

Susceptibilidad de *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) a nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae)

A. MORTON, F. GARCÍA DEL PINO

Otiorhynchus sulcatus es una plaga importante de un gran número de plantas ornamentales y hortícolas, que se alimenta tanto de las hojas como de las raíces, causando daños que afectan tanto al crecimiento como a la calidad de la planta producida.

En el presente estudio se ha evaluado la susceptibilidad de las larvas y pupas de *O. sulcatus* a diferentes nematodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio en placas de Petri y en macetas. Se ha comparado la eficacia de cepas autóctonas frente a cepas comerciales tanto de heterorhabdítidos como steinernemátidos.

En los ensayos realizados en placas de Petri, la exposición de las larvas del insecto a los nematodos *Steinernema feltiae* cepa PA y *S. arenarium* cepa S2 causó una mortalidad moderada (23 y 20 % respectivamente). Los resultados obtenidos con los nematodos *S. arenarium* cepa S2 y *Heterorhabditis bacteriophora* en el control de las pupas fueron, en ambos casos, de un 100 % de mortalidad. El ensayo realizado con plantas de hiedras en maceta se realizó con los nematodos entomopatógenos *S. arenarium* cepa S2 y *H. bacteriophora*. La eficacia de ambos tratamientos resultó ser importante en el control de los adultos (>87 %), y moderado en el control de las pupas de *O. sulcatus* (>33 %).

A. MORTON, F. GARCÍA DEL PINO. Unidad de Zoología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. e-mail: ana.morton@uab.es

Palabras clave: *Otiorhynchus sulcatus*, coleoptera, nematodo entomopatógeno, *Steinernema feltiae*, *S. arenarium*, *Heterorhabditis bacteriophora*, control biológico.

INTRODUCCIÓN

Otiorhynchus (Dorymerus) sulcatus (FABRICIUS, 1775) es un insecto polífago presente en numerosos cultivos, que causa un especial daño en las pequeñas plántulas en crecimiento de los viveros. Tradicionalmente, *O. sulcatus* ha sido un problema importante en los viñedos (BALAWCHOSKY, 1963), y actualmente es una plaga en muchos viveros de plantas ornamentales, como *Cyclamen*, *Taxus*, *Rhododendron*, *Begonia*, *Impatiens* (PAPE, 1977; LA LONE y CLARKE, 1981; MASAKI *et al.*, 1984; MOORHOUSE, 1990; COWLES, 1997; BOFF *et al.*, 2002). Igualmen-

te es una plaga en cultivos hortícolas (como la fresa), en todo tipo de frutales y en olivo, tanto en viveros como en producción (BONNEMAISON, 1976; WESTERMAN, 1998).

Los adultos se alimentan de las hojas, observándose los típicos síntomas de las hojas de la planta dañadas con el borde festoneado (Fig. 1). Se alimentan sobre todo de las hojas más tiernas, invalidando así muchas plantas para su venta. La actividad de los adultos en los viñedos también ha sido asociada con la aparición de virus en las plantas (OCHS, 1960). Sin embargo, los daños más importantes son causados por la larva, que se alimenta de las raíces, comenzando por los



Figura 1. Adulto de *Otiorynchus sulcatus*.

pelos radicales y llegando hasta el tallo. La reducción del sistema radicular se refleja en una baja producción y en plantas de mala calidad. En algunas plantas como el ciclamen, basta una sola larva de otiorrinco para matar toda la planta (MOORHOUSE *et al.*, 1992).

El otiorrinco es un insecto que aparece de forma esporádica, pero cuando lo hace es difícil de controlar (GARCÍA MARÍ *et al.*, 1994). El control químico está dirigido principalmente a los adultos, realizando tratamientos foliares y de suelo con productos insecticidas de ingestión y de contacto, siendo efectivos en los primeros tratamientos, aunque posteriormente pueden aparecer poblaciones resistentes a estos insecticidas (NIELSEN y ROTH, 1985). La eficacia de los insecticidas es parcial debido a que los adultos permanecen durante el día escondidos bajo las macetas, plásticos y materiales de los viveros. Históricamente se ha utilizado un amplio rango de alternativas para controlar esta plaga, como capturas masivas de adultos, plantas de resistencia (NIELSEN y DUNLAP, 1981; DOSS y SHANKS, 1985; SHANKS y DOSS, 1986; GRAHAM *et al.*, 1997), rotación de cultivos (SMITH, 1932), etc., sin conseguir controlarla totalmente.

Los patógenos también han sido utilizados como estrategia de control de estos insectos. Diversos estudios han utilizado hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* para el control de larvas de

otiorrincos (SOARES *et al.*, 1983; ANDERSCH *et al.*, 1990; MOORHOUSE *et al.*, 1992; STENZEL, 1994; KERSHAW *et al.*, 1999). Otros trabajos han estudiado la efectividad de *Bacillus thuringiensis* en las larvas de *O. sulcatus*, aunque no proporciona un control significativo (HERRNSTADT *et al.*, 1986). ANON (1987) también observó que la utilización de virus contra las larvas de *O. sulcatus* tampoco era efectiva.

El estudio de los nematodos entomopatógenos, como agentes de control biológico de los otiorrincos, ha avanzado muy rápidamente en los últimos años. BEDDING y MILLER (1981) observaron que los nematodos parasitan todos los estadios larvarios, la pupa y los adultos recién emergidos. Diversos estudios han demostrado que el género *Heterorhabditis* es más efectivo que el género *Steinernema* (SCHIROCKI y HAGUE, 1997; LONG *et al.*, 2000). Es por ello que existen numerosos estudios de la utilización de heterorhabdítidos para el control de *Otiorynchus sulcatus* (BACKHAUS, 1994; KINOSHITA y YAMANAKA, 1998; WESTERMAN, 1998; KAKOULI-DUARTE y HAGUE, 1999; WESTERMAN, 1999; GEOFRIION, 2000; LONG *et al.*, 2000; BOFF *et al.*, 2001; FITTERS *et al.*, 2001; GILL *et al.*, 2001; TOL *et al.*, 2001; TOMMASINI *et al.*, 2001; BOFF *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de cepas autóctonas de nematodos entomopatógenos, tanto heterorhabdítidos como steinernemátidos, en el control de *O. sulcatus*, comparándolas con cepas comerciales. También se ha evaluado la efectividad de las distintas cepas en los distintos estadios del insecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los diferentes estadios de *O. sulcatus* utilizados en los ensayos procedían de una población que se encontraba atacando plantas de un vivero comercial de hiedras ornamentales en la localidad de Cànoves (Barcelona). Las plantas afectadas fueron llevadas al laboratorio donde se extrajeron e identificaron los individuos encontrados.

Se realizaron ensayos de laboratorio de susceptibilidad de este insecto frente a nematodos entomopatógenos sobre larvas y pupas, así como pruebas de eficacia en macetas.

Los nematodos entomopatógenos utilizados en estos ensayos fueron *Steinernema feltiae* cepa PA procedente de suelo de un cultivo de cerezo (Torrellas del Llobregat, Barcelona), *Steinernema arenarium* cepa S2, de suelo de un cultivo de cerezo (Morgarraz, Salamanca) (GARCÍA DEL PINO y PALOMO, 1995) y la cepa comercial *Heterorhabditis bacteriophora* (e-nema, Raisdorf, Alemania).

Las formas infectivas de las 3 cepas de nematodos fueron reproducidas en el laboratorio sobre larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* siguiendo la técnica de DUTKY *et al.* (1964). Las formas infectivas de los nematodos se guardaron a una temperatura de 4 - 6 °C en agua estéril durante un periodo de 10 a 14 días, comprobando su viabilidad antes de su utilización.

Susceptibilidad de las larvas

Para evaluar la susceptibilidad de las larvas de *O. sulcatus* de último estadio se utilizaron los nematodos *S. feltiae* cepa PA y *S. arenarium* cepa S2. Las cámaras utilizadas para la infección de las larvas consistían en placas de Petri de 50 mm de diámetro con 4,5 g de turba esterilizada. Se añadían los nematodos en 1ml de agua estéril y a continuación se colocaba una única larva por placa, realizando 30 repeticiones por tratamiento y dosis. Se realizó además una serie control donde sólo se añadió agua estéril.

Todas las placas fueron selladas con parafilm y se mantuvieron en una cámara climatizada a una temperatura de 25±2°C, en total oscuridad. Las dosis de nematodos entomopatógenos fueron de 12, 25 y 50 nematodos/cm². Se realizó un seguimiento diario hasta la muerte del insecto o la aparición del adulto. Tras dos días de la muerte del individuo, se procedía a su disección, comprobando la existencia de nematodos entomopatógenos en su interior.

Susceptibilidad de las pupas

Se utilizaron nematodos de las especies *Heterorhabditis bacteriophora* (e-nema) y *Steinernema arenarium* cepa S2.

En placas de Petri de 50 mm de diámetro con arena estéril al 15 % H.R. se añadió 0,5 ml de agua estéril con nematodos. Se introdujo una pupa de *O. sulcatus* por placa, y se selló con parafilm. Todas las placas se mantuvieron a 25±2°C de temperatura y total oscuridad. Se realizaron series de 20 repeticiones para cada tratamiento a una única dosis de 50 nematodos/cm² (dosis recomendada en la cepa comercial), además de una serie control donde solamente se añadió agua estéril.

El seguimiento se hizo diariamente, hasta la muerte del individuo o emergencia del adulto, comprobando en el primer caso la existencia de nematodos entomopatógenos en el interior.

Prueba en macetas

En esta prueba se testaron los nematodos *Heterorhabditis bacteriophora* (e-nema) y *Steinernema arenarium* cepa S2. Se utilizaron plantas de hiedra en maceta con síntomas de estar atacados por *O. sulcatus*. Todas las plantas tenían una edad que oscilaba entre 1 y 1,5 años, y estaban en macetas de 14 cm de diámetro y 1,5 litros de capacidad. Las hiedras pertenecían a las especies *Hedera algeriensis* var. *marengo* y *Hedera helix* var. *hibernica*.

Para cada especie de nematodo se realizaron 30 repeticiones, aplicando una única dosis inicial de 50 nematodos/cm² en 40 ml de agua. En el grupo control se realizaron 23 repeticiones y sólo se aplicó agua. Las plantas se mantuvieron a una temperatura de 25±4°C, y un fotoperiodo de 18 horas de luz y 8 horas de oscuridad, manteniendo un riego diario mediante pulverización. Después de 14 días del inicio de la aplicación, se procedió a analizar las plantas tratadas determinando el número de pupas y adultos, vivos y muertos, encontrados. Debido a que no todos los individuos muertos pueden recogerse al cabo de este tiempo porque, en ese

periodo de tiempo, en muchos casos se han descompuesto y resulta imposible detectarlos, se utilizó la transformación de ABBOT (1925) para calcular el porcentaje de eficacia de cada tratamiento.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el test de Chi-cuadrado para comparar los porcentajes de mortalidad entre los distintos tratamientos y se realizaron análisis de regresión para comprobar la relación entre concentraciones y mortalidad.

RESULTADOS

Susceptibilidad de las larvas

Los porcentajes de mortalidad de los diferentes tratamientos a distintas concentraciones observados a los 6 y 12 días se muestran en el Cuadro 1.

En las Figuras 2 y 3 se muestra el porcentaje de mortalidad a lo largo de los 12 días que duró el ensayo para cada uno de los dos tratamientos testados, *S. feltiae* cepa PA y *S. arenarium* cepa S2.

En el tratamiento con *S. feltiae* cepa PA (Fig. 2) se observa que existen diferencias significativas entre algunas concentraciones en los días 6 y 12, pero no existe relación entre la concentración aplicada y la mortalidad. En el día 12 no se detectan diferencias significativas entre las concentraciones mayor y menor, pero sí entre estas y la intermedia, de 25 nematodos/cm² ($X^2=4,48$, $p<0,01$). Hay que destacar que es la concentración menor, de 12 nematodos/cm², la que alcanza una mayor mortalidad (23,33 %).

En el tratamiento con *S. arenarium* cepa S2 (Fig. 3), no se observan diferencias significativas entre las distintas concentraciones a lo largo del ensayo, alcanzando todas ellas una mortalidad mínima del 20 %.

Al realizar un análisis de regresión para comprobar si existe una relación lineal entre la concentración de nematodos y el porcentaje de mortalidad, se observa que tanto para el tratamiento con *S. feltiae* cepa PA como para el tratamiento *S. arenarium* cepa S2 los datos obtenidos no se ajustan a un modelo de regresión lineal en ninguno de los dos casos ($R^2=0,50$, $p>0,05$; $R^2=0,55$, $p>0,05$, respectivamente).

Susceptibilidad de pupas

Los resultados, reflejados en la Figura 4, muestran la eficacia de los nematodos *S. arenarium* cepa S2 y *H. bacteriophora* (e-nema) en el control de las pupas de *O. sulcatus*. En el día 7, *S. arenarium* cepa S2 alcanza una mortalidad del 100 %, significativamente superior al 75 % obtenido en el tratamiento con *H. bacteriophora* (X^2 , $p<0,05$). Sin embargo, el día 9 esta mortalidad se iguala, no observándose diferencias significativas entre los dos tratamientos (X^2 , $p>0,05$). Es de destacar que al final del ensayo, en los dos tratamientos se alcanza el 100 % de mortalidad de las pupas.

Prueba en macetas

En el Cuadro 2 se muestra el número de pupas y adultos recogidos vivos y muertos al analizar las macetas después de 14 días del inicio del tratamiento.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad de las larvas de otiorrincos en placa de Petri a los 6 y 12 días del inicio del ensayo.

Concentración (nematodos/cm ²)	Tratamientos			
	<i>S. feltiae</i> cepa PA		<i>S. arenarium</i> cepa S2	
	día 6	día 12	día 6	día 12
0	0,00	0,00	0,00	0,00
12	16,67	23,33	6,67	20,00
25	6,67	13,33	13,33	20,00
50	6,67	20,00	16,67	20,00

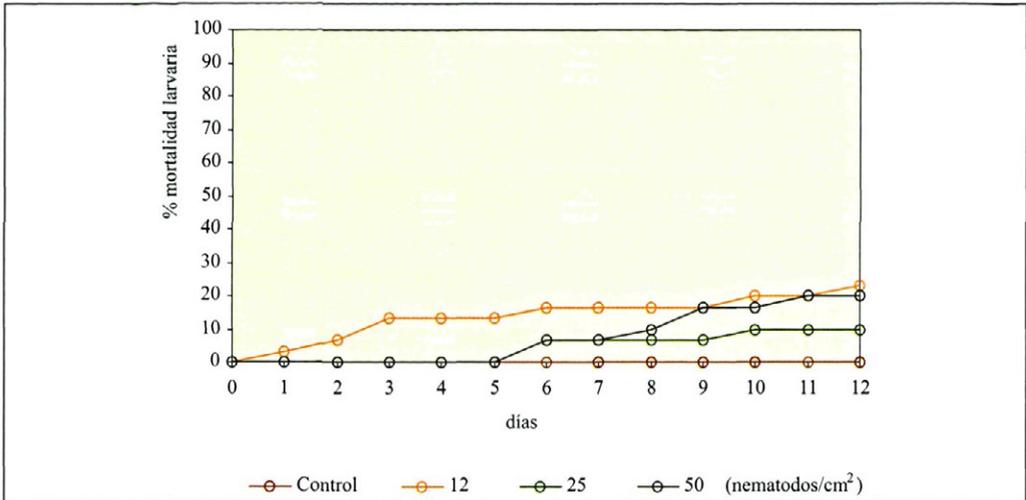


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *O. sulcatus* tratadas con *S. feltiae* cepa PA a tres concentraciones (expresadas en número nematodos/cm²) a lo largo de 12 días de duración del ensayo.

Al comparar los resultados obtenidos por ambos tratamientos, se observa que el porcentaje de eficacia obtenido mediante la fórmula de ABBOT (1925) a las dos semanas del inicio de los tratamientos es del 71,26 % en el caso de *H. bacteriophora* y del 68,97 % en

el caso de *S. arenarium* cepa S2, no detectándose diferencias significativas entre ellos ($X^2, p > 0,05$).

El porcentaje de eficacia sobre las pupas es de 38,9 en el tratamiento con *H. bacteriophora* y 33,33 en el tratamiento con *S.*

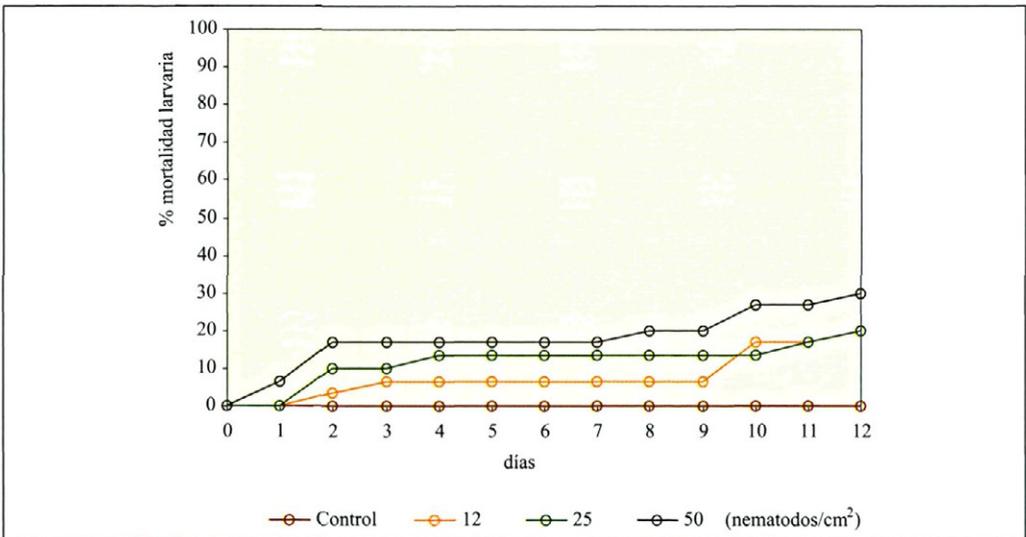


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *O. sulcatus* tratadas con *S. arenarium* cepa S2 a tres concentraciones (expresadas en número nematodos/cm²) a lo largo de 12 días de duración del ensayo.

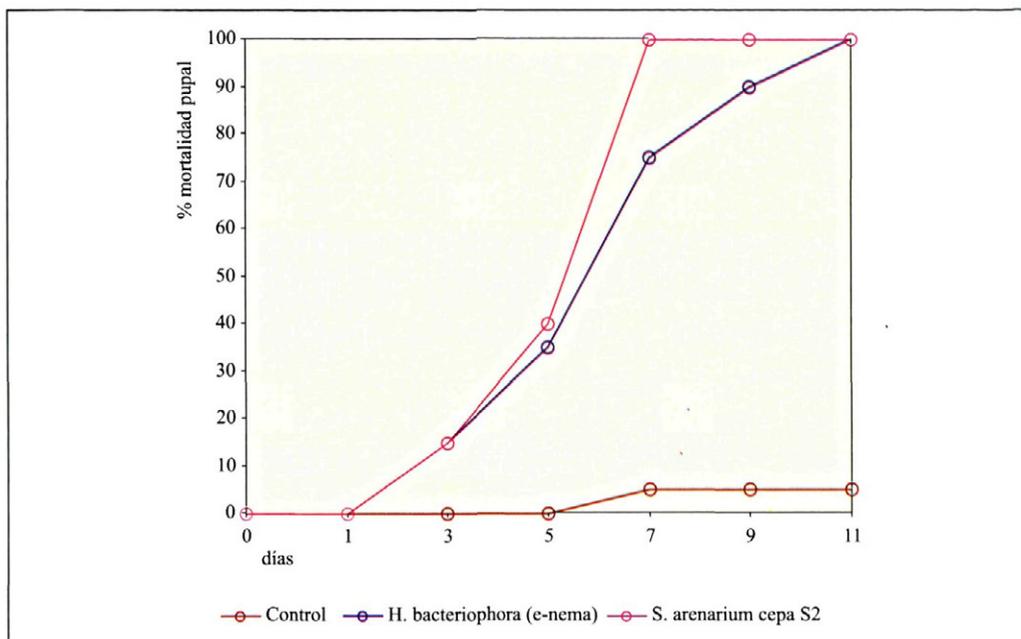


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de las pupas de *O. sulcatus* a lo largo de 11 días de duración del ensayo.

arenarium, mientras que el porcentaje de eficacia sobre adultos es de un 87,5 y un 93,75 en cada tratamiento respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos (X^2 , $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha podido determinar que tanto las larvas como los estadios pupales de *O. sulcatus* son susceptibles de ser parasitados por nematodos entomopató-

genos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae. BEDDING y MILLER (1981) ya observaron que los heterorhabdítidos son capaces de parasitar todos los estadios larvares, la pupa e incluso los adultos recién emergidos de *O. sulcatus*.

Se ha observado una baja efectividad de *S. feltiae* cepa PA en el control de las larvas de este insecto (30 % de mortalidad). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por MOORHOUSE *et al.* (1992), quienes determinaron que *S. feltiae* es una especie muy poco

Cuadro 2.- Efectos sobre *O. sulcatus* obtenidos después de 2 semanas de la aplicación de los tratamientos con nematodos en macetas de hiedras.

Tratamiento	Nº de macetas tratadas	Nº de individuos muertos			Nº de individuos vivos			Nº total de individuos	Porcentaje de mortalidad observada	Porcentaje de Eficacia (Abbot)
		pupas	adultos	total	pupas	adultos	total			
Control	23	0	0	0	18	64	82	82	0,00	-
<i>H. bacteriophora</i>	30	15	8	23	11	8	19	42	54,76	76,83
<i>S. arenarium</i>										
cepa S2	30	2	17	19	12	4	16	35	54,29	80,49

efectiva en el control de las especies del género *Otiorynchus*, mientras que *H. bacteriophora* es más eficaz. Igualmente, KAYA (1990) comprobó que, en general, *H. bacteriophora* es más virulenta para insectos coleópteros que los steinernemátidos.

El presente trabajo demuestra la eficacia de *Heterorhabditis bacteriophora* sobre pupas de *O. sulcatus*. BEDDING y MOLYNEUX (1982) observaron que *H. bacteriophora* tiene la capacidad de poder penetrar en el insecto a través de la cutícula gracias a la presencia de un diente cuticular, por lo que no es necesario que existan en el insecto aberturas naturales. Esta capacidad podría explicar que los nematodos puedan parasitar los estadios pupales de *O. sulcatus*, que no presentan estos orificios. El ensayo realizado aplicando *H. bacteriophora* en macetas con hiedras atacadas por *O. sulcatus* corrobora la eficacia de estos nematodos en el campo.

La eficacia de *S. arenarium* cepa S2 sobre larvas y pupas de *O. sulcatus* difiere de forma importante. La mortalidad producida en las larvas es de un 58 % mientras que en las pupas alcanza el 100 %. La eficacia obtenida en pupas coincide con los resultados obtenidos para *H. bacteriophora*. Ambas especies comparten una misma estrategia de búsqueda del hospedador. CAMPBELL y GAUGLER (1993) demostraron que los nematodos que buscan activamente al hospedador, como *S. riobrave*, *S. arenarium* y *Heterorhabditis* sp., son más efectivos en encontrar hospeda-

dores inmóviles que móviles. Tanto las pupas como las larvas de *O. sulcatus* son estadios poco móviles, con lo que las diferencias de efectividad de *S. arenarium* son difíciles de explicar. Una posible explicación podría ser que el ensayo sobre las larvas se realizó en un substrato de turba, mientras que las pupas se colocaron en arena. El substrato utilizado podría ser un factor importante en la capacidad de encontrar y parasitar al insecto por parte del nematodo. La textura del suelo y su contenido de agua son importantes parámetros abióticos que determinan su eficacia en términos de movilidad de los nematodos (GEORGIS y POINAR, 1983; BARBERCHECK y KAYA, 1991), persistencia (KUNG *et al.*, 1990) y virulencia (MOLYNEUX y BEDDING, 1984). Los suelos arenosos permiten una mayor movilidad de algunos nematodos como *H. bacteriophora* y algunas especies de *Steinernema* (BARBERCHECK, 1992), debido a que se crea un mayor número de espacios intersticiales por donde desplazarse, existe una mayor oxigenación del medio y una menor compactación del substrato que en suelos arcillosos.

La utilización de nematodos entomopatógenos puede ser una buena alternativa de control de *O. sulcatus*, pero para obtener una mayor eficacia en los cultivos de zonas mediterráneas son necesarios futuros estudios de selección de cepas autóctonas, que estén mejor adaptadas a las condiciones extremas del clima mediterráneo.

ABSTRACT

MORTON A., F. GARCÍA DEL PINO. 2005. Susceptibility of *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 243-251.

The black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, is an important pest of ornamental and horticultural plants, attacking leaves and roots. The damage is reflected in reduced growth and production, and lower plant quality.

In this study we evaluated the susceptibility of *O. sulcatus* larvae and pupae to entomopathogenic nematodes under laboratory conditions in Petri dishes and pots. The efficacy of endemic strains was compared to commercial strains of heterorhabditids and steinernematids.

In Petri dish assays, insect larvae exposed to *Steinernema feltiae* strain PA and *S. arenarium* strain S2 gave moderate levels of mortality (23 % and 20 % respectively). The nematode species *S. arenarium* strains S2 and *Heterorhabditis bacteriophora* were equally effective, showing high mortality (100 %) to pupae. These strains were used in

pot assays of ivy plants. The efficacy of both treatments resulted in the high control of adults (>87 %), and in the moderate control of *O. sulcatus* pupae (>33 %).

Key Words: *Otiiorhynchus sulcatus*, coleoptera, entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, *S. arenarium*, *Heterorhabditis bacteriophora*, biological control.

REFERENCIAS

- ABBOT, W.S., 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**, 265-267.
- ANDERSCH, W., J. HARTWIG, P. REINCKE y K. STENZEL, 1990. Production of mycelial granules of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of soil pests. En: *Proceedings and Abstracts*. Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, pp. 2-5.
- ANON, 1987. Control of vine weevil (*Otiiorhynchus sulcatus*). An Foras Talúntais Horticultural Research Report, pp. 73-74.
- BACKHAUS, G., 1994. Biological control of *Otiiorhynchus sulcatus* by use of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Acta Horticulturae* (ISHS) **364**, 131-142.
- BALACHOWSKY, A.S., 1963. En: *Entomologie Appliqué à L'Agriculture*. Tome I. Coléoptères. Second Volume, pp. 874-1237.
- BARBERCHECK, M.E. y H.K. KAYA, 1991. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environmental Entomology*, **20**: 538-589.
- BARBERCHECK, M.E., 1992. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. Biological Control Workshop, **91**: 539-547.
- BEDDING, R.A. y L.A. MILLER, 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus*, in potted plants. *Annals of Applied Biology*, **99**: 211-216.
- BEDDING, R.A., y A.S. MOLYNEUX, 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*, **28**: 334-359.
- BOFF, M.I.C., G.L. WIEGERS y P.H. SMITS, 2001. Host influences on the pathogenicity of *Heterorhabditis megidis*. *BioControl*, **46**: 91-103.
- BOFF, M.I.C., R.H.W.M. VAN TOL y P.H. SMITS, 2002. Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots and insect larvae. *BioControl*, **47**: 67-83.
- BONNEMAISON, L., 1976. *Enemigos naturales de las plantas cultivadas y forestales* (Tomo II). Ed. Oikos-Tau (Barcelona), pp. 147-148.
- CAMPBELL, J.F. y R. GAUGLER, 1993. Nivation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour*, **126**: 155-169.
- COWLES, R.S., 1997. Several methods reduce insecticide use in control of black vine weevils. *Frontiers of Plant Science*, **49**(2): 2-4.
- DOSS, R.P. y C.H. SHANKS JR., 1985. Effect of age on the feeding pattern of the adult black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **78**: 322-325.
- DUTKY, S.R., J.V. THOMPSON y G.E. CAMPBELL, 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Invertebrate Pathology*, **6**: 417-422.
- FITTERS, P.F.L., R. DUNNE y C.T. GRIFFIN, 2001. Vine weevil control in Ireland with entomopathogenic nematodes: optimal time of application. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, **40**(2): 199-213.
- GARCÍA DEL PINO, F. y A. PALOMO, 1995. A new strain of *Steinernema anomali* (Kozodoi, 1984) from Spain. En: Ecology and transmission strategies of entomopathogenic nematodes. Report EUR 16269, pp. 110-111.
- GARCÍA MARÍ, F., J. COSTA y F. FERRAGUT, 1994. Plagas Agrícolas. Phytoma-España, pp. 205.
- GEOFFRION, R., 2000. Troisième colloque international sur le charançon "de la vigne", *O. sulcatus*. *Phytoma*, **524**: 9-11.
- GEORGIS, R. y G.O. POINAR, 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoplectana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, **15**: 329-332.
- GILL, S., J. LUTZ, P. SHREWSBURY y M. RAUPP, 2001. Evaluation of biological and chemical control methods for black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae), in container grown perennials. *Journal of Environmental Horticulture*, **19**(3): 166-170.
- GRAHAM J., GORDON, S.C. and MCNICOL, R.J., 1997. The effect of the CpTI gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae). *Annals of Applied Biology*, **131**: 133-139.
- HERRNSTADT, C., G.S. SOARES, E.R. WILCOX y D.L. EDWARDS, 1986. New strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran insects. *Bio-technology*, **4**: 305-308.
- KAKOULI-DUARTE, T. y N.G.M. HAGUE, 1999. Infection, development, and reproduction of the entomopathogenic nematode *Steinernema arenarium* (Nematoda: Steinernematidae) in the black vine weevil *Otiiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematology*, **1**(2): 149-156.
- KAYA, H.K., 1990. Soil ecology. En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (Eds. Gaugler, R. y H.K. Kaya) CRC Press, Boca Raton, pp. 93-116.
- KERSHAW, M.J., E.R. MOORHOUSE, R. BATEMAN, S.E. REYNOLDS y A.K. CHARNLEY, 1999. The role of des-

- truxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, **74**: 213-223.
- KINOSHITA, M. y S. YAMANAKA, 1998. Development and prevalence of entomopathogenic nematodes in Japan. *Japanese Journal of Nematology*, **28**: 42-45.
- KUNG, S.P., R. GAUGLER y H.K. KAYA, 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, **55**: 401-406.
- LA LONE, R.S. y R.G. CLARKE, 1981. Larval development of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) and effects of larval density on larval mortality and injury to rhododendron. *Environmental Entomology*, **10**: 190-191.
- LONG, S.J., P.N. RICHARSON y J.S. FENLON, 2000. Influence of temperature on the infectivity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to larvae and pupae of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematology*, **2**(3): 309-317.
- MASAKI, M., K. OHMURA y F. ICHINOHE, 1984. Host range studies of the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius)(Coleoptera: Curculionidae). *Applied Entomology and Zoology*, **19**: 95-106.
- MOLYNEUX, A.S. y R.A. BEDDING, 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica*, **30**: 358-365.
- MOORHOUSE, E.R., 1990. The potential of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* as a microbial control agent of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. PhD dissertation. University of Bath. UK.
- MOORHOUSE, E.R., A.K. CHARNLEY y A.T. GILLESPIE, 1992. A review of the biology and control of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of Applied Biology*, **121**: 431-454.
- NIELSEN, D. G. y DUNLAP, M. J., 1981. Black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*): reproductive potential on selected plants. *Annals of the Entomological Society of America*, **74**: 60-65.
- NIELSEN, D.G. y J.R. ROTH, 1985. Influence of potting media on toxicity of bendiocarb and carbofuran to first instar black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**: 742-747.
- OCHS, G., 1960. Test on the transmission of three viruses of vines by mites and insects. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*, **47**: 485-491.
- PAPE, H., 1977. Plagas de las flores y de las plantas ornamentales. Ed. Oikos-Tau (Barcelona), pp 193-195.
- SCHIROCKI, A. y N.G.M. HAGUE, 1997. Evaluation of UK heterorhabditids and steinernematids for the control of the black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*). *Test of Agrochemicals and Cultivars*, **18**: 46-47.
- SHANKS, C.H. JR. y DOSS, R. P., 1986. Black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition on leaves of weevil-resistant and -susceptible strawberry clones presented in various quantities. *Environmental Entomology*, **15**: 1074-1077.
- SMITH, F.F., 1932. Biology and control of the black vine weevil. USDA Technical Bulletin, 325. Department of Agriculture. 45 p.
- SOARES, G.G., Jr., M. MARCHAL y P. FERRON, 1983. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) at two different temperatures. *Environmental Entomology*, **12**: 1886-1890.
- STENZEL, K., 1994. Biological control of *Otiorhynchus sulcatus* with *Metarhizium anisopliae*. *Acta Horticulturae* (ISHS), **364**: 143-144.
- TOL, R.W.H.M. VAN, A.T.C. VAN DER SOMMEN, M.I.C. BOFF, J. VAN BEZOOIJEN, M.W. SABELIS y P.H. SMITS, 2001. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecology Letters*, **4**(4): 292-294.
- TOMMASINI, M.G., M. FUNARO, S. MONTEMURO, V. FALCO y M.L. PALERMO, 2001. IPM and biocontrol for strawberry in Southern Italy: The POM project's pilot trials. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura*, **63**(1): 43-47.
- WESTERMAN, P.R., 1998. Penetration of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. into host insects at 9 and 20°C. *Journal of Invertebrate Pathology*, **72**: 197-205.
- WESTERMAN, P.R., 1999. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**: 206-213.

(Recepción: 31 mayo 2004)

(Aceptación: 24 enero 2005)