

**AFPP – COLLOQUE MÉDITERRANÉEN SUR LES RAVAGEURS DES PALMIERS  
NICE – 16, 17 ET 18 JANVIER 2013**

**EFFICACITE DES NEMATODES POUR LE CONTROLE DU CHARANÇON ROUGE DU  
PALMIER *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS* (OLIVIER, 1790) (COL.;  
DRYOPHTHORIDAE) EN CONDITIONS CONTROLEES DE LABORATOIRE**

M. GALEANO<sup>1</sup>; A.B. GARCIA<sup>2</sup>, M.J. LORENTE<sup>1</sup>, A-I. LACORDAIRE<sup>3</sup>, J.E. BELDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DPT. R&D KOPPERT ESPAÑA, S.L. C/ COBRE, 22-24. PARCELA 14 NAVE 3. POL. IND. CIUDAD DEL TRANSPORTE. 04745 LA MOJONERA (ALMERÍA). ESPAGNE. [mgaleano@koppert.es](mailto:mgaleano@koppert.es); [mjlorente@koppert.es](mailto:mjlorente@koppert.es) [jbelda@koppert.es](mailto:jbelda@koppert.es)

<sup>2</sup>DAP – EMPRESA PÚBLICA DE DESARROLLO AGRARIO Y PESQUERO DE ANDALUCÍA S.A. CALLE CALIFORNIA, 2  
04007 ARMERÍA. ESPAGNE [abgarcia@dap.es](mailto:abgarcia@dap.es)

<sup>3</sup> (traduction) DPT R&D KOPPERT FRANCE, BIOLOGICAL SYSTEMS, 147 avenue des Banquets 84300 Cavaillon  
[ALLacaordaire@koppert.fr](mailto:ALLacaordaire@koppert.fr)

## **RÉSUMÉ**

Le charançon rouge du palmier, *Rhynchophorus ferrugineus* représente une menace pour les palmiers. En effet la larve de ce coléoptère creuse des galeries dans les stipes des palmiers, engendrant la mort du végétal dans un temps très court. La capacité de dispersion de ce nuisible est importante car il peut couvrir de grandes distances. Aussi face à cette menace, la recherche de solutions pour le contrôler est primordiale. En 2007, la société Koppert Espagne, spécialisée dans la protection biologique des cultures, a conduit des essais *in vitro* à l'aide de trois espèces de nématodes entomopathogènes. Les résultats montrent une bonne efficacité de *S.carpocasae* sur les larves de *R.ferrugineus*.

Mots-clés : charançon rouge, nématodes entomopathogènes, lutte biologique.

## **SUMMARY**

### **EFFICACY OF NEMATODES AGAINST *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS* (Olivier, 1790) IN LABORATORY CONDITIONS**

The red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* is a threat to palms. Indeed, the larva of the beetle burrows into the stems of palms, causing the death of the plant in a very short time. Dispersal ability of this pest is important because it can cover large distances. Also this threat, the search for solutions control is paramount. In 2007, the company Koppert Spain specialised in biological crop protection, conducted *in vitro* essays using three species of entomopathogenic nematodes. Down results show good efficiency of *S. carpocasae* on *R.ferrugineus* larvae.

Key words: red palm weevil, entomopathogenic nematodes, biological control.

## INTRODUCTION

*Rhynchophorus ferrugineus* est un coléoptère originaire des zones tropicales du Sud-Est asiatique qui s'attaque aux cocotiers, *Cocos nucifera*. C'est en 1995 qu'il fut décrit pour la première fois en Europe, sur le littoral de la province de Grenade (Espagne), où il attaque les *Phoenix dactylifera* et *P. canariensis* (figure 1). C'est par l'importation continue de palmiers à des fins ornementales que l'expansion de ce ravageur a continué en Espagne (figure 2). Les lignes ci-dessous présentent le travail qui a été réalisé dans les laboratoires de la société Koppert Espagne en 2007, afin d'évaluer, *in vitro*, l'efficacité des nématodes entomopathogènes comme agents de lutte biologique.

**Figure 1:** Dégât sur palmier.  
Damage of palms.



**Figure 2:** Adultes de charançon rouge.  
Adults of Red palm weevil.



## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les essais ont été conduits en laboratoire dans le département de Recherche & Développement de KOPPERT Espagne, à La Mojonera (Almería).

### 1. Elevage de *Rhynchophorus ferrugineus*

Les *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) ont été obtenus de *Phoenix canariensis* infestés, issus de la province d'Almería, grâce à l'équipe de « Delegación d'Agricultura y Pesca » (Délégation pour l'agriculture et le pêche) d'Almería en collaboration avec le "Empresa Pública Desarrollo Agrario y Pesquero, S. L" (Entreprise publique pour l'agriculture et le développement de la pêche). Ainsi que la société de décharge, possédant une autorisation pour recevoir les palmiers infestés ; celle-ci ayant aménagé une zone spéciale à même de recevoir ce type de déchets. De cette zone, des adultes et des nymphes ont été collectés afin de constituer une base pour l'élevage en laboratoire.

Les adultes ont été répartis par sexe puis mis par couple dans des récipients en polypropylène de 100 ml avec des petits trous d'aération dans le couvercle. Dans le contenant il a été ajouté un morceau de canne à sucre d'environ 5 cm de long coupé en deux, qui sert de nourriture et de support pour la ponte, ainsi qu'un filtre en papier humide. Les récipients ont été mis dans une chambre climatique à  $25 \pm 5$  ° C,  $65 \pm 5\%$  HR et 24 heures de photopériodique.

Les nymphes récoltées ont été placées individuellement dans une boîte en polypropylène de 100 ml avec un peu d'humidité provenant de l'intérieur des fibres du palmier. Elles ont été mises dans la chambre climatique dans les mêmes conditions que les couples d'adultes. Les boîtes ont été vérifiées tous les trois jours. Dans des boîtes contenant les adultes, les morceaux de canne à sucre ainsi que les filtres en papier ont été changés. L'humidité des fibres dans les boîtes contenant les pupes était également vérifiée. Ce contrôle a été répété jusqu'à la mort des adultes et pour les nymphes jusqu'à l'émergence de celles-ci. Les adultes issus de l'émergence ont ensuite suivi la même méthodologie que décrite ci-dessus. Tout le processus d'élevage a été fait selon les règles établies par Cabello (1994).

Deux fois par semaine les morceaux de canne à sucre ont été remplacés dans les boîtes contenant les adultes. Les œufs ont alors été enlevés de la canne à sucre, et ils ont été mis dans une boîte de Pétri standard avec un milieu artificiel qui servait d'alimentation aux nouvelles émergences. Un maximum de 30 œufs était disposé par boîte.

Chaque larve qui a émergé a été placée dans un tube Coulter avec de la nourriture (1/3 du volume) pendant 30 jours ; au cours de cette période, elles ont été changées deux fois de tube contenant un milieu nutritionnel frais (tous les 10 jours). Puis les larves, âgées de 30 jours, ont été placées chacune dans un bécher de 100 ml avec un milieu nutritionnel frais. Puis, 15 jours plus tard, elles ont été à nouveau changées de récipient et mises avec un milieu nutritionnel frais et conservées pendant 15 jours.

Ensuite, les larves âgées de 60 jours, (après éclosion des œufs) ont été placées dans un bécher semblable contenant de la fibre de palmier ainsi que 6 cm de corde ("du raphia") afin que les individus arrivent au stade nymphal. L'ensemble a été maintenu humide à l'aide d'un spray d'eau distillée.

À ce stade, l'humidité du matériel a été vérifiée régulièrement afin d'éviter la mort des insectes par dessiccation. Enfin, après 30 à 45 jours dans la chambre climatique, les adultes ont émergé et le cycle était complet.

Les adultes ont été à nouveau triés par sexe puis placés en couple dans des bécchers en polystyrène de 100 ml avec un morceau de canne à sucre et un filtre en papier, afin d'obtenir des œufs et d'augmenter ainsi la population de charançons rouges du palmier.

Pour conserver la population de *Rhynchophorus ferrugineus* obtenue, un milieu nutritif artificiel a été utilisé pour les larves et des morceaux de canne à sucre pour les adultes.

Le milieu nutritif a été constitué d'après le milieu nutritif que préconise Cabello *et al.* (1984) pour élever les espèces de Lépidoptère, dans lequel le conservateur formaldéhyde a été remplacé par du chloramphénicol et de l'acide benzoïque. La composition du milieu nutritif obtenue pour 1000 g est décrite ci-dessous (tableau 1):

**TABLEAU 1:** Composition de la nourriture artificielle donnée au charançon rouge.  
Composition of artificial diet for Red palm weevil.

Ingrédient	QUANTITE	Nom commercial	Fournisseur
Eau distillée	880 ml	-----	-----
Agar	20 g	Bacteriologic Agar	Panreac Química, S.A.
Farine de maïs	50 g	Maizena	Unilever Foods España, S.A.
Germe de blé	50 g	Germen de trigo	Santiveri S.A.
Levure de bière	50 g	Levadura de cerveza	Valens Laboratorios Korott
Acide ascorbique	4,5 g	Ácide ascórbique pour synthèse	Panreac Química, S.A.
Nipagine	1,8 gr	Nipagina	-----
Acide benzoïque	1,8 gr	Ácide benzoïque pour la synthèse	VWR International, S.A.
Estreptomycine	0,1 gr	Estreptomycina Sulfato	Acofarma
Complément vitaminique	15 ml	Hidro Rex Vital aminoácidos	S.P. Veterinaria S.A.

## 2. Nématodes entomopathogènes

Rappel des mécanismes d'action des nématodes entomopathogènes: les nématodes entomopathogènes sont des parasites obligatoires d'insectes. Ils présentent une relation symbiotique avec une bactérie mortelle pour les insectes. Ceci leur confère un énorme potentiel pour être considérés comme des agents de lutte biologique. C'est le 3<sup>ème</sup> stade juvénile qui est infectieux. Le nématode va à la recherche de son hôte pour y libérer, dans le corps de l'insecte, la bactérie qu'il contient, provoquant ainsi la mort de ce dernier en 24-48h, par septicémie (figure 3).

Trois espèces de nématodes entomopathogènes ont été utilisées pour les essais :

- CAPSANEM: *Steinernema carpocapsae*
- LARVANEM: *Heterorhabditis bacteriophora*
- ENTONEM: *Steinernema feltiae*

Le produit commercial contient 50 millions de jeunes nématodes (J3), conditionnés dans un support inerte (figure 4).

Pour préparer les applications, la totalité du conditionnement de 50 millions de nématodes a été mélangé dans 200 ml d'eau distillée, cette eau a été agitée en continu avec une tige de verre, afin de maintenir une répartition homogène des nématodes dans le liquide.

Du volume initial de 200 ml, il a été prélevé 1 ml de la solution afin de compter le nombre de jeunes nématodes/ml et de préparer ensuite les dilutions avec des concentrations de 100, 500 ou 1000 nématodes (J3) par ml (figure 5).

**Figure 3:** nématodes.



**Figure 4:** produit commercial.



**Figure 5:** manipulation au laboratoire.



### 3. Les essais

#### 3.1. Essais d'efficacité avec les différentes espèces de nématodes entomopathogènes sur larves jeunes (7-10 jours) et larves âgées (30 jours): essai A.

L'objectif de cet essai était d'évaluer l'efficacité de trois espèces de nématodes entomopathogènes vis-à-vis des deux stades larvaires du charançon rouge du palmier. L'essai s'est déroulé du 16 juin au 6 juillet 2007, jour du dernier relevé.

Ce sont les spécimens de *R. ferrugineus* issus de l'élevage du laboratoire qui ont été utilisés pour les essais.

L'essai avait une conception complètement aléatoire, les variables étant le type d'agent entomopathogène utilisé pour l'infestation (au stade J3) et l'âge des larves (2 âges) ; la dose appliquée de produit est restée, quant à elle, constante dans toutes les répétitions.

Toutes les larves ont été nourries en fonction de leur taille. Les larves témoins ont subi le même protocole.

Un jour après l'application, les larves de *R. ferrugineus* (jeunes ou vieilles) ont été mises dans un récipient placé dans une chambre climatique. Les conditions étaient les suivantes : la température ( $25 \pm 5/2$  °C), l'humidité relative ( $65 \pm 5/10\%$ ) et la photopériode (0:24 jour/obscurité).

Une fois que la solution de produit préparée à la concentration de 500 J3/ml, des applications de 1 ml de solution de produit ont été réalisées sur toutes les larves. Les larves témoins ont reçu 1 ml d'eau.

Pour les essais, le nombre de spécimens de larves juvéniles (7-10 jours) était de 8 et de 12 pour les vieilles larves (30 jours) ; 1 spécimen représente donc une répétition.

Les larves ont été traitées un jour après avoir été mises dans le récipient afin d'éviter l'accroissement du stress.

### **3.2. Effet dose des différents nématodes entomopathogènes sur différents stades du charançon: essai B**

L'objectif de cet essai était de déterminer la dose la plus efficace (100 J3/ml; 500 J3/ml et 1000 J3/ml) ainsi que l'espèce de nématode la plus performante sur tous les stades du charançon rouge du palmier, ainsi que l'interférence de l'application du produit sur le milieu nutritionnel et le papier humide.

Pour cela, trois essais ont été conduits.

#### **3.2.1. Effet dose contre l'adulte du charançon rouge du palmier.-**

L'objectif de cet essai était de connaître quelle était la dose et l'espèce de nématode entomopathogène les plus efficaces vis-à-vis de l'adulte du charançon rouge du palmier.

L'essai a été réalisé de façon complètement aléatoire, les variables étant le type d'agents entomopathogènes (2 agents testés) utilisés pour l'infestation et la dose de produit appliquée (3 doses).

L'expérimentation s'est conduite dans une chambre climatique, sous des conditions contrôlées de température ( $25 \pm 5/2$  °C), d'humidité relative ( $65 \pm 5/10\%$ ) et de photopériode (0:24 lumière/obscurité).

Tous les spécimens (adultes) ont été mis dans des récipients de 100 ml contenant au fond des filtres en papier humidifiés.

L'expérimentation a été menée du 26 mars au 15 avril 2007.

Toutes les doses de nématodes ont été préparées selon la méthode expliquée au point 2. Un millilitre de solution a été déposé sur chaque adulte. Les adultes témoins sont traités avec 1 ml d'eau.

Le nombre d'adultes par dose et par espèce de nématodes s'élève à 10.

#### **3.2.2. Effet dose contre les larves de charançon rouge du palmier âgées de 30 jours.**

L'objectif de cet essai était de déterminer la dose et l'espèce de nématodes entomopathogènes les plus efficaces sur des larves du charançon rouge du palmier âgées de 30 jours, ainsi que l'interférence de l'application du produit sur le milieu nutritionnel et le filtre en papier humide. L'essai avait une conception complètement aléatoire, les variables étant le type d'agents entomopathogènes (2 agents testés) utilisés pour l'infestation, la dose de produit appliquée (3 doses) et la présence ou non de nourriture (avec papier humide dans ce cas).

L'essai a été conduit dans une chambre climatique, sous des conditions contrôlées de température ( $25 \pm 5/2$  °C), d'humidité relative ( $65 \pm 5/10\%$ ) et de photopériode (0:24 lumière/obscurité).

Toutes les doses de nématodes ont été préparées selon la méthode expliquée au point 2. Les larves ont reçues 1 ml de solution et les larves témoins 1 ml d'eau.

L'étude s'est déroulée du 26 mars au 5 avril 2007 (date à laquelle les derniers spécimens étaient encore vivants). Après leur mort, les larves ont été disséquées afin d'évaluer la présence de nématodes dans les cadavres.

### 3.2.3. Essai dose contre la nymphe du charançon rouge du palmier.

Dans cet essai le but était de déterminer la dose et l'espèce de nématodes entomopathogènes les plus efficaces contre les nymphes.

Comme pour les autres expérimentations, l'essai a été conduit dans une chambre climatique, dans les mêmes conditions. L'essai avait une composition aléatoire avec pour variable l'espèce d'agent entomopathogène utilisée pour l'infestation (2 espèces distinctes), et la dose de produit appliquée (3 doses).

Les nymphes ont été conservées dans une chambre climatique dans les mêmes conditions que dans les autres essais, dans des récipients de 100 ml jusqu'à ce qu'elles émergent et deviennent des adultes.

L'essai s'est déroulé du 18 juin au 18 juillet 2007 ; le dernier jour, le stade de tous les individus a été vérifié (vivant ou mort). Après leur mort, il a été vérifié la présence de nématodes dans les cadavres.

Toutes les doses de nématodes ont été préparées selon la méthode expliquée au point 2. Les individus traités avec les nématodes ont reçu 5 ml de solution. Les témoins ont reçu 5 ml d'eau

Le nombre de spécimens par dose est de 6.

## **4. Essai de survie des nématodes entomopathogènes dans les fibres de coco : essai C**

Dans la dernière partie de ces essais, il a été mesuré quel était le temps de survie des nématodes entomopathogènes contenus dans des différents stades du charançon infestés maintenus dans la fibre de coco.

L'expérimentation a été conduite dans une chambre climatique, dans les mêmes conditions que pour les autres essais. L'essai avait une composition aléatoire avec pour variable l'espèce de nématodes entomopathogènes utilisée pour l'infestation (2 espèces) et le moment de l'application de l'espèce (cf. tableau 2).

Au vu de la période d'application ce sont des adultes et des larves de 30 jours qui ont été introduits dans des récipients de 100 ml.

Les applications de nématodes ont été réalisées du 2 au 16 juillet 2007.

Le nombre d'individus était de 6 par stade/produit/date de l'application. Pour le témoin, les spécimens ont été traités avec 1 ml d'eau.

Après leur mort, les spécimens, ont été contrôlés afin de vérifier la présence de nématodes dans les cadavres.

**TABLEAU 2** : Moment de introduction des spécimens après l'application des nématodes sur les fibres du palmier.

Timing of introduction of the specimens after the nematode application on the palm fiber.

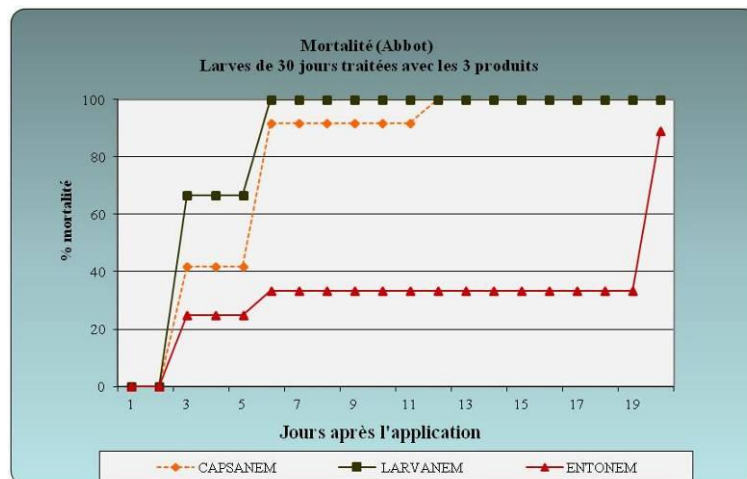
Date	Tn: nombre de jours après l'application de nématodes et de l'introduction des spécimens dans les fibres du palmier
2/7/2007	T0: jour de l'application du produit à base de nématodes
3/7/2007	T 1: 1 jour après l'application
4/7/2007	T 2: 2 jours après l'application
5/7/2007	T 3: 3 jours après l'application
9/7/2007	T 4: 7 jours après l'application
12/7/2007	T 5: 10 jours après l'application
16/7/2007	T 6: 14 jours après l'application

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats montrent des différences d'efficacité entre les trois espèces de nématodes, ainsi que des différences significatives selon la dose et le taux de survie dans le temps sur fibre de coco.

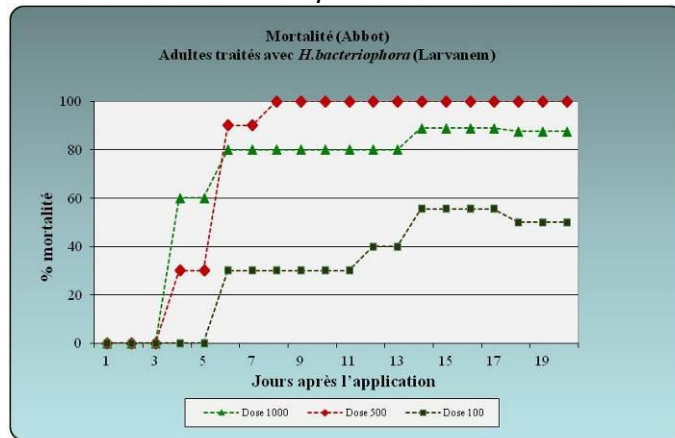
**Figure 6:** Différence d'efficacité entre les trois espèces de nématodes sur larves âgées de 30 jours du charançon rouge du palmier.

Efficiency difference between three species of nematodes on (30 days) red palm weevil larvae.

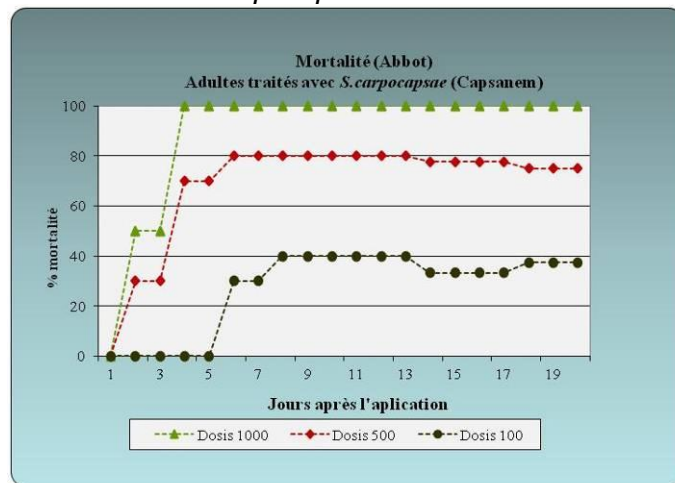




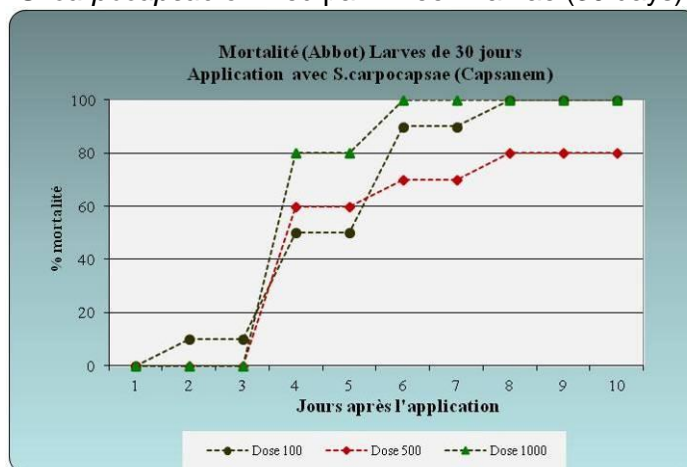
**Figure 7:** Effet dose sur les adultes avec *H. bacteriophora* (Larvanem).  
Dose effect on adults with *H. bacteriophora*.



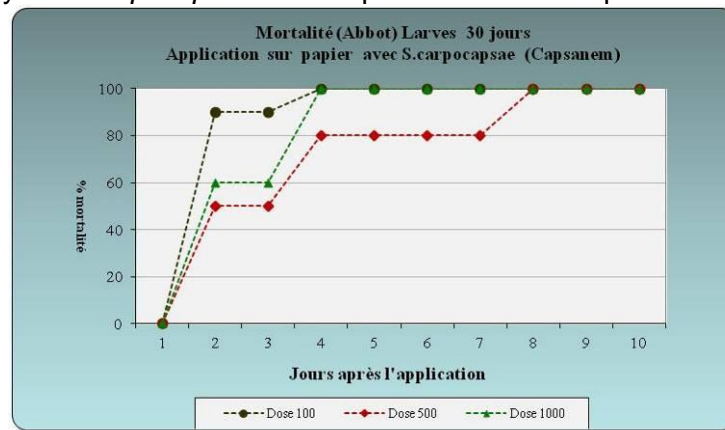
**Figure 8:** Effet dose sur les adultes avec *S. carpocapsae* (Capsanem).  
Dose effect on adults with *S. carpocapsae*.



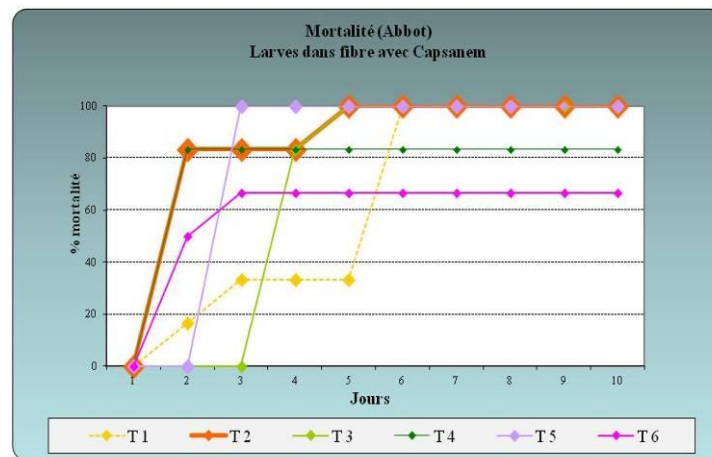
**Figure 9:** Efficacité de *S. carpocapsae* sur larves de 30 jours du charançon rouge.  
Efficiency of *S. carpocapsae* on Red palm weevil larvae (30 days).



**Figure 10:** Efficacité de *S. carpocapsae* sur larves sur papier.  
Efficiency of *S. carpocapsae* on Red palm weevil larvae placed on filter paper.



**Figure 11:** Temps de survie des nématodes dans la fibre de coco.  
Survival time of nematodes in the palm fiber.



*S. carpocapsae* et *H. bacteriophora* sont les deux espèces les plus efficaces dans le cadre des essais. *S. feltiae* semble insuffisant pour le contrôle du stade larvaire de *R. ferrugineus* (figure 6).

Pour le contrôle des adultes, les deux espèces de nématodes *H. bacteriophora* et *S. carpocapsae* sont efficaces avec respectivement 100% d'efficacité à la dose de 500 ind/ml à J+7 et 100% de mortalité à J+3 à la dose de 1000 ind/ml (figures 7 et 8). *S. carpocapsae* a une action plus rapide que celle d'*H. bacteriophora* même à une dose plus faible.

La dose de 1000 ind/ml de *S. carpocapsae* permet de contrôler les larves dans la fibre de coco ; les 100% de mortalité sont atteints à J+7 (figure 9). En absence de nourriture, sur le papier filtre les 100% de mortalité sont atteints à J+4 (figure 10). Il est constaté un effet retard de l'efficacité en présence de fibre de coco.

Les nématodes peuvent survivre plusieurs jours dans les larves infestées et disposées dans la fibre de coco.

Le cycle de développement des nématodes entomopathogènes s'est effectué dans les larves de charançon rouge car elles contenaient des nématodes après les applications et

que les nématodes sortaient des cadavres des larves et des adultes de *R. ferrugineus* (figures 11 et 12).

**Figure 12:** Emergence de larves juvéniles de 3<sup>ème</sup> stade de nématodes d'une larve de charançon rouge.

Emergence of nematodes from the body of Red palm weevil larvae.



## CONCLUSION

Les résultats de ces essais, réalisés en 2007 en conditions contrôlées, ont ouvert des perspectives favorables pour la protection des palmiers vis-à-vis du charançon rouge. Une lutte curative pourrait s'intégrer avec les autres moyens de protection actuellement mis en place. Les nématodes représentent une alternative à la lutte chimique. Des essais complémentaires devraient permettre de confirmer l'action positive des nématodes démontrée dans ces essais *in vitro*.

## BIBLIOGRAPHIE

CABELLO, T.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, P., 1984. Development, longevity and fecundity of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae) reared on eight artificial diets. *Journal of Applied Entomology*, 97: 494-499.

CABELLO, T, 1994. Mantenimiento y Establución de Invertebrados. Actas del III Congreso Nacional de la Sociedad Española para Las Ciencias del animal de laboratorio. SECAL. Granada: 95-100.