



Foto 1. Adulto de *Curculio nucum*.

Los nematodos entomopatógenos, un potencial agente de control biológico del diabló del avellano *Curculio nucum* (Coleoptera, Curculionidae)

Los nematodos entomopatógenos son un agente de control biológico utilizado en el control de numerosas plagas de insectos, de gran importancia económica, que se desarrollan en diferentes hábitats. Los mayores éxitos se han alcanzado contra plagas que habitan en el suelo o en el interior de galerías producidas en las plantas, donde los nematodos encuentran una mayor protección para su supervivencia, frente a los factores ambientales adversos. El diabló de los avellanos, *Curculio nucum* (Foto 1), es una plaga cuyas larvas se desarrollan en el interior de las avellanas y al finalizar su desarrollo salen del fruto para hibernar enterradas en el suelo. Este comportamiento determina que sea muy difícil su control con los medios que se disponen actualmente. En este trabajo se presentan diversos estudios realizados para analizar la potencialidad de los nematodos entomopatógenos en el control de esta importante plaga de los avellanos.

Fernando García del Pino* Ana Morton y Laia Batalla-Carrera

Unitat de Zoologia, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona.

*Fernando.Garcia@uab.cat

Mercè Rovira

IRTA-Mas Bové. Constantí.

Anna Aymami y Gonçal Barrios

Servei d'Agricultura i Sanitat Vegetal de Tarragona. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. Generalitat de Catalunya.

Frederic Mallol

ADV Associació pel Desenvolupament Rural de les Muntanyes de Prades.



Figura 1. Zonas de producción y presencia del avellano en España.



Foto 2. Cultivo de avellano en Cataluña.

Introducción

El cultivo del avellano (*Corylus avellana* L.) ocupa en España una superficie de 12.806 ha de plantaciones regulares (2017), localizadas principalmente en Cataluña y concretamente en la provincia de Tarragona (con un 82% de la producción nacional). Existen también pequeñas plantaciones en Aragón, Castilla y León, Comunidad Valenciana, Navarra, País Vasco, Rioja y en el norte de Cataluña (Girona) (MAPA, 2018). El avellano se encuentra también, aunque de forma silvestre, en Asturias, Navarra, País Vasco, Canarias, Castilla y León y la Comunidad Valenciana (Figura 1).

Durante muchos años, España ha sido el cuarto país productor de avellana a nivel mundial después de Turquía, Italia y EEUU (Tous y col., 2001). Sin embargo, actualmente ocupa el octavo lugar con 15.300 t de avellana en cáscara en 2016 (FAOSTAT, 2018), debido a la pérdida de superficie del cultivo en España, pero también a la creciente importancia de otros países productores como Azerbaiyán, Georgia, Irán, Chile y China. La explotación del cultivo en nuestro país data de mediados del siglo XIX (Baiges y col., 2012). La causa de su expansión fue debido al arranque de viñas afectadas por la filoxera, así como por la creciente importancia del comercio de frutos secos. Es por ello que la presencia actual del avellano en Cataluña, como cultivo

tradicional, cumple una importante función económica y social, a la vez que una clara función medioambiental, actuando frente a la erosión de los suelos, ayudando a la lucha contra incendios y salvaguardando el material genético autóctono de este cultivo (Foto 2). Por este motivo, si continua la drástica disminución de su superficie en las zonas tradicionales de producción de avellanas, provocará numerosos efectos negativos desde el punto de vista medioambiental, rural, social y económico.

Para conseguir la viabilidad del cultivo y mantener la estructura económica y social que genera, se han de buscar nuevas perspectivas de producción y comercialización. Una de ellas es la producción de avellana ecológica, que permita obtener un producto diferenciado con un considerable valor añadido. En la actualidad hay una demanda creciente de productos ecológicos y entre ellos de avellana, tanto para el consumo directo, como el consumo de productos elaborados. Al mismo tiempo, el desarrollo de esta producción ecológica permitirá mantener el interés del cultivo, especialmente en zonas de montaña.

En la actualidad en Cataluña, de las 11.609 ha dedicadas al cultivo del avellano, 2.444,64 ha están dedicadas al cultivo integrado (CCPI, 2018) y 425,21 ha al cultivo ecológico (Consell Català de la Producció Agrària Ecològica CCPA, comunicación personal 2018).

Una de las razones que impiden la expansión del cultivo ecológico del avellano es la presencia de algunas plagas que en la actualidad no tienen resuelto su control con los métodos permitidos en la producción ecológica, limitando por tanto su desarrollo.

Este cultivo contiene una rica entomofauna que vive en su vegetación, de la que sólo algunos insectos y ácaros pueden en la actualidad constituirse como plaga, pudiendo provocar una pérdida de cerca del 60% de la producción potencial (Aliniaze, 1998). Entre ellos destacan los ácaros, como el eriófido *Phytoptus avellanae*, que afecta a las yemas, y los tetránquidos *Eotetranychus carpini*, *Tetranychopsis horridus*, *Tetranychus urticae* y *Panonychus ulmi*, que afectan a las hojas; los lepidópteros como *Zeuzera pyrina*, *Archips rosana* y *A. xylosteana*; los homópteros como *Myzocallis corylii*, *Corylobium avellanae* y *Eulecanium coryli*; los heterópteros como *Pantilius tuniatus*, *Palomena prasina* y *Nezara viridula* (con menor incidencia); o los coleópteros como *Cerambyx cerdo*, *Melolontha melolontha* (ambos con poca incidencia) y *Curculio nucum*, que afecta a los frutos. Todas estas plagas pueden provocar, en mayor o menor medida, pérdidas en el cultivo, requiriendo diferentes estrategias de lucha para su control (Barrios, 1997).

Tradicionalmente, el coleóptero *Curculio nucum*, conocido como 'dia-

transferencia tecnológica

| frutales |

bló', se ha considerado la principal plaga que afecta a la avellana. La lucha contra este curculiónido ha sido la clave para entender la evolución fitosanitaria del cultivo (Barrios y col., 2014). En este sentido, se considera interesante explicar brevemente la historia de su gestión fitosanitaria, como un ejemplo de la necesidad de conocer y respetar el complejo equilibrio de los organismos que viven en él, con el objetivo de evitar intervenciones que puedan dañarlo, sea cual sea el sistema productivo.

Antiguamente, la lucha contra el diabló se basaba en sacudir las ramas de madrugada para recoger los adultos en mallas y quemarlos. En los años 40 empieza la lucha química con productos a base de arsénico y aceites de alquitrán, y posteriormente aparecen los clorados que fueron sustituidos por el carbaril (carbamato). En los años 60, en plena efervescencia de la lucha química, se incrementan los ataques del badoc, ácaro eriófito que afecta a las yemas. Al mismo tiempo, un nuevo producto aparece en el ámbito del cultivo, el endosulfán, que marca este periodo por controlar con eficacia las dos plagas (diabló-badoc), pero que provoca la aparición de otras plagas secundarias como los ácaros tetraníquidos. A principios de los años 80 se produce un cambio socioeconómico en las zonas más productivas de avellana de Tarragona, en la cuenca del río Francolí, que favorece la agricultura a tiempo parcial. Paralelamente, los agricultores aumentan las incorporaciones de los abonos nitrogenados, incrementándose las plagas y por tanto la utilización de los productos fitosanitarios, creyendo equivocadamente que sería la solución para la buena sanidad del cultivo. En ese momento se generaliza la utilización masiva del monocrotofos, que, si bien era eficaz para el control del badoc, del diabló y de los pulgones y presentaba también efecto acaricida sobre los tetraníquidos, era un producto muy poco selectivo y de una alta toxicología, lo cual provocó un contundente desequilibrio y la incidencia de plagas que no estaban presentes hasta entonces, como *Z. pyrina*, *A. rosana*, *A. xylosteana* y *E. coryli*. Esta nueva situación obligó a tomar medidas excepcionales de control, incluyendo tratamientos aé-



Foto 3. *C. nucum* alimentándose sobre una avellana.

reos sobre 5.500 ha para frenar su incidencia (Barrios y col., 2011).

El desarrollo de la producción integrada de la avellana requirió buscar métodos alternativos a la utilización de productos químicos de elevada toxicidad para la lucha contra estas plagas, que se especifican en las normas técnicas correspondientes. (DOGC nº 3744 de 21/10/2002).

Actualmente, el desarrollo de la producción ecológica reclama la búsqueda de alternativas a los productos químicos de síntesis para el control de estas plagas. Para muchas de ellas ya se cuenta con estrategias de control biorracional o biológico como la confusión sexual con feromonas para el control de *Z. pyrina*; la utilización de biopreparados como *Bacillus thuringiensis* contra *Archips* sp.; la protección y el incremento de la fauna auxiliar, parásitos de huevos como *Trichogramma cacoeciae* y depredadores del género *Allothrombium* también con acción sobre huevos de *Archips* sp.; depredadores como los pájaros insectívoros con gran eficacia sobre *Z. pyrina* y *Archips* sp., o los fitoseidos *Typhlodromus philatus*, *Typhloctonus tiliarum*, *Amblyseius andersoni*, *A. californicus* y *Kampimodromus aberrans* para ácaros tetraníquidos (MAPA, 2015). En este cultivo también es esencial la utilización de medidas culturales como una buena gestión del abonado nitrogenado para reducir la incidencia de los pulgones y *E. coryli* (Barrios y col., 2011). No obstante, la plaga clave del cultivo,

para la cual no se dispone de ningún agente de control biológico, y por lo tanto limita en gran medida el desarrollo de la producción ecológica, sigue siendo el diabló *C. nucum* (Foto 1).

Curculio nucum, es un coleóptero de la familia Curculionidae que hiberna enterrado en el suelo de los avellanos afectados. Los adultos emergen del suelo desde principios de abril a principios de julio. Estos adultos jóvenes empiezan a alimentarse de flores, frutos en formación u hojas tiernas. Hacia el mes de mayo, pasan a alimentarse en el cultivo picando las avellanas tiernas (Foto 3). Los adultos requieren de cuatro a ocho semanas para madurar sexualmente (Torrás, 1978), por lo que las primeras puestas aparecen desde finales de mayo a principios de junio. La puesta la realizan las hembras perforando la avellana con las mandíbulas situadas en el extremo del rostro y posteriormente introducen un huevo por fruto con el ovipositor, pudiendo poner cada una entre 25 y 30 huevos a lo largo de su vida (Foto 4). El huevo eclosiona a los 8-10 días (Foto 5). La larva neonata excava una galería en el interior de la avellana de la cual se alimenta, completando su desarrollo en un mes (Foto 6). Generalmente, las avellanas afectadas caen prematuramente cuando la larva ha completado su desarrollo (Foto 7). La larva madura realiza un orificio circular en la cáscara, por donde saldrá para enterrarse a una profundidad que varía entre 5 y 30 cm, dependiendo de las caracte-



Foto 4. Hembra introduciendo un huevo en el fruto con el ovipositor.



Foto 5. Huevo de *C. nucum*.



Foto 6. Larva de *C. nucum* en el interior de la avellana.



Foto 7. Larva de último estadio de *C. nucum* saliendo de la avellana.

terísticas del suelo. La larva realiza un capullo de tierra donde pasa un primer invierno en forma de larva. En la primavera siguiente se transforma en pupa (Foto 8) y aparece el adulto que pasará un segundo año de hibernación en el interior del capullo terroso que había realizado la larva, para emerger a la primavera siguiente (Maeso y col., 1988; Tóth, 1984; Bel-venner y col. 2009).

Curculio nucum afecta a muchas zonas avellaneras de Europa y de Turquía. Se ha descrito su presencia en España (Nonell, 1921), Francia (Breisch y col. 2008), Italia (Paparatti y Speranza, 2005; Viggiani, 1994), Polonia (Gantner, 2001), Rumania (Ioachim y Bobarnac, 1977), Serbia (Milenkovic y Mitrovic, 2001) y Turquía (Tuncer y Ecevit, 1997). La dis-

tribución de *C. nucum* está parcialmente determinada por las diferentes variedades de avellano, en relación al grosor y dureza de la cáscara del fruto (Germain y Sarraquigne, 2004; Botta y Valentini, 2018) y la altitud a la que éstos están plantados. Así, las plantaciones de avellanos situadas a mayor altitud, que corresponden con una agricultura de montaña, como es la zona productora de avellana de las Muntanyes de Prades (Tarragona), son más susceptibles a sufrir ataques de *C. nucum* que aquellas situadas a menor altitud (Tuncer y Ecevit, 1997). En Cataluña, el total de cultivo de montaña de avellano, donde el control biológico de *C. nucum* adquiere una especial importancia al tratarse normalmente de zonas protegidas de gran interés ecológico representa el

20% de la producción de avellana en Cataluña (Baiges y col., 2012).

Actualmente, la lucha contra este insecto se centra en los tratamientos químicos contra adultos para evitar la picada alimenticia y, sobre todo, la picada de puesta (SSV. Tarragona). Pucci (1992) demostró que, sin estos tratamientos, se alcanzan unas pérdidas del 30% al 40% de la producción (Foto 9). Debido a la importancia de los daños que ocasiona esta plaga, actualmente se hace necesaria la aplicación de insecticidas, siendo clorantniliprol, deltametrin y lambda cihalotrin las materias activas autorizadas a día de hoy por el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura. Es por ello que, si se pretende desarrollar una producción ecológica de avellanas, es



Foto 8. Pupa de *C. nucum* en el interior de la cámara pupal realizada en el suelo.



Foto 9. Avellanas afectadas por la plaga.

imprescindible buscar alternativas a estos productos químicos de síntesis. Debido al ciclo que presenta *C. nucum*, cuyas larvas y adultos pasan un largo periodo de tiempo enterradas bajo tierra, los nematodos entomopatógenos podrían ser una alternativa adecuada para su control biológico.

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) de los géneros *Steinernema* (Familia: Steinernematidae) y *Heterorhabditis* (Familia: Heterorhabditidae) son patógenos letales de insectos. Su éxito como agentes de control biológico de plagas radica, entre otros aspectos, en que mantienen una relación simbiótica con una bacteria que es altamente virulenta para los insectos. Las dos familias de nematodos, aunque no relacionadas filogenéticamente, tienen muchas características comunes. En ambos géneros (*Steinernema* y *Heterorhabditis*) existe un tercer estadio juvenil de vida libre (Foto 10) que transporta, en el interior de su tubo digestivo, una bacteria del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente. Estas formas juveniles infectivas tienen la boca y el ano cerrados, por tanto no se alimentan mientras buscan un posible hospedante. Cuando las formas infectivas encuentran un insecto adecuado, entran en su interior a través de la boca, el ano o los espiráculos respiratorios, dirigiéndose posteriormente al hemocele del insecto. Algunas especies también pueden penetrar a través de la cutícula del insecto, como es el caso de

los nematodos del género *Heterorhabditis*, utilizando un diente cuticular que poseen en su región oral. En el hemocele del insecto las formas infectivas liberan las bacterias que transportan en el interior de su intestino. Las bacterias proliferan en la hemolinfa y provocan la muerte del insecto por septicemia en 24 a 48 horas. Los nematodos se alimentan de las bacterias que han digerido los tejidos del hospedador, crecen, se desarrollan en formas adultas y se reproducen. Se pueden producir una o más generaciones de nematodos dentro del cadáver del insecto, dependiendo de la disponibilidad de alimento. Cuando los nematodos consumen todo el alimento en el interior del insecto, se producen nuevas formas infectivas que salen del cadáver para buscar un nuevo insecto que parasitar (Foto 18).

Los NEPs han demostrado su eficacia en el control de numerosas plagas que se desarrollan en el suelo, debido a que es éste el hábitat natural de estos nematodos, siendo, por tanto, el que proporciona las mejores condiciones para las interacciones nematodo-insecto (Klein, 1990). En este contexto, existen diversos estudios sobre la utilización de NEPs en el control de diversas plagas del género *Curculio*, cuyas larvas pasan largos periodos de su ciclo biológico enterradas en el suelo. La mayoría de ellos han sido realizados en EEUU para el control de *Curculio caryae*, plaga del pecano (*Carya illinoensis*) (Shapiro-Llan, 2001a,

2001b, 2003; Shapiro-Llan y col., 2003a, 2003b, 2004, 2005). También existen algunos estudios, aunque en menor número, sobre la eficacia de los NEPs contra *C. elephas*, que ataca a bellotas y castañas (Kepenekci y col., 2004; Vicinguerra y Clausi, 2006; Picoaga y col., 2008b; Karagoz y col., 2009) y sobre *C. glandium*, que ataca a bellotas (Vicinguerra y Clausi, 2006). Los estudios sobre NEPs relacionados con el diabló del avellano, *C. nucum*, se centran en los trabajos realizados en España por García del Pino y col. (2009), García del Pino y Morton (2010) y Santamaría y col. (2009), así como en el trabajo realizado en Alemania por Peters y col. (2005).

En este artículo presentamos los resultados más relevantes de diferentes trabajos que hemos realizado sobre el estudio de la eficacia de los NEPs en el control de *C. nucum*. Concretamente, analizaremos la importancia de la presencia de poblaciones nativas de NEPs en campos de avellanos de Cataluña con diferentes sistemas de producción (convencional, integrado y ecológico). También expondremos algunos de los resultados de los trabajos de Batalla-Carrera y col. (2014 y 2016) sobre la virulencia de estas especies nativas de NEPs y las vías de entrada de los nematodos en las larvas y los adultos del diabló del avellano (*Curculio nucum*) y finalmente evaluaremos la eficacia de los nematodos contra esta plaga en condiciones de campo (Batalla-Carrera y col., 2013).

Material y métodos

Presencia natural de NEPs en plantaciones de avellanos

Para valorar la presencia natural de NEPs en plantaciones de avellanos de Cataluña, se muestrearon un total de 295 plantaciones con problemas de *C. nucum*. De ellos, 63 correspondían a producción convencional, 142 a producción integrada, 10 a producción ecológica, 50 a campos de avellanos abandonados y 30 a extensiones de avellanos en estado silvestre no cultivados.

De cada plantación se tomaron cuatro muestras de suelo separadas entre sí una distancia de 2 a 4 m. Cada muestra consistía en cuatro submuestras que se tomaron, con ayuda de una pequeña pala de jardinería, alrededor de un avellano a una distancia de 1-1,5 m del tronco y sobre una extensión de terreno de 10 x 10 x 25 cm de profundidad, recogiendo un volumen aproximado de 250 cc de tierra. Por tanto, cada muestra constaba de un volumen de 1.000 cc. Las cuatro muestras de cada campo se mezclaron enérgicamente en un recipiente de plástico, retirando las piedras, ramas, hojas y otras fracciones de mayor tamaño, y se recogió un volumen final de 1.000 cc, el cual se introdujo en una bolsa de plástico y se llevó al laboratorio para su posterior análisis.

Los NEPs se aislaron mediante el método del insecto-trampa (Bedding y Akhurst, 1975). Para ello, en el laboratorio se colocaron 50 cc de tierra en cinco placas de Petri y en el interior de cada una de ellas se introdujeron cinco larvas de último estadio de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae). Las placas de Petri se mantuvieron a una temperatura de 25 °C durante un periodo de siete días. Al final de este periodo se procedió a desenterrar las larvas. La obtención de los NEPs se realizó de los cadáveres de los insectos desenterrados que mostraron síntomas de infección. Los nematodos se extrajeron mediante la técnica de *White trap* (Kaya y Stock, 1997).

Los nematodos así aislados se mantuvieron sobre larvas de último estadio de *G. mellonella*. Una vez aislado y purificado el cultivo del nematodo, las formas infectivas se conservaron en solución acuosa, en frascos de



Foto 10. Formas infectivas de los nematodos entomopatógenos.

cultivo celular, a una temperatura de 8 °C hasta el momento de su utilización en los ensayos de virulencia.

Evaluación de la virulencia de los NEPs

Las larvas de último estadio de *C. nucum* utilizadas para realizar los experimentos se obtuvieron directamente de avellanos recogidas de campos de cultivo ecológico atacados por este insecto. Las larvas así recogidas se guardaron en tierra, previamente esterilizada, a una temperatura entre 10-15 °C hasta el momento de su utilización. Los adultos se recogieron de campos de cultivo de avellano, realizando vareos y *frappage*. Los adultos así recogidos se mantuvieron en el laboratorio, con fragmentos de manzana como fuente de alimento, hasta el momento de ser sometidos al ensayo.

Los experimentos sobre la susceptibilidad de las larvas de *C. nucum* se desarrollaron en pequeños vasos de plástico (3-4 cm de diámetro y 3,5 cm de profundidad) llenos de tierra previamente esterilizada (10% de humedad p/p) donde se introdujo una única larva (Foto 11). Se evaluaron los aislados que mostraron más virulencia sobre las larvas de *G. mellonella*: cinco aislados de la especie *Steinernema feltiae* (D37, D108, D113, D114, D245), uno de *S. affine* (D66), uno de *Steinernema*

sp. (D122) y uno de *Heterorhabditis bacteriophora* (DG46), todos ellos encontrados en campos de avellanos, y un aislado de *S. carpocapsae* (B14) de la colección de cepas de NEPs de la Unidad de Zoología de la Universitat Autònoma de Barcelona. La dosis utilizada en los tratamientos fue de 50 nematodos/cm². Se realizaron cuatro réplicas de diez vasos por tratamiento (cepas de nematodos) y cuatro réplicas más para el control. El experimento se repitió dos veces. A los siete y catorce días después del tratamiento se evaluó la eficacia de las diferentes cepas de nematodos.

Los experimentos para analizar la virulencia de los nematodos sobre los adultos de *C. nucum* se realizaron en placas de Petri de 5,5 cm de diámetro con 23 g de tierra estéril, donde se les suministraba un pequeño trozo de manzana como alimento. Los nematodos que se utilizaron fueron *S. feltiae* (D144), *Steinernema* sp (D122), *S. carpocapsae* (B14) y *H. bacteriophora* (DG46). La dosis utilizada fue de 50 nematodos/cm². Las placas se mantuvieron a 25°C en oscuridad. El control de la mortalidad se realizó a los catorce días. El experimento se diseñó con tres réplicas de diez placas por cada tratamiento (especie de nematodo) y el control.



Foto 11. Vaso de plástico con una larva de *C. nucum* donde se realizaban los ensayos de susceptibilidad a los nematodos.



Foto 12. Larva atada por la mitad del abdomen para evaluar las vías de entrada de los nematodos al interior de las larvas.

Evaluación de las vías de entrada de los NEPs

Para evaluar las vías de entrada preferentes (boca o ano) de los NEPs en las larvas de *C. nucum*, previamente a su exposición a los nematodos, las larvas fueron atadas con un cordón de algodón fuertemente apretado por la mitad del abdomen (entre los segmentos abdominales 6 y 7) (Foto 12). Este procedimiento impedía que los nematodos que entraban por la parte anterior de la larva pudiesen migrar a la posterior y viceversa. Las larvas atadas fueron expuestas a una concentración de 100 nematodos/cm² de *S. carpocapsae* (B14) y *Steinernema feltiae* (D114) en placas de Petri de 5 cm de diámetro durante 48 horas. Después de este periodo, todas las larvas fueron lavadas intensamente y disecionadas para comprobar la presencia de nematodos en el interior de las dos mitades. Los controles consistían en larvas atadas sin la presencia de nematodos. Se realizaron un total de quince larvas por tratamiento y cada tratamiento se repitió cinco veces.

Para evaluar la entrada en los adultos se utilizaron tubos Eppendorf de 1ml. Se realizó un pequeño orificio en la tapa del tubo por donde se pasaba el rostrum de los adultos y se pegaba con SuperGlue3 (Loctite, Henkel adhesives SL) (Fotos 13-14). En el interior del tubo se introducía arena donde se aplicaban los diferentes nematodos. Para exponer la boca a los nematodos, los adultos se colocaban

con la boca dirigida hacia el interior del tubo donde se encontraba la arena con los nematodos (Foto 15), y para exponer el ano y los espiráculos los adultos se colocaban con el cuerpo dentro del tubo y la boca dirigida al exterior (Foto 16). La dosis de nematodos aplicada fue de 157 nematodos/tubo (200 nematodos/cm²) y los adultos fueron expuestos a los nematodos únicamente durante tres horas. Se utilizaron un total de treinta adultos (quince machos y quince hembras) por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Evaluación de la eficacia de los NEPs en condiciones controladas de campo

Los ensayos se realizaron en dos plantaciones de avellanos de producción ecológica (Hortals y Mallola) situados en las Muntanyes de Prades (Tarragona). Los nematodos utilizados para estos ensayos fueron los mismos que se utilizaron para el ensayo anterior de virulencia en el laboratorio: *S. feltiae* (D144), *Steinernema* sp. (D122), *S. carpocapsae* (B14) y *H. bacteriophora* (DG46).

Los experimentos se realizaron en tubos de plástico (12 cm de diámetro, 40 cm de longitud) con abertura por la parte inferior para facilitar el drenaje del agua y tapados por la parte superior con una malla para evitar la posible emergencia de los adultos de *Curculio* (Foto 17). Los tubos fueron colocados debajo de los avellanos

a una distancia de 2 m del tronco y llenados con suelo procedente de la propia plantación de avellanos siendo mantenidos en estas condiciones durante nueve meses. Los experimentos se llevaron a cabo durante dos años. Se realizaron dos ensayos diferentes para evaluar la eficacia de los NEPs en el control de *C. nucum*. En el primero los nematodos se aplicaron en verano, mientras que en el segundo la aplicación de los nematodos se realizó en primavera.

Ensayo I. Aplicaciones de verano.

Este ensayo se diseñó para determinar la eficacia de los tratamientos con nematodos cuando se aplican en el suelo durante el verano, al generar una barrera que permita el ataque de las larvas de *Curculio* que penetran en el suelo para iniciar la hibernación. Se realizaron tres tratamientos diferentes que corresponden a las tres especies de nematodos: *S. feltiae* (D144), *Steinernema* sp (D122) y *H. bacteriophora* (DG46). Los nematodos se aplicaron a una dosis de 5×10^5 nematodos m⁻² (5.655 nematodos/tubo) en 10 ml de agua por tubo durante la última semana de agosto. La aplicación se realizó al atardecer para evitar los efectos adversos de las altas temperaturas y la radicación UV sobre los nematodos. Un día después de la aplicación de los nematodos se introdujeron en la superficie de cada tubo quince larvas de último estadio de *C. nucum*, para permitir su enterramiento. Los controles sólo recibieron agua. Se realizaron



Fotos 13, 14, 15 y 16: Adultos atrapados en tubo Eppendorf para evaluar las vías de entrada de los nematodos al interior de los adultos.

diez réplicas por cada tratamiento y el experimento se repitió en dos años consecutivos.

Ensayo II: Aplicaciones de primavera. Este tratamiento tenía como objetivo analizar si los nematodos son capaces de localizar y matar los individuos hibernantes cuando ya están enterrados en el suelo. En este caso, durante la última semana de agosto, se depositaron larvas de último estadio de *C. nucum* en la superficie de los tubos para que se introdujeran en el suelo. Siete meses después (última semana de marzo) los nematodos fueron aplicados con la misma metodología que en el tratamiento de verano.

En ambos tratamientos, siete meses después de la aplicación de los nematodos, los tubos se llevaron al laboratorio para determinar la eficacia de los tratamientos mediante el re-

gistro de las larvas que continuaban vivas en su interior.

Resultados y discusión

Presencia natural de NEPs en plantaciones de avellanos

De las 295 muestras de suelo analizadas, únicamente se han detectado NEPs en quince muestras, que corresponde al 5,1% del total de muestras analizadas (Tabla 1). La presencia de NEPs en suelos de avellanos en Cataluña es similar a la obtenida en otros cultivos por Morton y García del Pino (2009), quienes encontraron un 5,2% de muestras de suelo con nematodos en campos de frutales de hueso, o con los resultados obtenidos por Campos Herrera y col. (2007), que encontraron un 5,4% de muestras positivas en La Rioja. Sin embargo, estos resultados son valores menores a los obtenidos por Gar-



Foto 17. Tubos de plástico utilizados en los ensayos en condiciones controladas de campo.

cía del Pino y Palomo (1996), quienes registraron un 23,3% de las muestras de suelo de diferentes hábitats (cultivos, prados y bosques) en localidades de Cataluña con NEPs. En el presente estudio se han aislado nematodos de las dos familias de NEPs (Steinernematidae y Heterorhabditidae), detectando mayoritariamente nematodos steinernemátidos (93,3%) y en menor grado nematodos heterorhabdítidos (6,6%). Estos resultados coinciden con los obtenidos por García del Pino y Palomo (1996), que aislaron un 94% de steinernemátidos y un 6% de heterorhabdítidos en diferentes hábitats de Cataluña.

Su distribución en función del tipo de producción se puede observar en la Tabla 1. Los nematodos fueron aislados en cuatro de los cinco tipos de campos de avellanos muestreados. La máxima presencia de NEPs se dio en los avellanos silvestres no cultivados (26,7% de muestras positivas) y en avellanos de producción ecológica (10%), seguido por campos de avellanos abandonados (4%) y avellanos en producción integrada (2,8%). Cabe señalar la baja presencia de NEPs en el conjunto de los cultivos de avellanos, con un 2,6% (7 muestras positivas de 265 analizadas) y muy especialmente en el cultivo de avellano convencional, donde no se obtuvo ninguna muestra con NEPs de las 63 muestras analizadas. Posiblemente el continuo uso de productos fitosanitarios en este tipo de cultivo puede limitar la presencia de los NEPs, bien por el efecto negativo directo sobre los nematodos o, especialmente en el caso de los herbicidas, por generar un suelo sin cubierta vegetal que da lugar a un hábitat no propicio para su presencia.

Evaluación de la virulencia de los NEPs

La mortalidad de las larvas del diabló expuestas a los NEPs se muestra en la Figura 2. La mortalidad causada por steinernemátidos osciló entre el 10% (cepa Sa D66) y el 79% (cepa Ssp D122) (Foto 18) y la cepa de heterorhabdítido alcanzó un 61,2% de mortalidad (Foto 19). Estos resultados nos permiten discriminar a la especie de nematodo *S. affine* (D66), que manifestó una baja virulencia sobre las larvas de *C. nucum*

Tabla 1. Número de muestras de suelo recogidas en avellanos con diferentes sistemas de producción y presencia de NEPs.

Sistema de producción	Nº de muestras	% de muestras	% de muestras con nematodos	% de muestras con nematodos
Integrada	142	48,1 %	4	2,8 %
Convencional	63	21,4 %	0	0 %
Ecológica	10	3,4 %	1	10 %
Abandonada	50	16,9 %	2	4 %
Silvestre	30	10,2 %	8	26,7 %
TOTAL	295	100 %	15	5,1 %

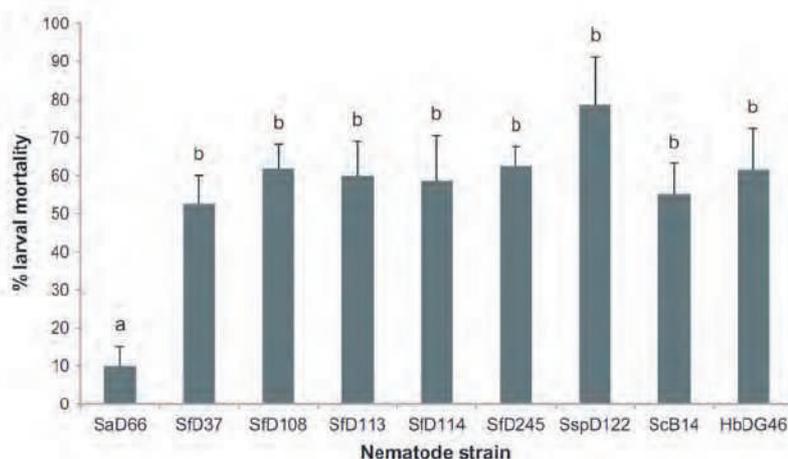


Figura 2. Mortalidad de larvas obtenida por las diferentes cepas de nematodos entomopatógenos: SaD66: *S. affine* (D66), SfD37: *S. feltiae* (D37), SfD108: *S. feltiae* (D108), SfD113: *S. feltiae* (D113), SfD114: *S. feltiae* (D114), SfD245: *S. feltiae* (D245), SspD122: *Steinernema* sp. (D122) y HbDG46: *H. bacteriophora* (DG46).

de las especies de nematodos más virulentas: *S. feltiae* (D113, D114, D245), *Steinernema* sp. (D122) y *H. bacteriophora* (DG46). Estos últimos nematodos fueron los seleccionados para poder realizar posteriores estudios relacionados con el control de las larvas.

La mortalidad de los adultos causada por los NEPs se puede observar en la Figura 3. Podemos ver que, aunque las cuatro especies de nematodos ensayadas son capaces de infectar los adultos de diabló (Foto 20), no todas tienen la misma virulencia. Las cepas que manifestaban una mayor virulencia sobre las larvas: *S. feltiae* (SfD114), *Steinernema* sp. (SspD122) y *H. bacteriophora* (HbDG46), sobre los adultos no tienen el mismo efecto, alcanzando mortalidades que oscilan entre el 10% y el 22%. Sin

embargo, la cepa ScB14 de *S. carpocapsae*, que sobre las larvas obtenía unas mortalidades discretas (57%), sobre los adultos genera una mortalidad del 100%.

Evaluación de las vías de entrada de los NEPs

La nula mortalidad de los controles con larvas atadas, pero sin nematodos, indica que la metodología ha resultado eficaz para valorar la vía preferente de entrada de los nematodos en las larvas de *C. nucum*. Los resultados obtenidos indican que, tanto en el caso del nematodo *S. carpocapsae* como en el caso de *S. feltiae*, la mayor entrada se realizaba por la parte posterior del cuerpo de las larvas (91,7% y 97% respectivamente) (Fotos 21 y 22), mientras que por la parte anterior únicamente se



Foto 18. Larva de *C. nucum* parasitada por *S. feltiae*



Foto 19. Larva de *C. nucum* parasitada por *H. bacteriophora*.

encontraron nematodos en el 16,7% de *S. carpocapsae* y en el 44% de las larvas infectadas por *S. feltiae*. Cabe señalar que en dos individuos infectados por *S. carpocapsae* y en once infectados por *S. feltiae* se encontraron nematodos tanto en la parte anterior como en la posterior de la larva. Estos resultados muestran claramente que el ano es la principal vía de entrada de *S. carpocapsae* y *S. feltiae* en las larvas de *C. nucum*. Otros autores también han demostrado que el ano es la principal vía de entrada en especies como *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromycidae) (LeBeck y col., 1993) y *Musca domestica* (L) (Diptera: Muscidae) (Renn, 1998). Sin embargo, Koppenhöffer y col. (2007) observaron que en larvas de diferentes especies de gusanos blancos (Coleoptera Scarabaeidae) la entrada de otras especies de NEPs como *S. glaseri* y *S. scarabaei* era igual por la boca que por el ano.

En el caso de los adultos, el pegado del *rostrum* con SuperGlue3 tampoco causó ningún efecto negativo en la supervivencia de los adultos. Los resultados también mostraron que los nematodos penetran mayoritariamente en los adultos de *C. nucum*, cuando se exponen el ano y los espiráculos (55% para *S. carpocapsae* y 20% para *S. feltiae*) mientras que, si se expone sólo la boca, la mortalidad disminuye al 15% en el caso de *S. carpocapsae* y al 0% en el caso de *S. feltiae*. Al igual que ocurría con las



Foto 20. Adulto de *C. nucum* parasitado por *Steinernema* spp.

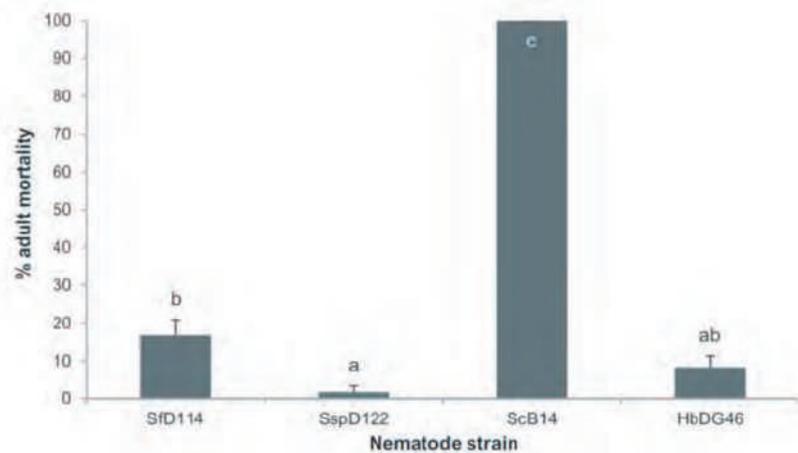


Figura 3. Mortalidad de adultos obtenida por las diferentes cepas de nematodos entomopatógenos: SfD114: *S. feltiae* (D114), SspD122: *Steinernema* sp. (D122), ScB14: *S. carpocapsae* (B14) y HbDG46: *H. bacteriophora* (DG46).



Fotos 21 y 22: Larva infectada por nematodos que han entrado por el ano.

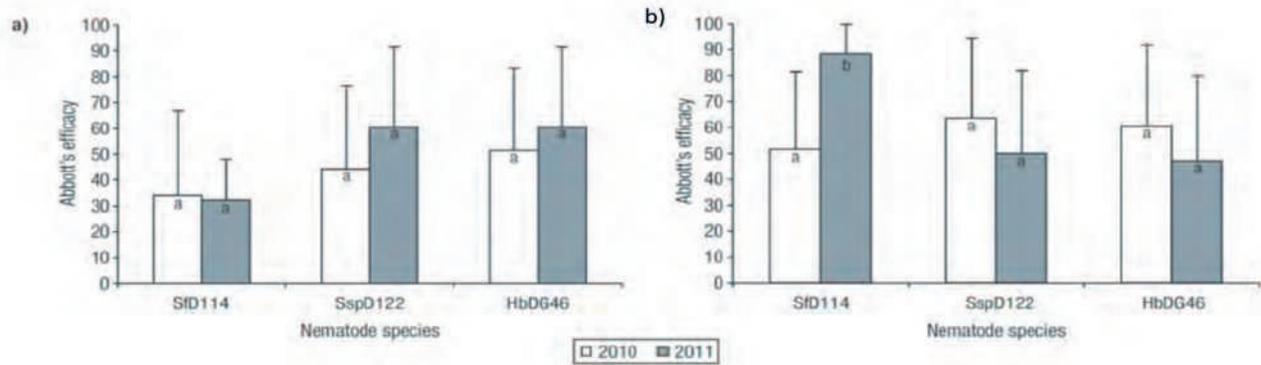


Figura 4. Eficacia de Abbot en (a) aplicaciones de verano y (b) aplicaciones de primavera, usando tres cepas diferentes de nematodos entomopatógenos, SfD114: *S. feltiae* (D114), SspD122: *Steinernema* sp. (D122) y HbDG46: *H. bacteriophora* (DG46) contra el diabló del avellano *Curculio nucum*.

larvas, en el caso de los adultos es el ano también la principal vía de entrada de los nematodos, quizás en este caso relacionado al mayor tamaño del orificio anal con respecto al de la boca de los adultos. Igualmente, observaciones directas durante los ensayos mostraron como los adultos presentan comportamientos evasivos frente a los nematodos, incrementando su movilidad cuando los nematodos están presentes y aparecen comportamientos de *grooming* (autoaseo) que podrían generar que algunos nematodos sean retirados de la boca de los insectos cuando intentan entrar en su interior, siendo entonces más eficaz la entrada por el ano.

Evaluación de la eficacia de los NEPs en condiciones controladas de campo

La eficacia de los diferentes tratamientos con nematodos en aplica-

ciones de verano y de primavera en los dos años que se desarrollaron los ensayos, puede verse en la Figura 4.

En aplicaciones de verano, la mortalidad obtenida es del 34% y del 32,2% (en el primer y segundo año del ensayo respectivamente) para *S. feltiae*; del 44,3% y 60,5% para *Steinernema* spp. y del 51,5% y 60,5% para *H. bacteriophora*, no habiéndose detectado diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En las aplicaciones de primavera, la eficacia de los tratamientos alcanzó valores de 51,5% y 88,2% para cada año en el caso de *S. feltiae*, 63,6% y 50,0% para *Steinernema* spp. y de 60,6% y 47,1% para el tratamiento con *H. bacteriophora*. Destaca la aplicación de *S. feltiae* de primavera del segundo año como la significativamente más eficaz entre todos los tratamientos realizados.

Estos resultados muestran que todas las especies de nematodos ensayadas son capaces de encontrar y parasitar *C. nucum* en condiciones de campo, observándose una eficacia similar a la mortalidad obtenida en los ensayos de laboratorio (58,6%-70,6%) (Batalla-Carrera y col., 2014) con estas mismas cepas de nematodos.

Conclusiones

Cabe destacar la presencia natural de NEPs, mayoritariamente en las plantaciones de avellanos de producción integrada y ecológica, frente a la nula presencia en plantaciones de producción convencional. Las prácticas culturales, así como la utilización de productos fitosanitarios, concretamente la mezcla de los herbicidas simacina y MCPA, han podido tener un efecto negati-

vo sobre la presencia y supervivencia de los NEPs.

Tanto las larvas como los adultos de *C. nucum* han sido susceptibles de la infección por NEPs, determinando que la vía principal de entrada de estos nematodos, tanto en larvas como en adultos, es el ano. Sin embargo, no todas las cepas de nematodos tienen la misma virulencia sobre los diferentes estadios del insecto. Estos resultados determinan que para el control de este insecto con NEPs deberemos contar con la utilización de dos especies de nematodos diferentes, una dirigida al control de las larvas y otra al control de los adultos.

Finalmente, los estudios realizados indican que los NEPs pueden reducir las poblaciones de *C. nucum* en el

campo y sugieren que la aplicación de nematodos en primavera puede ser una alternativa a la aplicación de verano, con el fin de minimizar los efectos negativos que pueden tener los factores abióticos (temperatura, desecación, etc.) sobre la persistencia de los nematodos aplicados en verano, lo que redundaría en una mayor eficacia de los mismos. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de campo en plantaciones comerciales para confirmar la eficacia observada en estos trabajos realizados en condiciones controladas de campo.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada parcialmente por los Proyectos AGL2006-037228/AGR y AGL2011-

24194 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Técnicos de la sección de Agricultura y Sanidad vegetal de Tarragona: Jordi Mateu, Martí Valladosera, Anna Garreta, Vanesa Duaso.

Técnicos de Agrupaciones de Defensa Vegetal (ADV): Carlos Solano, Jordi Sordé, Roger Palau, Elisenda Ribé, Cristina Colobrans, Raul Ibáñez, Joan Albert Agustí.

Bibliografía

- ! AliNiizee, M.T. (1998). Ecology and Management of Hazelnut Pests. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 395-419.
- Baiges, F., Ferré, I.R., Puig, V., Secanell, P., Gonzalez, C., Gil, J. (2012). Caracterización de las explotaciones con cultivo de avellano en Cataluña. *Fruticultura*, 21:4-11.
- Barrios, G. (1997). Protecció fitosanitaria. Plagues i malalties de l'avellaner. En: *El Conreu de l'avellaner*. Editado por el Centre de Formació i Estudis Agrorurals de Reus y el Servei d'Assessorament a l'Empresa Agrària. Barcelona (p: 94-111).
- Barrios, G. Mateu, J. Aymamí A. (2011). Sanidad Vegetal en Producción Ecológica del almendro y el avellano. Ficha técnica nº 12. Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca, Alimentación y Medio Rural. Generalitat de Catalunya
- Barrios, G. Mateu, J. Aymamí, A. (2014). La gestión de la Sanidad Vegetal en el cultivo del avellano. *Phytoma* nº 255, 36-45.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., Garcia-del-Pino F. (2013). Field efficacy against the hazelnut weevil, *Curculio nucum* and short-term persistence of entomopathogenic nematodes. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(4), 1112-1119
- Batalla-Carrera, L., Morton A., Shapiro-Ilan D., Strand M.R., Garcia-del-Pino F. (2014). Infectivity of *Steinernema carpocapsae* y *S. feltiae* to larvae and adults of the hazelnut weevil, *Curculio nucum*: differential virulence and entry routes. *J Nematol.* 46, 281-286.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., Garcia-del-Pino F. (2016). Virulence of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria against the hazelnut weevil *Curculio nucum*. *J. Appl. Entomol.* 140: 115-123.
- Bedding, R. A., Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21, 109-110.
- Bel-Venner, M.C., Mondy, N., Arthaud, F., Marandet, J., Giron, D., Venner, D., Menu, F. (2009). Ecophysiological attributes of adult overwintering in insects: insights from a field study of the nut weevil, *Curculio nucum*. *Physiological Entomology*, 34, 61-70.
- Botta, R., Valentini, N. (2018). Il Nocciolo. Progettazione e coltivazione del corileto. *Technica & Pratica*, Ed. Edagricole, Milano (Italia) 189pp.
- Breisch, H.; Sarraquigne, J.P., Couturie, E. (2008). An insecticide effectiveness screening method on hazelnut weevil (*Curculio nucum* L. Coleoptera Curculionidae) for field and laboratory studies. *Acta Horticulturae*, 845 (vol.2):451455.
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Labrador, S., Robertson, L., Barrios, L., Gutiérrez, C. (2007): Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 95, 125-139.
- CCPI (2018). Estadístiques de Producció Integrada de Catalunya de l'any 2018. Consell Català de la Producció Integrada (<http://producciointegrada.cat>)
- FAOSTAT (2018). Production. Crops. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.<http://faostat.fao.org>
- Gantner, M. (2001). Occurrence of hazelnut pest in southeastern Poland. *Acta Horticulturae*, 556:469-477.
- García del Pino, F., Palomo A. (1996). Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Spanish soils. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 84-90.
- García del Pino, F., Morton, A., Palomo, A. (2009). Virulence of entomopathogenic nematodes isolated in hazelnut orchards to *Curculio nucum* (Coleoptera: Curculionidae) larvae in the laboratory. *IOBC/wprs Bulletin*, 45: 403-405
- García del Pino, F., Morton, A. (2010). Synergistic effect of the herbicides glyphosate and MCPA on survival of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5): 483-488.

- Germain, E., Sarraquigne, J.P. (2004). Le noisetier. Ctifl, Paris, Francia. 296p.
- Ioachim, E., Bobarnac, B. (1997). Research on the hazelnut pest in Romania. *Acta Horticulturae*, 445:527-536.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, S. (2009). Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera : Curculionidae) and *Cydia splendida* (Lepidoptera : Tortricidae). *Biocontrol Science and Technology*, 19: 755-768.
- Kaya, H.K., Stock, P. (1997). Techniques in insect nematology. pp. 281-324. *En*: L.A. Lacey [ed]. *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. San Diego.
- Kepenekci, I., Gokce, A., Gaugler, R. (2004). Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica*, 34 : 199-204.
- Klein, M.G. (1990). Efficacy against soil-inhabiting insect pest. *En: Entomopathogenic nematodes in biological control*. Editado por R.Gaugler y H.K. Kaya. CRC Press. Florida. Pp. 195-214.
- Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S., Fuzy, E. M. (2007). Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *Journal of Invertebrate Pathology* 94:184-195.
- LeBeck, L. M., Gaugler, R., Kaya, H. K., Hara, A. H., Johnson, M. W. (1993). Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 58-63.
- Maeso, J., Torrell, A., Barrios, G. (1988). Assaig d'insecticides contra el diabló de l'avellaner (*Curculio nucum* L.). *Full. Inf. Tec.* No. 154. 3pp.
- Milenkovic, S., Mitrovic, M. (2001). Hazelnuts pest in Serbia. *Acta Horticulturae*, 556:403-406.
- MAPA (2015). Guía de Gestión Integrada de Plagas del Avellano. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 108pp
- MAPA (2018). Anuario de estadística 2017 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación . (<http://www.mapa.gob.es>).
- Morton, A., García del Pino, F. (2009) Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 203-213.
- Nonell Comas, J. (1921). El diabló de l'avellaner. *Arxius de l'Escola Superior de Catalunya*. No. 1. 19pp
- Paparatti, B., Speranza, S. (2005). Biological control of hazelnut weevil (*Curculio nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuill. (deuteromycotinas, Hyphomycetes). *Acta Horticulturae*, 686: 407-412.
- Peters, A., Sarraquigne, J.P., Blue, B., Kuske, S. (2005). Control of hazelnut weevil *Curculio nucum* with entomopathogenic nematodes. *10th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes"*, June 10-15, 2005, Locorotondo (Bari), Italy.
- Picoaga, A., Abelleira, A. Mansilla, J.P., Pérez, R., Salinero, C. (2008). Primeros resultados en el control de larvas de curculiónidos que afectan a plantas de vivero con nematodos entomopatógenos. *Actas de Horticultura*, 52: 140-146.
- Pucci, C. (1992). Studies on population dynamics of *Balaninus nucum* L. (Col., Curculionidae) noxious to the hazle (*Corylus avellana* L.) in Northern Latium (central Italy). *J. Appl. Entomol.* 114: 5-16.
- Renn, N. (1998). Routes of penetration of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* attacking larval and adult houseflies (*Musca domestica*). *Journal of Invertebrate Pathology* 72:281-287.
- Santamaria, S., Morton, A., Garcia del Pino, F. (2009). Natural occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in hazel orchards from Catalonia (N.E. Spain). *IOBC/WPRS Bulletin*, 45: 420-422.
- Shapiro-Ilan, D.I. (2001a). Virulence of entomopathogenic nematodes to pecan weevil larvae, *Curculio caryae* (Coleoptera : curculionidae), in the laboratory. *J. Econ. Entomol.*, 94, 7-13.
- Shapiro-Ilan, D.I. (2001b). Virulence of entomopathogenic nematodes to pecan weevil adults (Coleoptera : curculionidae), in the laboratory. *J. Entomol. Sci.*, 36 : 325, 328.
- Shapiro-Ilan, D.I. (2003). Microbial control of the pecan weevil, *Curculio caryae*. *Southw. Entomol.*, 101-114.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gardner, W.A., Fuxa, J.R., Wood, B.W., Nguyen, K.B., Adams, B.J., Humber, R.A., Hall, M.J. (2003a). Survey of entomopathogenic nematodes and fungi endemic to pecan orchards of the Southeastern United States and their virulence to the pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 32, 187-195.
- Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R., McCoy, C.W. (2003b). Comparison of beneficial traits among strains of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, for control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control*, 28, 129-136.
- Shapiro-Ilan, D.I., Jackson, M., Reilly, C.C., Hotchkiss, M.W. (2004). Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control*, 30, 119-126.
- Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W. (2005). Targeted improvement of *Steinernema carpocapsae* for control of the pecan weevil, *Curculio caryae* (Horn) (Coleoptera: Curculionidae) through hybridization and bacterial transfer. *Biol. Control*, 34, 215-221.
- Torrás, C. (1978). Contribución a la entomología del avellano. *Bol. Asoc. Esp. Entomol.* 2: 77-86.
- Tóth, L. (1984). Data on weevils causing damage to hazelnuts and on control measures. *Növényvédelem*, 20: 366-368.
- Tous, J., Rovira, M., Romero, A. (2001). El Avellano. *En: La Horticultura Española*. Ed. SECH. P:275-278.
- Tuncer, C., Ecevit, O. (1997). Current status of hazelnut pest in Turkey. *Acta Horticulturae*, 445:545-552.
- Vinciguerra, M.T., Clausi, M. (2006). Biological control of chestnut insect pests by means of entomopathogenic nematodes. *Advances in Horticultural Science*, 20: 40-44.
- Viggiani, G. (1994). Stato attuale della difesa fitosanitaria del nocciolo. *Acta Horticulturae*, 351:531-541.