quesada-Moraga et al., 2004, 2006a, 2008), les adultes des deux sexes inoculés avec le champignon ont efficacement transmis la maladie aux adultes non traités du sexe opposé (taux de transmission compris entre 55,0% et 60,0%).%, Tableau 3).

Contrairement à ce que Gindin et al. (2006) ont trouvé dans leurs essais avec M. anisopliae, l'infection par la souche EABb 07/06-Rf de B. bassiana a entraîné une réduction de la fécondité d'environ 52% (de 44,6% à 62,6%, selon le sexe du parent à l'origine traités, tableau 3) et la combinaison de ce chiffre avec les réductions susmentionnées de l'éclosion des œufs et de la survie larvaire des œufs obtenus à partir de couples traités, a entraîné une réduction globale de la progéniture d'environ 78%. Par conséquent, les traitements de B. bassiana contre R. ferrugineus devraient réduire ses populations à la fois par la mortalité des charançons principalement infectés et leurs effets sublétaux sur la reproduction et la descendance de ces adultes et de ceux qui sont en contact avec eux.

La méthode d'immersion utilisée dans nos tests de laboratoire pour infecter R. ferrugineus est complètement différente de la façon dont les insectes ramasseraient les spores de B. bassiana sur le terrain. Cependant, les efficacités obtenues dans nos essais semi-terrain indiquent que l'infection par contact des adultes s'est effectivement produite. Sur le terrain, les adultes peuvent être infectés soit (a) à l'émergence, soit (b) lorsqu'ils s'approchent des palmiers traités pour de nouvelles infestations. Ce dernier est la façon dont nous avons présumé que B. bassiana infectait R. ferrugineus dans nos essais semi-terrain. Étant donné que B. bassiana est transmis horizontalement chez R. ferrugineus (tableau 3) et que ses effets peuvent être observés même à la génération suivante (tableau 4, figures 1 et 2), la propagation de l'infection à d'autres adultes et à la génération suivante pourrait expliquent les efficacités élevées trouvées dans nos essais semi-terrain. De plus, des spécimens morts sporulant dans le palmier pourraient contribuer à propager davantage la maladie à l'intérieur. En fait, la propagation interne naturelle de certaines souches de B. bassiana qui peuvent s'établir de manière endophytique dans les plantes a été rapportée (Quesada-Moraga et al., 2006b Vega et al., 2008; Vega, 2008). Si tel était le cas de la souche EABb 07/06-Rf, les stades de R. ferrugineus à l'intérieur du palmier pourraient être directement exposés au champignon. C'est une question qui devrait cependant être correctement abordée car elle pourrait fournir un nouvel outil de gestion de R. ferrugineus.

Les caractéristiques du traitement (formulation, pression, volume, etc.) et les caractéristiques de l'hôte (comportement, caractéristiques spécifiques de la cuticule, etc.) peuvent influencer la capture des spores et les résultats des essais en semi-terrain montrent que la méthode d'application a affecté de manière significative l'efficacité. de nos traitements (tableaux 5 et 6). La pulvérisation a été significativement plus efficace et a donné des résultats plus homogènes que la peinture et cela peut être lié à une couverture plus complète de la paume lors de la pulvérisation. Il est intéressant de noter que les essais en semi-terrain ont montré que jusqu'à quatre traitements par palmier n'entraînaient pas des efficacités supérieures à un seul (tableau 5). Ils ont également montré que la persistance du traitement était d'au moins 45 jours (Tableau 6). Cependant, si les efficacités plus élevées observées dans le deuxième test pour les palmiers infestés 45 jours après le traitement sont le résultat d'un niveau d'infestation plus faible (dans nos conditions climatiques, octobre est une

mauvaise période de l'année pour la colonisation par R. ferrugineus par rapport à août) mérite des recherches plus approfondies.

Bien que nos résultats prouvent que tous les stades de vie de R. ferrugineus peuvent être infectés par B. bassiana, les adultes sont en fait le seul stade libre. Par conséquent, les adultes doivent être considérés comme la cible de tout traitement impliquant ce champignon entomopathogène. Étant donné que B. bassiana peut accomplir son cycle de vie chez R. ferrugineus et que les adultes infectés par B. bassiana peuvent transmettre l'agent pathogène à d'autres individus de la même population et même à la génération suivante, les stratégies visant à attirer et à infecter les charançons adultes pourraient s'avérer les plus efficaces. Les charançons adultes sont fortement attirés par les fuites de kairomone lors des pratiques de production végétative qui comprennent l'élimination des ramifications et la taille (Giblin-Davis, 2001). Ces zones sont souvent les endroits les plus attractifs pour la ponte et, par conséquent, peuvent être les meilleurs candidats pour des traitements localisés avec des champignons. Cette attraction est également à la base des stratégies de piégeage de masse actuellement utilisées contre le charançon dans certains pays (Hallett et al., 1999 ; Faleiro, 2006). La conception de pièges efficaces visant non pas à tuer mais à infecter les charançons visiteurs (Rechcigl et Rechcigl, 2000) pourrait assurer la propagation de la maladie au sein d'une population déjà établie. Enfin, l'utilisation de mâles stériles irradiés (Al-Ayedh et Rasool, 2009) infectés par B. bassiana pourrait être utilisée dans le même but (Sewify et al., 2009). Toutes ces stratégies, qui pourraient être utilisées simultanément et en combinaison avec le piégeage de masse, sont à considérer et méritent d'être approfondies.

En résumé, nos résultats prouvent que la souche EABb 07/06-Rf de B. bassiana doit être sérieusement considérée comme agent de lutte biologique contre R. ferrugienus.

Références

Abbott, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265–267.

Adane, K., Moore, D., Archer, S.A., 1996. Preliminary studies on the use of Beauveria bassiana to control Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. J. Stor. Prod. Res. 32, 105–113.

Al-Ayedh, H.Y., Rasool, K.G., 2009. Sex ratio and the role of mild relative humidity in mating behaviour of red date palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Oliv. (Coleoptera: Curculionidae) gamma-irradiated adults. J. Appl. Entomol.. doi:10.1111/j.1439-0418.2009.01460.x.

Butani, D.K., 1975. Insect pests of fruit crops and their control, sapota-11: date palm. Pest.

Res. J. 9, 40–42.

De la Rosa, W., Alatorre, R., Trujillo, J., Barrera, J.F., 1997. Virulence of Beauveria bassiana (Deuteromycetes) strains against the coffee borer (Coleoptera: Scolytidae). J. Econ. Entomol. 90, 1534–1538.

Dembilio, Ó., Jacas, J.A., Llácer, E., 2009. Are the palms Washingtonia filifera and Chamaerops humilis suitable hosts for the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae)? J. Appl. Entomol. 133, 565–567.

Dembilio, Ó., Llácer, E., Martínez de Altube, M.M., Jacas, J.A., 2010. Field efficacy of imidacloprid and Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis. Pest Manage. Sci.. doi:10.1002/ps.1882.

El-Sufty, R., Al-Awash, S.A., Al Bgham, S., Shahdad, A.S., Al Bathra, A.H., 2009. Pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill to the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) (Col.: Curculionidae) under Laboratory and Field Conditions. Egyptian J. Biol. Pest Control 19, 81.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2008. Data sheets on quarantine pests. Rhynchophorus ferrugineus. EPPO Bullet. 38, 55–59.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2009. First record of Rhynchophorus ferrugineus in Curaçao, Netherlands Antilles, January 26, 2009.

EU (European Union), 2007. Commission decision of 25 May 2007 on emergency measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier). 2007/365/EC. Off. J. Eur. Union L 139, 24–27.

Faleiro, J.R., 2006. A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. Int. J. Trop. Insect Sci. 26, 135–154.

Giblin-Davis, R.M., 2001. Borers of palms. In: Howard, F.W., Moore, D., Giblin-Davis, R.M., Abad, R.G. (Eds.), Insects on Palms. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 267–305.

Gindin, G., Levski, S., Glazer, I., Soroker, V., 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana against the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus. Phytoparasitica 34, 370–379.

Goettel,M.S., Inglis,D.G.,1997. Fungi:Hyphomycetes. In: Lacey,L.A. (Ed.),Manual of techniques in insect pathology. Academic Press,London,UK,pp. 213–249.

Grosscurt,A.C.,1978. Effects of diflubenzuron on mechanical penetrability,chitin formation and structure of the elytra of Leptinotarsa decemlineata. J. Insect Physiol. 24,827–831.

Glare,T.R.,Placer,C.,Nelson,T.L.,Reay,S.D.,2002. Potential of Beauveria and Metarhizium as control agents of pinhole borers (Platypus spp.). N.Z. Plant Prot. 55,73–79.

Hallett,R.H.,Oehlschlager,A.C.,Borden,J.H.,1999. Pheromone-trapping protocols for Rhynchophorus ferrugineus. Int. J. Pest Manage. 45,231–237.

Kaplan,E.L.,Meier,P.,1958. Nonparametric estimation from incomplete data. J. Am. Stat. Assoc. 53,457–481.

Lacey,L.A.,Kirk,A.A.,Millar,L.,Mereadier,G.,Vidal,C.,1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of Paecilomyces fumosoroseus (Deuteromycotina:Hyphomycetes) against Bemisia argentifolii (Homoptera:Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. Biocontrol Sci. Technol. 9,9–18.

Software,LeOra.,1987. Polo-Pc:A User's Guide to Probit Or Log it Analysis. LeOra Software, Berkeley.

Llácer,E.,Martínez,J.,Jacas,J.A.,2009. Evaluation of the efficacy of Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the red palm weevil,Rhynchophorus ferrugineus, in Phoenix canariensis. BioControl 54,559–565.

Marannino,P.,Santiago-Álvarez,C.,de Lillo,E.,Quesada-Moraga,E.,2006. A new bioassay method reveals pathogenicity of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana against early stages of Capnodis tenebrionis (Coleoptera:Buprestidae). J. Invertebr. Pathol. 93,210–213.

Martín,M.M.,Cabello,T.,2006. Manejo de la cría del picudo rojo de la palmera, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier,1790) (Coleoptera,Dryophthoridae),en dieta artificial y efectos en su biometría y biología. Bol. San. Veg. Plagas 32,631– 641.

Menon,K.P.V.,Pandalai,K.M.,1960. A Monograph of the Coconut Palm. Ernakulam, India. p. 384.

Murphy,S.T.,Briscoe,B.R.,1999. The red palm weevil as an alien invasive:biology and prospects for biological control as a component of IPM. Biocontrol N. Inf. 20,35–45.

Quesada-Moraga, E., Santos-Quiros, R., Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of Metarhizium anisopliae (anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87, 51–58.

Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Santiago-Álvarez, C., 2006a. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae against puparia and adults of Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae).

J. Econ. Entomol. 99, 1955–1966.

Quesada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, F.J., Jiménez-Díaz, R., Santiago-Álvarez, C., 2006b. Endophytic colonization of opium poppy Papaver somniferum by an entomopathogenic Beauveria bassiana strain. Mycopathologia 161, 323–329.

Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C., 2008. Horizontal transmission of Metarhizium anisopliae among laboratory populations of Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biol. Control 47, 115–124.

Quesada-Moraga, E., Muñoz-Ledesma, F.J., Santiago-Álvarez, C., 2009. Systemic protection of the opium poppy, Papaver somniferum L., against Iraella luteipes (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales). Environ. Entomol. 38, 723–730.

Rahalkar, G.W., Harwalkar, M.R., Rananavare, H.D., Tamhankar, A.J., Shanthram, K., 1985. Rhynchophorus ferrugineus. In: Singh, P., Moore, R.F. (Eds.), Handbook of Insect Rearing. Elsevier, Amsterdam, NL, pp. 279–286.

Rechcigl, J.E., Rechcigl, N.A., 2000. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. Lewis Publishers, Boca Raton, US. 374 pp.

Roberts, D.W., Humber, R.A., 1981. Entomogenous fungi. In: Kendrick, G.T., Cole, B. (Eds.), Biology of Conidial Fungi. Academic Press, New York, pp. 201–236.

Robertson, J.L., Preisler, H.K., Frampton, E.R., Armstrong, J.W., 1994. Statistical analyses to estimate efficacy of disinfestation treatments. In: Sharp, J.L., Hallman, G.J. (Eds.), Quarantine Treatments for Pests of Fruit Plants. Westview Press, Boulder, pp. 47–65.

Sewify, G.H., Belal, M.H., Al-Awash, S.A., 2009. Use of the Entomopathogenic Fungus, Beauveria bassiana for the Biological Control of the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus Olivier. Egyptian J. Biol. Pest Control 19, 157–163.

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S.A., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Biol. Control 46, 72–82.

Vega, F., 2008. Insect pathology and fungal endophytes. J. Invertebr. Pathol. 98, 277–279.

Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Beauveria brongniartii. Biocontrol Sci. Technol. 17, 553–596.