

## Piège à autocontamination par des champignons entomopathogènes : une stratégie possible dans la lutte contre *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera Curculionidae)

Traduit de: Autocontamination trap with entomopathogenic fungi: a possible strategy in the control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera Curculionidae)

Gian Paolo Barzanti

### 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 Academia de 47 millions d'articles gratuits

# Piège à autocontamination par des champignons entomopathogènes : une stratégie possible dans la lutte contre *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera Curculionidae)

Gian Paolo Barzanti

[Original Paper](#) 

---

## Résumé

piège à champignons entomopathogènes : une stratégie possible dans la lutte contre *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera Curculionidae). Un piège expérimental d'autocontamination a été mis au point pour infecter *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), le charançon rouge du palmier, adultes avec des champignons entomopathogènes. L'objectif était de développer un dispositif d'autocontamination pour soutenir les programmes de contrôle intégrés de *R. ferrugineus*. Dans des essais biologiques en laboratoire, le système de livraison a réussi à attirer, infecter et libérer des adultes de charançons après avoir été en contact avec des substrats de céréales inoculés avec des souches indigènes de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin et *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Les tests effectués avec les pièges expérimentaux ont montré que *M. anisopliae* était l'agent pathogène le plus virulent, causant 75 % de mortalité cumulée chez les adultes, tandis que *B. bassiana* a donné une mortalité cumulée de 45 %. L'infectiosité de *M. anisopliae* n'a pas été affectée par les différents substrats céréaliers, c'est-à-dire le blé et le riz, car la mortalité cumulée des curculionidés (95 %) et l'efficacité du traitement (95 % Abbott) étaient très élevées sur les deux et le charançon rouge du palmier LT 50 a été atteint en moins de en même temps (15 jours). La persistance et la germinabilité des conidies de *M. anisopliae*

cultivées sur le substrat de riz ont été examinées dans des conditions de terrain à l'intérieur de pièges situés dans des positions ensoleillées et ombragées au printemps, en été et en automne. Les résultats ont montré que les pièges préservent la stabilité de l'inoculum fongique plus longtemps au printemps et en été qu'en automne. Aucune différence significative dans la persistance des conidies de *M. anisopliae* n'a été trouvée entre les pièges ensoleillés et ombragés au cours des différentes saisons.

## INTRODUCTION

Des efforts croissants sont déployés pour concevoir une stratégie valable de gestion du charançon rouge du palmier, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), le ravageur le plus nuisible de plusieurs espèces de palmiers dans la région méditerranéenne (OEPP, 2008). Ces efforts impliquent des traitements chimiques et des boutures d'assainissement, seuls ou en combinaison, pour sauver les palmiers et limiter la propagation de l'insecte dans l'environnement. Les insecticides chimiques sont efficaces dans la lutte contre le charançon rouge du palmier mais, comme ils sont de courte durée, ils doivent être appliqués périodiquement, avec des conséquences négatives possibles pour la santé humaine et l'émergence de résistances chez l'insecte (FERRY & GOMEZ, 2002;FALEIRO, 2006 ;LLÁCER et al., 2012a). Les traitements microbiologiques avec les champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin et *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin offrent une stratégie de lutte alternative et écologiquement compatible (INGLIS et al., 2001). Leur efficacité et leur persistance au champ peuvent être augmentées par des dispositifs d'autodissémination qui ont fait leurs preuves dans la lutte contre différents groupes d'insectes (VEGA et al., 1995). Le succès du système d'auto-infection dépend de la virulence et de la persistance de la souche entomopathogène, et de l'efficacité de l'autodisséminateur à attirer l'insecte cible et à lui transmettre l'inoculum (FURLONG & PELL, 2001;KREUTZ et al., 2004;QUESADA- MORAGA et al., 2004.

L'identification récente de souches de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* à haute virulence contre le charançon rouge du palmier a augmenté la possibilité d'un contrôle microbiologique plus efficace du curculionide. Des études en laboratoire ont été menées pour déterminer des méthodes efficaces pour infecter les adultes du charançon rouge du palmier via différents substrats contaminés, tels qu'un régime naturel (pulpe de dattes) et des céréales (riz et blé) (DEADMAN et al., 2001;GINDIN et al., 2006 ;FRANCARDI et al., 2012). Des études de terrain ont examiné le transfert d'inoculum via des spécimens traités avec des suspensions de conidies ou contaminés par un inoculum de champignon dans un piège attractif (EL-SUFTY et al., 2011; SEWIFY et al., 2009, DEMBILIO et al., 2010. Récemment LLÁCER et al. (2012b) ont avancé la possibilité d'utiliser des mâles stériles irradiés comme vecteur de *B. bassiana* pour le contrôle microbiologique de *R. ferrugineus*.

Différents types de dispositifs « attirer-infecter et relâcher » ont été mis en place pour contrôler les insectes d'importance agricole via des champignons entomopathogènes et ils ont été testés en laboratoire et sur le terrain avec des résultats prometteurs (VEGA et al., 1995 ; KLEIN & LACEY, 1999 ; MANIANIA, 2002; DOWD & VEGA, 2003). Plusieurs études ont utilisé divers systèmes de livraison appâtés avec des substrats contaminés par des champignons entomopathogènes pour le contrôle de différents groupes d'insectes, tels que les pucerons, les coléoptères et les lépidoptères (FURLONG et al., 1995; VEGA et al., 1995; VEGA et al., 2007; KLEIN & LACEY, 1999; HARTFIELD et al., 2001; MANIANIA, 2002; DOWD & VEGA, 2003). Les méthodes d'autocontamination ont généralement utilisé des pièges adaptés aux différents comportements des espèces ciblées, qui attirent les insectes vers les sites d'infection entomopathogènes en réponse à des stimuli environnementaux, sémiochimiques ou alimentaires ; les essais en laboratoire et sur le terrain de ces méthodes sont résumés dans VEGA et al. (2007).

Dans la lutte contre le charançon rouge du palmier, EL-SUFTY et al. (2011) ont récemment testé un piège conçu comme une route à sens unique et composé de deux chambres : une "chambre attrayante" appâtée avec la phéromone d'agrégation du charançon rouge du palmier plus la kairomone du palmier et une "chambre contaminante" contenant une boîte de Pétri avec une formulation séchée de B Conidies de *Bassiana*. Les auteurs n'ont pas obtenu de résultats satisfaisants sur les niveaux de mortalité du charançon rouge du palmier au sein de la population de curculionidés au champ, car la mortalité mensuelle variait de 3,6 à 51,3 % au cours des 14 mois d'étude. De plus, le taux de fréquentation des pièges par les adultes s'est avéré faible (2,84 adultes par semaine).

Dans la présente étude, nous avons testé l'efficacité d'un piège expérimental « attirer-infecter et libérer » pour infecter les adultes du charançon rouge du palmier avec des souches indigènes de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* isolées de *R. ferrugineus*. L'efficacité de la souche la plus virulente dans le transfert de l'inoculum infectieux aux adultes a été testée sur différents substrats de croissance à base de céréales dans des essais biologiques en laboratoire, tandis que sa persistance conidienne ainsi que sa persistance et sa capacité germinative ont été évaluées respectivement en laboratoire et sur le terrain. L'objectif était de développer un dispositif d'autocontamination qui attire et infecte les charançons adultes et qui contient un substrat qui peut maintenir l'infectivité à long terme de l'agent pathogène afin d'infecter avec succès et persistance les coléoptères *R. ferrugineus* à l'appui d'une gestion intégrée du contrôle.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### ÉLEVAGE DE *R. FERRUGINEUS*

Les adultes du charançon rouge du palmier utilisés dans la présente recherche ont été fournis en 2012 par le Laboratoire de gestion durable des agro-écosystèmes UTAGRI ECO ENEA CR Casaccia, Rome (Italie). Avant les bioessais, les adultes ont été maintenus pendant deux semaines sur des morceaux de pommes Golden dans des boîtes en plastique, fermées par un couvercle hermétique dans lequel un trou circulaire a été bouché avec un grillage fin métallique collé au feu. L'élevage des insectes a été réalisé dans une chambre climatique à  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 5\%$  HR, avec une photopériode de 12:12 h (L:D).

## ELEVAGE DE *M. ANISOPLIE* ET *B. BASSIANA*

Pour les essais biologiques, nous avons utilisé des souches de *M. anisopliae* (M.08/I05) et *B. bassiana* (B.09/I01) obtenues à partir d'adultes infectés du charançon rouge du palmier collectés sur des palmiers attaqués en Sicile et dans le Latium respectivement ; ces souches ont montré une virulence élevée envers *R. ferrugineus* lors d'investigations antérieures en laboratoire (FRANCARDI et al., 2012). Ces deux isolats ont été cultivés sur une Sabouraud Dextrose Agar plus 0,25 % (p/v) d'extrait de levure (SDAY) dans des boîtes de Petri et maintenus dans une chambre climatique à  $25^{\circ}\text{C}$ . Les souches de *M. anisopliae* (M.08/I05) et *B. bassiana* (B.09/I01) sont conservées sous forme de cultures séchées congelées dans la collection de champignons entomopathogènes du C.R.A. -Centre de Recherche en Agrobiologie et Pédologie, Florence (Italie).

## PIÈGE EXPÉRIMENTAL

Le piège consiste en un abreuvoir pour poussins en polypropylène (PP) adapté de 3,0 litres, largeur 22,5 cm, hauteur 21,0 cm, avec un réceptacle tronconique (River Systems, Italie). Des trous rectangulaires (4x9 cm) ont été pratiqués avec un couteau incandescent sur les deux côtés opposés du réceptacle pour permettre aux insectes d'entrer/sortir. La surface externe du réceptacle a été peinte avec une peinture acrylique en aérosol en noir (Del Bono Aerosol, Assago, Milan, Italie) car plusieurs études sur l'effet de la couleur sur le piégeage du charançon rouge du palmier ont montré que les pièges noirs ou de couleur foncée sont généralement plus efficace pour capturer *R. ferrugineus* au champ (AL-SAOUD et al., 2010; ABUAGLA & AL-DEEB, 2012). La plaque inférieure à visser a été laissée à la place dans la couleur orange d'origine. Un gobelet à vis (150 ml) percé de deux trous latéraux ovoïdes (3 x 3,5 cm) découpés à la main et fermés par une maille fine métallique collée au feu était suspendu à l'intérieur du réceptacle par un fil métallique accroché à un petit trou pratiqué dans le haut du réceptacle. Le gobelet vissé contenait un mélange de composés attractants constitué de 10 grains de phéromone d'agrégation Rhyfer 220 (Intrachem Bio, Italie) laissés dans le sac en plastique de l'emballage de la phéromone, d'un tube Eppendorf avec un bouchon perforé et de 1 ml d'acétate d'éthyle (10 %) et un morceau de pomme Golden pour simuler une source de nourriture disponible (Fig. 1, 2 et 3). Les pièges expérimentaux ont

été placés séparément à l'intérieur de cages à ossature de bois décrites ci-dessous.

## CAGES

Quatre cages (1x1x1 m) ont été réalisées avec des panneaux de bois, une à la base et une sur le côté opposé à celle ouverte ; Fig GINDIN et al. (2006) pour un milieu solide à base de riz ; 100 g de blé stérilisé ont été transférés dans chacun des 3 erlenmeyers coniques en verre de 200 ml stérilisés : dans un flacon, le milieu de blé a été inoculé avec un bouchon de gélose (environ 4 x 4 x 4 mm) de mycélium sporulé de *B. bassiana* (B.09/I01) et dans un autre flacon avec la même quantité de mycélium sporulé de *M. anisopliae* (M.08/I05) cultivé sur cultures SDAY en boîtes de Pétri ; dans un troisième flacon le blé n'a pas été inoculé (témoin). Les flacons ont ensuite été bouchés avec du coton stérilisé et placés dans une chambre climatique à 27°C. Après 20-25 jours, *B. bassiana* (B.09/I01) et *M. anisopliae* (M.08/I05) avaient sporulé abondamment sur le blé ; le blé inoculé et le blé non inoculé (témoin) ont ensuite été déposés, séparément, sur les plateaux des trois pièges expérimentaux. Des pièges ont été placés dans des cages séparées dans lesquelles 20 adultes du charançon rouge du palmier (10 mâles et 10 femelles) ont été libérés pour se déplacer ou voler pendant 24 h. Les conditions de la salle de laboratoire ont été maintenues à 27°C, environ 60% HR et 12:12 h (L:D). Après 24 h, les adultes ont été retirés et placés individuellement dans des récipients alimentaires en plastique (250 ml) dans lesquels 18 trous d'environ 2 mm de diamètre ont été pratiqués. Les individus ont été nourris avec des morceaux de pomme Golden changés chaque semaine et ont été maintenus dans les mêmes conditions de salle de laboratoire. Le test s'est terminé au bout de quatre semaines. (B). Infectiosité du champignon entomopathogène *M. anisopliae* sur différents substrats.

Sur la base des résultats du test (A), seule la souche *M. anisopliae* (M.08/I05) a été employée. 200 g de blé (100 g inoculés avec *M. anisopliae* (M.08/I05) et 100 g non inoculés comme témoin) et 200 g de riz brun (100 g inoculés avec *M. anisopliae* (M.08/I05) et 100 g non inoculé comme témoin) ont été préparés selon la procédure mentionnée ci-dessus. Les substrats sporulés par les champignons et les témoins ont été transférés sur les plaques de quatre pièges expérimentaux qui ont ensuite été placés à l'intérieur de quatre cages séparées. 40 charançons rouges du palmier adultes (20 mâles et 20 femelles) ont été placés dans chaque cage pendant 24 h. Pour les témoins sans blé ni riz contaminés, 40 adultes du charançon rouge du palmier (20 mâles et 20 femelles) ont été relâchés dans chacune des deux cages pendant la même période. Les conditions d'élevage de la salle de laboratoire ont été maintenues à 27°C, 60% HR et 12:12 h (L:D). Une caméra vidéo a été positionnée derrière les pièges pour surveiller l'acceptation des pièges par le charançon rouge du palmier au cours des 6 premières heures des tests. Après 24 h, les adultes ont été retirés et placés individuellement dans des récipients alimentaires en plastique (250 ml) dans lesquels 18 trous d'environ 2 mm de diamètre ont été pratiqués ; ils ont été élevés comme indiqué en (A). Comme dans (A), le test s'est terminé quatre semaines après les traitements. La mortalité

des adultes de *R. ferrugineus* a été contrôlée quotidiennement. Les spécimens morts de similitude ont été placés individuellement sur du papier filtre humidifié à l'intérieur de boîtes de Petri à température ambiante (20-25°C); seuls les cadavres présentant une croissance externe des champignons entomopathogènes ont été pris en compte dans l'analyse.

## **(C). Persistance des conidies sur substrats contaminés au laboratoire**

24 h après le test (B), les substrats de blé et de riz inoculés avec *M. anisopliae* (M.08/105) ont été maintenus dans les pièges à l'intérieur des cages pendant encore quatre semaines dans les conditions précitées. Le nombre de conidies a été vérifié immédiatement après le test sur 0,2 g de blé et de riz sporulés prélevés au hasard dans les substrats. Chaque grain dans cette quantité a été mis dans 1 ml d'eau distillée et stérile additionnée de 0,1 ml de détergent polysorbate TWEEN 80 (0,1 %) dans un tube en verre ; le tube a été secoué pendant 1 minute dans un mélangeur vortex. La concentration des conidies a été estimée à l'aide d'un hémocytomètre (chambre de comptage THOMA-ZEISS) et exprimée comme la valeur moyenne de 6 coups par grain contenu dans les 0,2 g de substrats infectés. Au début de l'essai, les concentrations moyennes de conidies de *M. anisopliae* (M.08/105) étaient de  $7,1 \times 10^6$  conidies par ml sur le riz et de  $7,5 \times 10^6$  conidies par ml sur le blé.

## **(D). Essai biologique sur le terrain**

*M. anisopliae* (M.08/105) cultivée sur riz a été utilisée dans le test au champ pour la plus grande compacité du substrat, qui pourrait limiter la perte accidentelle de grains du piège. 300 g de riz brun ont été préparés et inoculés avec *M. anisopliae* (M.08/105) selon la procédure mentionnée ci-dessus. 100 g de riz bien sporulé ont été transférés sur les plaques de deux pièges expérimentaux accrochés à des feuillus, l'un en position ensoleillée et l'autre à l'ombre, dans le parc à l'extérieur de notre Centre à Cascine del Riccio, province de Florence (Italie). Pour le contrôle, les 100 g restants de riz sporulé ont été maintenus dans le flacon et placés dans une cellule climatique à 26°C, environ 60% HR et 12:12 (L:D) h.

Les essais sur le terrain ont été effectués à des périodes choisies au hasard pendant les saisons de plus forte abondance du charançon rouge du palmier adulte signalée en Sicile (Italie), c'est-à-dire d'avril à octobre (CALDARELLA et al., 2008). Les périodes d'enquête ont été : au printemps du 13 mai au 16 juin 2011 ; en été du 11 juillet au 15 août 2011 ; en automne du 10 octobre au 14 novembre 2011. Les données climatiques locales ont été extraites du site web 3Bmeteo ([http://www.3bmeteo.com/meteo\\_regione-toscana.htm](http://www.3bmeteo.com/meteo_regione-toscana.htm)).

La concentration moyenne de conidies a été évaluée sur 0,2 g de riz sporulé prélevé au hasard chaque semaine dans chaque piège de terrain et dans le témoin selon la procédure

susmentionnée. Pour l'évaluation de la capacité germinative des conidies, les mêmes suspensions de conidies utilisées pour évaluer les concentrations de conidies ont été diluées à 1:10 avec de l'eau distillée stérile. 40 µl de la suspension conidienne diluée ont été étalés le SDAY dans des boîtes de Pétri de 60 mm. Chaque plaque a été divisée en quatre quadrants et, après incubation à température ambiante (23°-25°C) pendant 20/22 h, le taux de germination des conidies a été déterminé en comptant 100 conidies dans chaque quadrant (400 conidies par plaque). Une conidie avec un tube germinatif plus long que sa largeur était considérée comme ayant germé. La valeur moyenne des quatre lectures a été considérée comme le taux de germination réel de la plaque. Ce test de germinabilité a été réalisé sur trois boîtes différentes par condition expérimentale (adapté de LIU et al., 2003).

Au début du test, les nombres de conidies sur le riz inoculé étaient de  $1 \times 10^7$  conidies par ml au printemps,  $3 \times 10^7$  conidies par ml en été et  $1 \times 10^7$  conidies par ml en automne avec une germination de 95,28%, 59,2% et 58,50% respectivement. Ensuite, la concentration de conidies sur le riz inoculé a été enregistrée une fois par semaine pendant 4 semaines.

## ANALYSES STATISTIQUES

La virulence de *B. bassiana* (B.09/I01) et de *M. anisopliae* (M.08/I05) a été exprimée par la mortalité cumulée (%), l'efficacité du traitement (formule d'Abbott) (ABBOTT, 1925) et la durée létale moyenne (LT 50) après 28 jours de traitement. Les analyses de survie ont été effectuées séparément pour chaque substrat avec le test de Wilcoxon (Gehan) en utilisant SPSS 15.0.

Les données sur la concentration et la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) ont été analysées par ANOVA et le test Tukey HSD ( $P = 0,05$ ). Les valeurs en pourcentage ont été analysées après transformation en coefficients angulaires.

## RÉSULTATS

### ESSAIS BIOLOGIQUES EN LABORATOIRE

(UN). Virulence de *M. anisopliae* et *B. bassiana* *M. anisopliae* (M.08/I05) s'est avéré plus virulent que *B. bassiana* (B.09/I01) ; 28 jours après le contact, la mortalité cumulée des adultes de *R. ferrugineus* contaminés sur blé inoculé avec *M. anisopliae* (M.08/I05) était supérieure (75%) à celle des adultes contaminés sur le même substrat par *B. bassiana* (B.09/I01) (45%). La mortalité cumulée des curculionidés adultes mis en contact avec du blé non inoculé (témoin) était de 25 %. L'analyse de survie (test de Wilcoxon-Gehan) a montré que la mortalité de *R. ferrugineus* infectés par *M. anisopliae* (M.08/I05) était significativement



plus élevée que celle des adultes infectés par *B. bassiana* (B.09/I01) et que celle du contrôle alors que les deux dernières valeurs n'étaient pas significativement différentes l'une de l'autre. L'efficacité du traitement de *M. anisopliae* (M.08/I05) (Abbott) a été la plus élevée (67 %) et la LT 50 du charançon rouge du palmier contaminé a été atteinte en 3 jours. En revanche, la LT 50 des adultes contaminés par *B. bassiana* (B.09/I01) et celle du témoin n'ont pas pu être déterminées après 28 jours (Tableau 1).

#### (B). Infectiosité du champignon entomopathogène *M. anisopliae* sur différents substrats.

Les observations par caméra vidéo du comportement de *R. ferrugineus* dans les pièges ont montré que le piège expérimental appâté était adapté pour attirer les adultes à l'intérieur, les maintenir sur les substrats inoculés et libérer les spécimens infectés. Aucun effet répulsif sur les adultes du charançon rouge du palmier dû à l'abondance des conidies de *B. bassiana* (B.09/I01) et *M. anisopliae* (M.08/I05) cultivées sur substrats de blé et de riz n'a été observé lors des essais. Les premiers curculionidés adultes attirés dans les pièges ont été observés marchant ou creusant des tunnels dans les grains environ 1 h après leur lâcher dans les cages. A la fin des tests (après 24 h), la plupart des adultes se trouvaient à l'extérieur des pièges et leurs corps étaient recouverts de conidies fongiques.

La virulence de *M. anisopliae* (M.08/I05) n'a pas été influencée par les substrats de croissance. La mortalité cumulée des curculionidés était très élevée et similaire (95 %) sur le blé et le riz inoculés, tout comme l'efficacité du traitement (Abbott) (95 %). De plus, le charançon rouge du palmier LT 50 a été atteint à peu près au même moment (en 12 jours sur blé et en 15 jours sur riz). La mortalité cumulée du témoin était de 5 %. L'analyse de survie (test de Wilcoxon Gehan) n'a pas montré de différence significative entre les niveaux de mortalité des adultes de *R. ferrugineus* contaminés sur les deux substrats, alors que les niveaux de mortalité sur ces deux substrats étaient significativement différents de celui du témoin après 28 jours (Tableau 2).

#### (C). Persistance des conidies sur substrats contaminés au laboratoire

La persistance des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) dans les conditions de laboratoire n'a pas varié sensiblement sur le blé inoculé au cours des trois premières semaines (de  $7 \times 10^6$  conidies par ml à  $1 \times 10^7$  conidies par ml) mais a ensuite diminué rapidement à  $5 \times 10^6$  conidies par ml au cours de la dernière semaine. De même, sur le substrat de riz contaminé, les niveaux numériques de conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) étaient constants au cours des trois premières semaines ( $7-8 \times 10^6$  conidies par ml) puis ont chuté à  $3 \times 10^6$  conidies par ml au cours de la quatrième semaine. L'ANOVA n'a pas montré de différence significative entre le nombre de conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) sur le blé inoculé alors que sur le riz les valeurs de la deuxième et de la quatrième semaine étaient significativement différentes les unes des autres (Tableau 3).

## (D). Essais biologiques sur le terrain

La persistance des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) dans des conditions de terrain a montré des fluctuations similaires sur le milieu de riz inoculé dans le piège ensoleillé et ombragé au cours des périodes saisonnières considérées (tableau 4).

Au printemps, du 13 mai au 16 juin 2011, lorsque la température locale était comprise entre 20 et 25°C et que l'humidité relative était de 50 %, la présence de conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) sur le riz inoculé a persisté jusqu'à la troisième semaine dans les deux pièges ensoleillé et ombragé avec une concentration variant de  $1-3 \times 10^6$  conidies initiales par ml à  $1,55 \times 10^7$  conidies par ml dans le piège ensoleillé et à  $2,6 \times 10^7$  conidies par ml dans le piège ombragé, (Tableau 4; Figs. III, IV). En été, du 11 juillet au 15 août 2011, la température locale était d'environ 25 °C et l'humidité relative de l'air était de 60 % et, durant cette période, les conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) ont persisté jusqu'à la quatrième semaine dans les deux pièges de terrain, variant des  $7-8 \times 10^6$  conidies initiales par ml à  $3,1 \times 10^7$  conidies par ml au cours de la quatrième semaine dans les deux pièges (tableau 4, figures V, VI). A l'automne, du 10 octobre au 14 novembre 2011, les conidies de *M. anisopliae* ont persisté pendant la première semaine dans les deux pièges, avec un pic de  $2,1 \times 10^7$  conidies par ml dans le piège ensoleillé lorsque la température locale était d'environ 15 °C et l'humidité relative de l'air. 55% mais la deuxième semaine avec une température inférieure à 15°C, les niveaux numériques des conidies ont chuté rapidement à des valeurs inférieures ( $1,6-2,7 \times 10^6$ ) dans les deux pièges (Tableau 4, Figs. VII, VIII).

Dans la chambre climatique témoin, les teneurs numériques des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) sur le riz étaient toujours supérieures aux valeurs enregistrées dans les pièges de terrain lors des essais de printemps et d'été. L'ANOVA a montré que la persistance des conidies dans le témoin était significativement plus élevée que les valeurs enregistrées à la fois dans le piège ombragé et ensoleillé au printemps et en été, tandis que les valeurs pour le piège ombragé et (tableau 4). Aucune corrélation n'a été trouvée entre les niveaux numériques des conidies dans les pièges et les conditions d'humidité relative sur le terrain ( $R^2 = 0,19$ ), tandis qu'une corrélation plus élevée a été observée entre les valeurs numériques des conidies et la température sur le terrain ( $R^2 = 0,43$ ).

La germination des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) au champ a montré une tendance similaire dans le piège ensoleillé et ombragé au cours des tests de printemps et d'été. En particulier, au printemps, la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) dans le piège ensoleillé a diminué de 95,28 % à 81,17 % au cours des 3 premières semaines, puis est rapidement tombée en dessous de 40 % au cours de la quatrième semaine. Dans le piège ombragé, la capacité germinative des conidies a diminué de 87,92 à 78 % au cours de la même période mais s'est maintenue à un niveau plus élevé la semaine dernière (70,42 %). Chez le témoin, la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) a diminué progressivement de 93,67 à 70 % au cours des quatre semaines (Tableau 5, Fig. IX, 1).

En été, la germination des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) a diminué de 59,25 à 43 % dans le piège ensoleillé et à 48,33 % dans le piège ombragé au cours des 3 premières semaines, mais a augmenté à 59,58 et 60,67 % respectivement au cours de la quatrième semaine. Chez le témoin, la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) variait de 59,25 % à 73,83 % au cours de la quatrième semaine (Tableau 6, Fig. IX, 2).

En automne, la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) dans le piège ombragé a diminué progressivement au cours des quatre semaines, passant de 58,50 à 25,83 %, tandis que dans le piège ensoleillé, la valeur a augmenté à 67,75 % au cours de la deuxième semaine, puis s'est effondré à 21,58% la semaine dernière. Chez le témoin, la germination des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) a augmenté de plus de 70 % au cours de la deuxième semaine et est restée élevée jusqu'à la fin de la deuxième, après quoi la valeur s'est effondrée à environ 4 % (Tableau 7, Fig. IX, 3).

L'ANOVA a montré qu'en général, il n'y avait pas de différence significative entre la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) dans les pièges ensoleillés et ombragés au cours de chaque semaine des périodes considérées. En particulier, aucune différence significative dans la capacité germinative des conidies de *M. anisopliae* (M.08/I05) n'est apparue entre les pièges de terrain et le témoin au cours de la première semaine de chaque essai saisonnier ou de la troisième semaine des essais de printemps et d'été.

## DISCUSSION

Une nouvelle approche dans le contrôle microbiologique des insectes ravageurs est l'utilisation de divers dispositifs attractifs agissant comme un « foyer de micro-organismes entomopathogènes » pour infecter les insectes cibles (VEGA et al., 2007). Cette technique offre les avantages d'une infectiosité sélective au champ, la possibilité de contaminer de nombreux individus, et la perspective de disperser l'inoculum au sein de la population de ravageurs par contact direct entre adultes. En ce qui concerne les champignons entomopathogènes, les facteurs importants pour atteindre ces objectifs sont, entre autres, la disponibilité d'un isolat hautement virulent envers l'insecte cible, l'aptitude à la production massive de spores sur un substrat de contamination approprié, un système de délivrance efficace et la stabilité et la germination de l'inoculum au champ. conditions (IBRAHIM et al., 1999;ZHANG et al., 2011).

Concernant le premier facteur, plusieurs auteurs ont isolé des souches de *M. anisopliae* et *B. bassiana* issues de différentes sources virulentes contre *R. ferrugineus*. En particulier, une souche de *B. bassiana* isolée du charançon rouge du palmier mort en Égypte s'est avérée très virulente envers le curculionide et a été brevetée (EL-SUFTY et al., 2007, 2009;SEWIFY, 2007;SEWIFY et al., 2009). Ceci suggère que l'identification de champignons indigènes entomopathogènes déjà actifs sur le charançon pourrait offrir de meilleures perspectives

pour son contrôle biologique. Cependant, notre étude a démontré différents niveaux de virulence envers les adultes des curculionidés par les champignons entomopathogènes indigènes isolés de *R. ferrugineus* mycosés. En particulier, il a mis en évidence la virulence de *M. anisopliae* (M.08/I05) qui a produit une mortalité cumulée du charançon rouge du palmier (75 %) et une efficacité du traitement (67 %) plus élevées en 28 jours et a provoqué une LT 50 en seulement 3 jours après le traitement. Ces résultats ont confirmé nos études antérieures sur le 62 F. FRANCARDI ET AL. RÉDIA, Vol. XCVI, 2013 Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA ; test de Tukey-HSD,  $P < 0,05$ ).

entomopathogénicité des mêmes souches de *B. bassiana* (B.09/I01) et *M. anisopliae* (M.08/I05) réalisées contre des larves et des adultes de curculionidés infectés sur différents substrats contaminés (Gélose Sabouraud Dextrose (SDA) et blé) (FRANCARDI et al., 2012). Dans ces essais biologiques, la souche *M. anisopliae* (M.08/I05) a montré des valeurs de mortalité cumulée plus élevées contre les adultes (90 %) traités sur blé inoculé et a causé LT 50 en 13,1 jours que sur SDA (mortalité cumulée de 53 % ; LT 50 en 26,8 jours). Diversement, la mortalité des adultes causée par *B. bassiana* (B.09/I01) dans les deux substrats était plus faible (20 %) et non significativement différente du témoin. GINDIN et al. (2006) ont également observé une mortalité élevée (84,6 %) des adultes de *R. ferrugineus* traités avec des spores sèches de *M. anisopliae* provenant d'une culture cultivée après 2 semaines de contact. Les substrats infectieux jouent donc un rôle important dans le succès de tout dispositif d'autocontamination, car ils peuvent déterminer la quantité de spores mises en contact avec l'hôte et la persistance et la capacité germinative de l'inoculum dans le temps. A cet égard, le blé et le riz viennent de prouver qu'ils supportaient avec succès la croissance et la sporulation des champignons entomopathogènes (IBRAHIM & LOW, 1993, SOUNDARAPANDIAN & CHANDRA, 2007 SAHAYARAJ & NAMASIVAYAM, 2008). La présente étude confirme que ces deux céréales sont de bons substrats sporulants et infectieux pour *M. anisopliae* vis-à-vis des adultes du charançon rouge du palmier lors d'essais en laboratoire, comme l'ont également observé GINDIN et al. (2006) et FRANCARDI et al. (2012). Dans d'autres études, DEADMAN et al. (2001) ont infecté avec succès des adultes de charançon rouge du palmier avec 20 ml de pulpe de dattes avec 25 % en volume de mélasse amendée avec 10 g de spores de *B. bassiana* à l'intérieur d'un bol en plastique au-dessus duquel était suspendu un leurre de phéromones ; les adultes contaminés de *R. ferrugineus* présentaient une mortalité de 90 à 100 % dans les 9 à 20 jours suivant le contact. Ces auteurs ont observé l'enfouissement des adultes à l'intérieur du mélange de pulpe de dattes contaminée, suggérant que ce comportement pourrait assurer une infection plus réussie du curculionidé et une transmission de l'inoculum aux coléoptères. Plus récemment EL SUFTY et al. (2011), lors d'essais biologiques en laboratoire, ont enregistré la mortalité de tous les adultes du charançon rouge du palmier laissés dans un piège muni d'une formulation de poudre de conidies séchées (10 %) de *B. bassiana* dans un délai moyen de 8,25 jours à compter du contact.

## Printemps

Notre piège électronique expérimental s'est avéré efficace pour attirer et infecter les charançons rouges du palmier en laboratoire. Le mélange attractant, composé de la phéromone d'agrégation des curculionidés plus des composés alimentaires volatils et de l'acétate d'éthyle, est une formule valable pour augmenter l'attrait pour le charançon rouge du palmier et pour tous les charançons du palmier (GIBLIN-DAVIS et al., 1996; ABDALLAH & AL-KHATRI, 2005; FALEIRO & SATARKAR, 2005; OEHLISCHLAGER, 2005; GUARINO et al., 2010). Dans la présente étude, il a probablement également joué un rôle dans la prolongation du contact avec les conidies pathogènes en stimulant l'activité tunnel à l'intérieur des substrats contaminés à la recherche d'une source de nourriture et/ou en favorisant le comportement cryptique des adultes qui se réfugient généralement entre les pétioles et les bases des ramifications. sur palmiers, comme observé par GINDIN et al. (2006). Ce comportement a également montré l'absence de tout effet répulsif sur les adultes de *R. ferrugineus* par le blé et le riz sporulés par *M. anisopliae*. Dans tous les cas, le résultat final était des adultes sortant du piège à contamination expérimental avec le corps saupoudré de spores (Fig. X). EL-SUFTY et al. (2011) dans un piège à autodissémination appâté avec uniquement la phéromone d'agrégation du charançon rouge du palmier et une kairomone du palmier à données ont enregistré, à la place, une faible attractivité envers le charançon rouge du palmier (2,84 adultes par semaine) dans le champ.

Les conditions environnementales, en particulier la température, l'humidité relative et la lumière UV, peuvent influencer négativement la germination, la persistance et la virulence des spores entomopathogènes, éliminant ou réduisant considérablement l'efficacité des isolats en tant qu'agents de lutte biologique (ZIMMERMANN, 1982 ; MOORE et al., 1996 ; BUTT & GOETTEL , 2000; INGLIS et al., 2001; ZHANG et al., 2011).

Les résultats de la présente étude montrent que la forme du piège expérimental proposé a maintenu la capacité germinative de l'inoculum et des spores de *M. anisopliae* (M.08/I05) assez constante au cours des périodes saisonnières considérées, au cours desquelles il n'y avait pas de différence significative dans le nombre de spores ou la capacité germinative. entre les pièges situés dans des positions ensoleillées et ombragées. L'humidité relative dans le champ ne semble pas affecter les niveaux de conidies et la température semble également avoir peu d'influence. Il s'agit d'un résultat important montrant la capacité de *M. anisopliae* (M.08/I05) à persister dans le champ avec des propagules susceptibles de provoquer des maladies chez l'insecte cible.

Bien que les isolats fongiques présentent une large gamme de tolérance aux facteurs environnementaux, la présente étude a indiqué que la plage de température optimale pour la persistance et la germination des conidies sur le terrain était de 21 à 25°C, tandis que les températures inférieures à 20°C ou supérieures à 28°C nuisent à la capacité germinative des conidies. En revanche, KLEIN & LACEY (1999) ont effectué des tests sur le terrain en août,

avec une température quotidienne moyenne de 26°C et une humidité de 82%, et ont constaté qu'après une semaine, il y avait une diminution d'environ 50 à 34,5% de la capacité germinative de Conidies de *M. anisopliae* diluées avec de la farine de son et placées dans des pièges d'autodissémination pour la lutte biologique contre le scarabée japonais *Popillia japonica* Newman. Nos résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs obtenus dans des essais de laboratoire : EKESI et al. (1999) ont rapporté que la température optimale pour la germination, la croissance et la virulence de quatre souches de *M. anisopliae* était de 25° (gamme 25°-30°C) tandis que la germination s'effondrait à 15° et 35°C. D'autres études ont rapporté de bonnes températures de croissance pour la plupart des Hyphomycètes entomopathogènes originaires d'Europe entre 8° et 30°C, avec des températures optimales entre 20° et 25°C et une croissance inhibée au-dessus de 30°C (Inglis et al. 2001 et références). Une influence négative de la température élevée sur la germinabilité des conidies de *M. anisopliae* a également été rapportée par d'autres auteurs qui ont indiqué des effets limitants entre 30°C et 40°C (MORLEY-DAVIS et al., 1995).

Aux Emirats Arabes Unis EL-SUFTY et al. (2011) ont observé que la survie d'une formulation de poudre de champignon contenant 10 % de conidies de *B. Bassiana*, à l'intérieur d'un piège à autodissémination, restait élevée pendant 4 semaines (89,2-96,5 %) dans une plantation de palmiers dattiers, puis diminuait à 66,7 % pendant le 5<sup>ème</sup>. Aucune donnée sur les conditions climatiques locales n'est rapportée. La germinabilité des conidies du témoin, maintenue dans des conditions de laboratoire (non reportées), est restée au contraire plus élevée jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine puis elle a diminué.

En résumé, notre étude a identifié la *M. anisopliae* indigène (M.08/I05) comme la souche la plus virulente contre les adultes de *R. ferrugineus* et le blé et le riz comme de bons substrats fongiques et infectieux. Les données sur la virulence de *M. anisopliae* (M.08/I05) (mortalité cumulée du charançon rouge du palmier, LT 50, efficacité du traitement) dans les essais biologiques en laboratoire et sur la persistance et la capacité germinative des conidies fongiques dans les conditions de terrain fournissent des informations utiles pour prédire l'efficacité potentielle du considérée comme une souche de *M. anisopliae* dans la lutte biologique contre *R. ferrugineus*. De plus, le piège d'autocontamination semble approprié pour attirer, infecter et libérer les adultes du charançon rouge du palmier et pour préserver la stabilité de l'inoculum fongique dans le champ pendant au moins trois à quatre semaines au printemps et en été. Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour vérifier la transmission de l'inoculum de *M. anisopliae* (M.08/I05) au sein de la population de charançons rouges du palmier afin de fournir un moyen valide de lutte contre *R. ferrugineus* dans le cadre des programmes IPM.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr Silvia Arnone du Laboratoire de gestion durable des agro-

écosystèmes UTAGRI ECO ENEA CR Casaccia, Rome (Italie) pour l'approvisionnement périodique en adultes de *R. ferrugineus*.

La recherche a été soutenue par une subvention du projet national du ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Forêts (MiPAAF) "Protection des palmiers ornementaux et indigènes contre l'invasion biologique du charançon rouge du palmier" -PROPALMA" (D.M. 25618/7301/11, 2012/ 12/01) RIASSUNTO TRAPPOLA CONTAMINANTE CON FUNGHI ENTOMOPATOGENE: UNE STRATÉGIE POSSIBLE DE CONTRÔLE DU RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS (OLIVIER) (COLEOPTERA CURCULIONIDAE)

Una trappola sperimentale "attirer, infecter et libérer le piège" è stata messa a punto per infettare gli adulti del Punteruolo Rosso, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) con funghi entomopatogeni allo scopo di essere impiegata nell'ambito di programmi di lotta integrata. Come isolati fungini sono stati utilizzati ceppi indigeni di *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, ottenuti da adulti di *R. ferrugineus* raccolti in campo. Nei test di laboratorio il tipo di trappola e il blend attrattivo utilizzato sono risultati efficaci nell'attrarre gli adulti del Punteruolo rosso e a trattenerli temporaneamente su substrati di riso e grano inoculati con gli isolati di *B. bassiana* e *M. anisopliae* posti all'interno della trappola. Prove di confronto sulla entomopatogenicità dei due isolati mushroomi, hanno evidenziato la maggiore virulenza dell'isolato di *M. anisopliae* nei confronti degli adulti del curculionide con una mortalità cumulativa percentualmente superiore (75%) a quella osservata per la *B. bassiana* (45%) .

La virulenza del *M. anisopliae* non è risultata influenzata dai diversi substrati di crescita utilizzati, grano e riso , in quanto la mortalità cumulativa degli adulti (95%) e l'efficienza del trattamento (Abbott = 95%) sono stati, in entrambi i casi, molto alti e con un LT 50 raggiunto entro i 15 giorni dall'inizio delle prove. La persistenza e la germinabilità dei conidi dell'isolato di *M. anisopliae* su substrato di riso è stata infine esaminata in condizioni di campo all'interno di trappole situate in posizione soleggiata ed in ombra nel corso di quattro settimane in primavera, estate ed autunno . I risultati hanno mostrato che all'interno delle trappole sperimentali l'inoculo fungino è rimasto più stabile in primavera e in estate che in autunno. Nessuna differenza significativa nella concentrazione dei conidi è stata rilevata fra il substrato di riso inoculato con *M. anisopliae* nella trappola al sole e all'ombra durante i periodi di osservazione in campo.

## Références

ABBOTT W. S., 1925 – A method of computing the effectiveness of an insecticide. - J. Econom. Entomol. 18: 265-267.

BDALLAH F. F., AL-K HATRI S. A., 2005 – The effect of pheromone, kairomone and food

bait on attracting males and females of red palm weevil. - Egypt. J. Agric. Res., 83:169-177.

A BUAGLA A. M., A L-D EEB M. A., 2012 – Effect of bait quantity and trap color on the trapping efficacy of the pheromone trap for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Insect Sci., 12.120. Available online: <http://www.insectscience.org/12.120>.

A L-S AOUD A. H., A L-D EEB M. A., M URCHIE A. K., 2010 – Effect of color on the trapping effectiveness of Red Palm Weevil pheromone traps. - J. Entomol., 7 (1): 54-59.

B UTT T. M., G OETTEL M. S., 2000 – Bioassays of entomogenous fungi. In: A. Navon and K. R. S. Ascher Eds., Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing, UK, pp.141-191.

C ALDARELLA C. G., G RECO C., L O V ERDE G., 2008 – Monitoraggio del Punteruolo rosso nella città di Palermo con l'uso di trappole. In: La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Report 2008 Regione Siciliana. Assessorato Agricoltura e Foreste. Dipartimento interventi infrastrutturali. 1: 65-68.

D EADMAN M. L., A ZAM K. M., R AZVI S. A., K AAKEH W., 2001 – Preliminary investigations into the biological control of the red palm weevil using *Beauveria bassiana*. In: The Second International Conference on Date Palms held at the United Arab Emirates University, 2001

D EMBILIO Ó., Q UESADA -M ORAGA E., S ANTIAGO -Á LVAREZ C., J ACAS J. A., 2010 – Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Invertebr. Pathol., 104: 214-221.

I NGLIS D.G., G OETTEL M.S., B UTT T. M., S TRASSER H., 2001 – Use of Hyphomycetous Fungi for managing Insect Pests. In: Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential, eds T.M. Butt, C. Jackson & N.

Magan, CAB International, pp.23-69.

D OWD P. F..

V EGA F. E., 2003 – Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwinter sites. - Biocontrol Sci. Techn., dissemination of an entomopathogen by the damson-hop aphid *Phorodon humili*. - Biocontrol Sci Techn., 11: 401- 410.

I BRAHIM L., B UTT T. M., B ECKETT A., C LARK S. J., 1999 – The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizum anisopliae*. - Mycol. Res., 103: 901-



907.

I BRAHIM J. B., L OW W., 1993 – Potential of mass production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. - *Int. J. Pest Manag.*, 39(3): 288- 292.

I NGLIS G. D., G OETTEL M. S., B UTT T. M., S TRASSER H., 2001 – Use of Hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T. M., Jackson C., Magan N. Eds. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 23-69.

K LEIN M. G., L ACEY A. L., 1999 – An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the Japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). - *Biocontrol Sci. Techn.*, 9: 151-158.

K REUTZ J., Z IMMERMANN G., V AUPEL O., 2004 – Horizontal transmission of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. - *Biocontrol Sci. Techn.*, 14 (8): 837-848.

L IU H., S KINNER M., B ROWNBRIDGE M., P ARKER B. L., 2003 – Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). - *J. Invertebr. Pathol.*, 82: 139-147.

L LÁCER E., N EGRE M., J ACAS J. A., 2012a – Evaluation of an oil dispersion formulation of imidacloprid as a drench against *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera, Curculionidae) in young palm trees. - *Pest Manag. Sci.*, 68: 878-882.

L LÁCER E., S ANTIAGO -A LVAREZ C. , J ACAS J. A., 2012b – Could sterile males be used to vector a microbiological control agent? The case of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Beauveria bassiana*. - *B. Entomol. Res.*, 103 (2): 241- 250.

M ANIANIA N. K., 2002 – A low-cost contamination device for infecting adult tsetse flies, *Glossina* spp., with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the field. - *Biocontrol Sci. Techn.*, 12: 59-66.

M OORE D., H IGGINGS P. M. , L OMER C. J., 1996 – Effect of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gam and Rozsypal and interaction with temperature. - *Biocontrol Sci. Techn.*, 6: 63-76.

M ORLEY -D AVIS J., M OORE D., P RIOR C., 1995 – Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and range of temperatures. - *Mycol. Res.*,

100 (1): 31-38.

O EHLISCHLAGER C., 2005 – Current status of trapping palm weevils and beetles. - *Planters.* , 81 (947): 123-143.

Q UESADA -M ORAGA E., S ANTOS -Q UIRÓS R., V ALVERDE - G ARCÍA P., S ANTIAGO -Á LVAREZ 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.

Q UESADA -M ORAGA E., M ARTIN -C ARBALLO I., G ARRIDO - J URADO I., S ANTIAGO -Á LVAREZ C., 2008 – Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). - *Biol. Control.*, 47: 115-124.

S AHAYARAJ K., N AMASIVAYAM K. R., 2008 – Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. - *Afr. J. Biotechnol.* ,7 (12): 1907-1910.

S EWIFY G. H., 2007 – Egyptian strain of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. (WO/2007/087813). WIPO Service, World Intellectual Property Organization, 2007

August 9. International publication number WO2007/087813 A2 <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Egyptian-strain-entomopathogenic-fungus-Beauveria/WO2007087813A2.pdf> S EWIFY G. H., B ELAL M. H., A L -A WASH S. A., 2009 – Use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* for the biological control of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). - *Egypt. J. Biol. Pest Co.*, 19 (2): 157-163.

S OUNDARAPANDIAN P., C HANDRA R., 2007 – Mass production of endomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the laboratory. - *Res. J. Microbiol.*, 2: 690-695.

V EGA F. E., D OWD P. F., B ARTELT R. J., 1995 – Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vectors. - *Biol. Control.*, 5: 545-552.

V EGA F. E., D OWD P. F., L ACEY L. A., P ELL J. K., J ACKSON D. M., K LEIN M. G., 2007 – Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In: Lacey L. A. and Kaya H. K., Eds., *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 127-146.

Z HANG L.-W., L IU Y.-J., Y AO J., W ANG B., H UANG B., L I Z.-Z., F AN M.-Z., S UN J.-H., 2011 – Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of

*Dendroctonus valens*. - Insect Science, 18: 209-216.

Z IMMERMANN G., 1982 – Effect of high temperatures and artificial sunlight on the germinability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. - J. Invertebr. Pathol., 41: 36- 40.