



**Universidad de Valladolid**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Máster en Ingeniería de Montes**

Identificación de hongos entomopatógenos asociados a  
insectos en masas forestales de Castilla y León

Alumno: Alberto César Rodríguez López

Tutor: Julio Javier Diez Casero

Cotutora: Mercedes Fernández Fernández

Julio de 2023

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Objetivos</b> .....	4
<b>3. Material y métodos</b> .....	5
3.1. Área de estudio .....	5
3.2. Recogida de insectos .....	6
3.3. Cultivo de hongos asociados a insectos en el laboratorio .....	6
3.4. Identificación microscópica y molecular de los aislamientos .....	8
3.5. Cría y manejo de insectos en el laboratorio .....	10
3.6. Ensayos fúngicos <i>in vivo</i> .....	10
3.5. Análisis estadístico.....	13
<b>4. Resultados</b> .....	13
4.1. Identificación morfológica de insectos .....	13
4.2. Identificación de hongos .....	16
4.3. Análisis estadístico.....	17
<b>5. Discusión</b> .....	21
<b>6. Conclusiones</b> .....	22
<b>7. Bibliografía</b> .....	23
<b>8. Anexos</b> .....	29
8.1. Proporciones de la mezcla para la PCR .....	29
8.2. Resultados del espectrofotómetro .....	30
8.3. Insectos de interés en patologías forestales .....	32
8.4. Hongos con capacidad entomopatógena.....	35
8.5. Anexo fotográfico .....	36

## Resumen

Los hongos entomopatógenos son organismos que existen naturalmente afectando a las poblaciones de insectos. El objetivo principal de profundizar en su investigación radica en la necesidad de producirlos adecuadamente, con el fin de diseminarlos y que se mantengan en el hábitat en donde pueden ejercer su efecto controlador de las plagas. Por lo tanto, no se puede pensar que su efecto es inmediato, sino que, a través de su uso, se regulan las poblaciones para mantenerlas en niveles de daño que no causen pérdidas económicas sobre las masas forestales, acción que se logra debido a que afectan a especies concretas, no siendo de efecto general como los insecticidas químicos.

Las aplicaciones de los hongos entomopatógenos, deben dirigirse a poblaciones de plagas incipientes, o sea, en focos que puedan detectarse a tiempo, antes del desarrollo de la plaga, al contrario de como se hace al utilizar insecticidas químicos.

En este estudio se han recogido e identificado insectos muertos procedentes de dos masas forestales diferentes: un pinar y una dehesa. Posteriormente, se han aislado los hongos presentes en esos insectos y se han identificado y comprobado su eficacia entomopatógena a través de la realización de ensayos fúngicos en laboratorio utilizando escarabajos en vivo.

## Abstract

Entomopathogenic fungi are organisms that exist naturally affecting insect populations. The main objective of deepening their research lies in the need to produce them adequately, in order to disseminate them and keep them in the habitat where they can exert their controlling effect on pests. Therefore, it cannot be thought that their effect is immediate, but rather that, through their use, populations are regulated to maintain them at levels of damage that do not cause economic losses on forest stands, an action that is achieved because they affect specific species, not being of general effect like chemical insecticides.

The applications of entomopathogenic fungi should be directed to incipient pest populations, that is, before the development of the pest, contrary to what is done when using chemical insecticides.

In this study, dead insects were collected and identified from two different forest stands: a pine forest and a dehesa. Subsequently, the fungi present in these insects were isolated and their entomopathogenic efficacy was identified and tested by performing fungal assays in the laboratory using live beetles.

## 1. Introducción

En el mundo se conocen más de 750 especies de hongos entomopatógenos relacionados con varios órdenes de insectos como coleópteros (escarabajos), dípteros (moscas), lepidópteros (mariposas) y otros artrópodos, como los arácnidos (arañas) (Franco *et al.*, 2021). Filogenéticamente los hongos que afectan a los artrópodos son un grupo diverso del reino Mycota y que agrupa las subdivisiones: Deuteromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (Inglis *et al.* 2001) y Chytridiomycota.

Debido a su capacidad natural como entomopatógenos, muchos de estos hongos se usan como agentes de control biológico como alternativa ecológica al uso de los productos fitosanitarios tradicionales y, todos los artrópodos susceptibles de padecer las enfermedades causadas por estos hongos pueden infectarse en cualquiera de sus fases de desarrollo (Abdel-Rahe, 2019).

Inicialmente los hongos entomopatógenos se encuentran en una fase de latencia en forma de esporas de origen asexual (conidiosporas) que se mantienen así hasta que encuentran a su futuro huésped. Posteriormente, se produce una fase de adhesión en el que las conidiosporas se adhieren a la cutícula del artrópodo. Más tarde, se desarrolla una fase de germinación y penetración de las conidiosporas donde se liberan enzimas que degradan la cutícula del artrópodo (lipasas, proteasas y quitinasas) penetrando al interior del hospedador a través de tubos germinativos. Finalmente, se produce una fase de colonización en el que las hifas del hongo colonizan toda la cavidad corporal del hospedador a través de su sistema circulatorio (hemolinfa) provocando su deshidratación y posterior muerte, transformándose en un esclerocio, que es una masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas nutritivas, a través del cual el hongo puede sobrevivir de forma saprófita durante largos periodos de tiempo (si el ambiente está seco), hasta que las condiciones sean propicias para producir el desarrollo del cuerpo fructífero del hongo (Rubio *et al.*, 2000).

Todo este mecanismo está condicionado por factores ambientales como la humedad relativa, la temperatura y el pH, que es variable para cada especie fúngica, aunque generalmente, es necesaria una elevada humedad ambiental y una temperatura cálida (Abdel-Rahe, 2019).

Las enfermedades que causan éstos hongos se conocen como muscardinas, término que se aplicó por primera vez en la utilización de *Beauveria bassiana*. Como la coloración de los conidios es variable, se puede hablar de muscardina verde, causada por *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi* o muscardina roja, causada por *Paecilomyces fumosoroseus* (Dembilio, 2019).

El uso de estos organismos es una de las mejores alternativas para el control biológico por ser económica, sencilla y desde el punto de vista ecológico, sostenible, siempre y cuando se tenga total certeza de que su impacto en el medio y en otras especies no sea negativo.

## 2. Objetivos

El objetivo general de éste estudio es contribuir al manejo de plagas forestales a través del uso de hongos entomopatógenos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los insectos recogidos en campo asociados a masas forestales enfermas.
2. Identificar los hongos asociados a insectos presentes en dichas masas.
3. Conocer el potencial entomopatógeno de estos hongos a través de la realización de bioensayos en insectos vivos.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Área de estudio

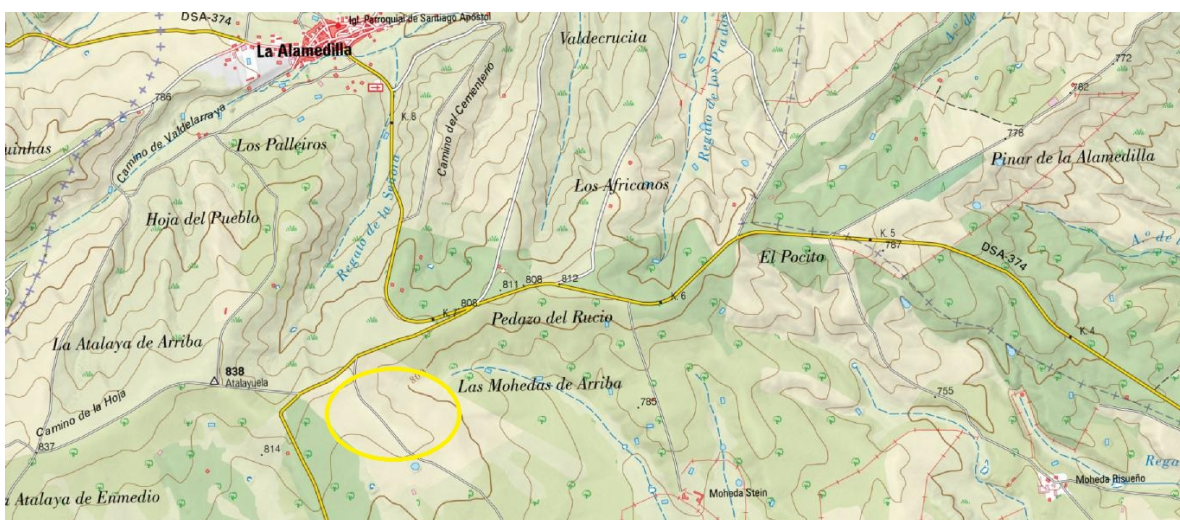
Los insectos objeto de ensayo en el presente estudio proceden de dos lugares:

- Por un lado, los ejemplares de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae) procedentes de la localidad burgalesa de Regumiel de la Sierra, en la comarca de La Demanda y Pinares, provincia de Burgos (Fig. 1):



**Figura 1.** Localización de La Casa de la Madera, Regumiel de la Sierra, Burgos (escala 1:17000)

- Por otro lado, se recogieron insectos asociados a encinas en una parcela incluida dentro del proyecto LIFE Mycorestore, en el municipio de La Alamedilla, provincia de Salamanca, lindando con Portugal (Fig. 2). Éste es un proyecto europeo cuyo objetivo principal es utilizar diversos recursos micológicos y prácticas de manejo forestal para agregar valor y ayudar en la resiliencia biológica de los bosques en España, Italia y Portugal.



**Figura 2.** Localización de la parcela de La Alamedilla, Salamanca (escala 1:17000)

### 3.2. Recogida de insectos

Los 6 ejemplares de *L. Occidentalis*, conocida comúnmente como chinche americana, se recogieron en La Casa de la Madera, un edificio multiusos que sirve de centro de exposiciones y de formación, próximo a una zona de pinar y donde dicho insecto inverna en el interior del edificio. Los insectos recogidos estaban muertos y sin marcas de violencia, suponiendo que habrían finalizado su ciclo vital o hubieran muerto por la presencia de un hongo entomopatógeno.

Debido a la importancia económica que tiene el ataque de la chinche americana de las piñas, parte del estudio referida a insectos de pinares se centra en esta especie, cuya bioecología y distribución se encuentra detallada en el anexo 8.3.

Por otra parte, los insectos procedentes de Salamanca se recogieron mediante el descortezado de encinas adhesionadas en decaimiento, totalmente defoliadas en una parcela de una superficie aproximada de 10 hectáreas donde se descortezaron 13 de ellas. Para ello, se utilizaron un mazo, un escoplo, varios recipientes de plástico en los que se introducen de forma separada cada insecto y un rotulador indeleble para rotular. El método empleado fue descortezar una superficie aproximada de 30 x 30 cm a la altura del pecho (DBH) haciendo palanca con el escoplo y recoger posteriormente todos los insectos o restos de ellos que se detectaran, desechando puestas y mudas.

### 3.3. Cultivo de hongos asociados a insectos en el laboratorio

Los materiales utilizados para la esterilización de todos los insectos muertos objeto del estudio fueron 3 vasos de precipitados autoclavados, disolución al 10 % de hipoclorito de sodio, etanol al 75 %, agua destilada estéril, mechero de alcohol, alcohol, pinzas, insectos a esterilizar, cronómetro y placas Petri con medio antibiótico (SDA).

El primer paso consistió en obtener todos los hongos posibles tanto de *L. occidentalis* como de los insectos de La Alamedilla. Para ello, se barajaron varios métodos, entre otros: Meyer *et al.* (2008) y Jaber *et al.* (2016), que se descartaron debido a la fragilidad de algunos ejemplares, y Gouli *et al.* (2013), que tampoco se realizó debido a que había que dejar las placas permanentemente a 24 °C durante 3 semanas para el crecimiento fúngico. El método finalmente escogido fue el de Islam *et al.* (2001), que se describe a continuación:

Cada uno de los tres vasos de precipitados tenía: una disolución al 10 % de hipoclorito de sodio, etanol al 75 % y agua estéril. Se pasa el insecto por cada uno de ellos: del agua a la lejía, luego el alcohol y finalmente agua otra vez. Los especímenes lavados son posteriormente desmembrados para permitir la salida de los hongos que puedan estar en el interior, y puestos en un medio con ampicilina y estreptomina, que previene la aparición de bacterias.



**Figura 3.** Placas con los chinches esterilizados

Para prevenir la pérdida de hongos durante el proceso de esterilización, se dejaron dos ejemplares de chinche sin esterilizar.

A partir de esas placas se fueron sacando trozos de micelio a otras placas, y reaislando sucesivamente los hongos que iban apareciendo, hasta obtener 15 hongos de los ejemplares de *L. occidentalis* y otros 10 hongos de los insectos procedentes de La Alamedilla, que se conservaron sumergidos en glicerol y almacenados en una cámara a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior identificación y empleo en el bioensayo.

**Figura 4.** Colección completa de hongos aislados

### 3.4. Identificación microscópica y molecular de los aislamientos

Para la extracción de ADN los materiales que se utilizaron fueron: placas Petri con los hongos aislados, mechero de alcohol, alcohol, bisturí, tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, pipetas y puntas de pipeta estériles, solución buffer, fenol, cloroformo isoamílico, vórtex, centrifugadora, etanol absoluto, acetato de sodio, etanol al 70 % y agua miliQ.

El método para la extracción de ADN de los hongos que se probó en primer lugar fue el siguiente: en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se añade micelio raspado con un bisturí de la placa, 400 µl de una solución buffer, 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo isoamílico. Posteriormente, se pasa por el vórtex y se centrifuga 30 minutos a 7500 rpm y 4 °C. Se recoge el sobrenadante y se pone en 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato de sodio, dejándolo a continuación 30 minutos a -20 °C.

A continuación, se centrifuga 20 minutos a 13500 rpm y 4 °C. Se retira el sobrenadante y se lava el pellet resultante con etanol al 70 % y centrifugando 5 minutos (2 veces). Se retira finalmente el alcohol, se seca bien el pellet y se resuspende en 100 µl de agua miliQ.

Sin embargo, al no obtener resultados claros y tras numerosas repeticiones, se cambió al método de Cassago, 2002: en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se añade micelio raspado con un bisturí de la placa y 100 µl de una solución buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 1% SDS). Se añade 1 bola de tungsteno (en algunos casos se sustituyó por bolas de vidrio), se pone en el agitador 2 minutos y se deja reposar en hielo 5 minutos. Al tubo, aún con la bola, se le añaden 150 µl de acetato de potasio, pH 4,8 y se pasa por el vórtex y se centrifuga 2 minutos a 15000 rpm. Se pasa el sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml con 600 µl de isopropanol, se mezcla por inversión y se centrifuga 10 minutos a 15000 rpm y 4 °C. El gránulo resultante se lava con etanol al 70 % y centrifugando 10 minutos (2 veces). Por último, se seca bien el pellet y se resuspende en 50 µl de buffer TE-RNAs.

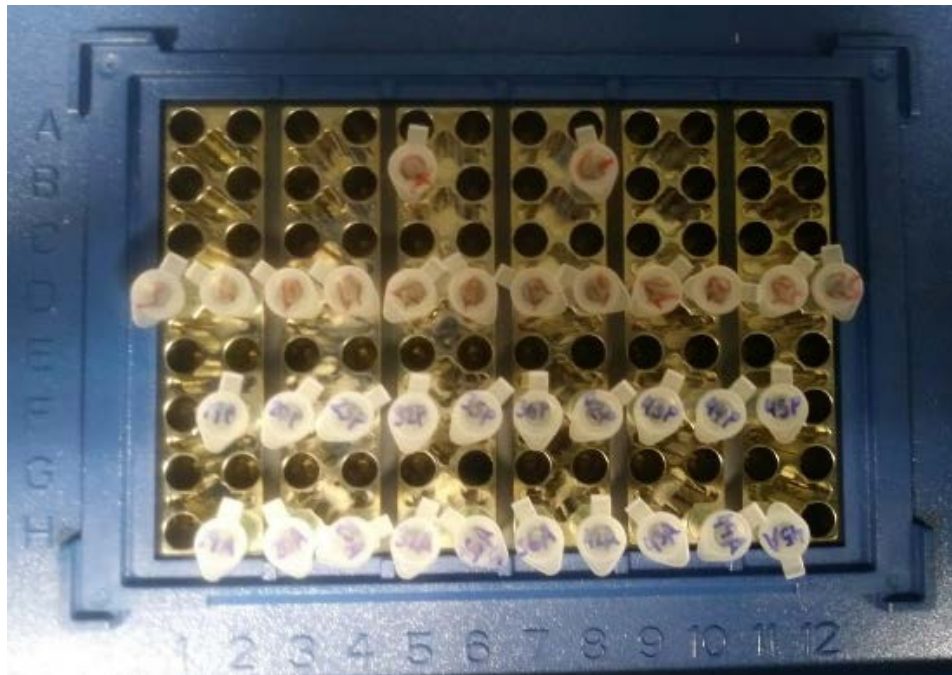
Los materiales utilizados para el método Cassago fueron placas Petri con los hongos aislados, mechero de alcohol, alcohol, bisturí, tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, pipetas y puntas de pipeta estériles, solución buffer Tris-EDTA, bolas de tungsteno o de vidrio, vórtex, cajón con hielo, centrifugadora, acetato de potasio, isopropanol, etanol al 70 % y buffer TE-RNAs.

Tras la extracción, se utilizaron los siguientes materiales para realizar una PCR con las muestras: agua MiliQ, cebador forward (ITS1) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', cebador reverse (ITS4) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', Nzytech Green Master Mix, tubos de microcentrífuga pequeños, termociclador, matraz Erlenmeyer, agua destilada, agarosa (TAE), Gel RED, placa para cargar el gel, peine para los pocillos, cubeta de electroforesis, generador de corriente, marcadores de control y lámpara de UV.

La PCR se realizó de la siguiente forma: en un tubo de microcentrífuga pequeño se añaden 24 µl de la mezcla de agua MiliQ, cebadores 1 y 4 (Kumar Sain *et al.*, 2021), green mix y 1 µl de la extracción de ADN y se pone en el termociclador con un programa de hora y media. Las proporciones de la mezcla según el número de muestras a amplificar aparecen en la tabla 4 de los anexos. Para ver los resultados, se prepara un gel de electroforesis a base de agua destilada, agarosa y un marcador fluorescente que se fija al ADN.



Se rellenan los pocillos del gel con las muestras (5  $\mu$ l) y se coloca en una cubeta de electroforesis conectada a una fuente de alimentación durante 40 minutos. Por último, se revela el gel mediante una lámpara de luz ultravioleta.



**Figura 5.** Termociclador cargado con las muestras

En las muestras válidas se observa una banda de ADN que se encuentra entre 500 y 750 nm, que coincide con la banda ampliada por los cebadores 1 y 4, y que es lo que se envía a secuenciar. Las muestras se conservan posteriormente a 4 °C hasta que se mide la concentración de ADN en el espectrofotómetro, y según los resultados obtenidos, las muestras se diluyen, se purifican, o se conservan hasta que se envían a secuenciar, lo que se realiza en un laboratorio externo.

Para la purificación se empleó el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up comercializado por la empresa Macherey-Nagel, y sirve para eliminar sales y enzimas presentes en las muestras. El protocolo empleado es el descrito en las páginas 17 y 18 del manual incluido en el kit, y que se resume a continuación:

Como el volumen de las muestras es inferior a 30  $\mu$ l, se debe ajustar el volumen con agua destilada hasta alcanzar 50  $\mu$ l. Se toma un volumen de muestra por cada dos volúmenes de Buffer NT1, en este caso 100  $\mu$ l. Se coloca una columna de extracción de las incluidas en el kit en un tubo de microcentrífuga de 2 ml, se carga con la mezcla de muestra y NT1 y se centrifuga 30 segundos a 11000 rpm. A continuación, se descarta el líquido que ha pasado a través de la membrana y se coloca de nuevo la columna en el tubo. Se añaden 700  $\mu$ L de Buffer NT3 a la columna para lavar la membrana y se centrifuga 30 segundos a 11000 rpm. Se seca la membrana centrifugando 1 minuto a 11000 rpm para eliminar todo el NT3, y se tiene cuidado para que la columna no entre en contacto con el líquido al quitarla del tubo. Finalmente, se coloca la columna de extracción en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añaden 20  $\mu$ L de Buffer NE, dejándolo incubar a temperatura ambiente (15 - 25 °C) durante 1 minuto, tras lo que se centrifuga durante 1 minuto a 11000 rpm.

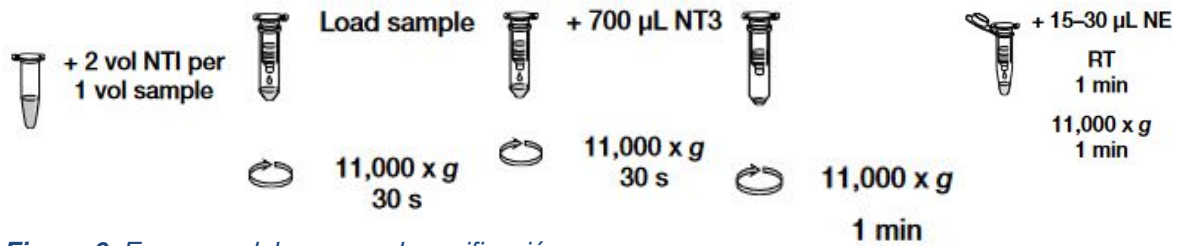


Figura 6. Esquema del proceso de purificación.

### 3.5. Cría y manejo de insectos en el laboratorio

Para comprobar la eficacia entomopatógena de los hongos, se procedió a la inoculación en laboratorio, de los insectos vivos. Para ello, se emplearon especímenes de *Tenebrio molitor* Linneo, 1758 (Coleoptera, Tenebrionidae), por ser relativamente sencilla su cría y así poder disponer de suficientes ejemplares para los ensayos en vivo. La elección de esta especie se debe por una parte, como ya se ha comentado a su fácil manejo pero también porque se recogieron varios especímenes de la familia Tenebrionidae en la parcela de La Alamedilla.

La forma de criar los escarabajos en el laboratorio consiste en separar en distintas bandejas las tres fases de desarrollo del insecto (larva, pupa e imago), manteniendo las dos primeras fases en una cámara a 27 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad hasta su paso a imago definitivo. Se utiliza como base de alimento salvado de trigo y como fuente de agua PDA.

La fase larvaria dura aproximadamente 2 meses, mientras que la pupa puede extenderse entre una semana y un mes. Los adultos son de blanquecinos al emerger de la pupa, pigmentándose progresivamente hasta alcanzar la coloración negra y la esclerotización definitiva, proceso que tiene una duración de entre una semana y dos meses.

Para el ensayo en vivo se escogieron imagos de una o dos semanas, totalmente pigmentados y esclerotizados.

### 3.6. Ensayos fúngicos *in vivo*

Como se ha comentado anteriormente, los hongos obtenidos de los aislamientos se probaron sobre ejemplares vivos de *T. molitor* criados en el laboratorio, para averiguar si alguno de ellos tenía capacidad entomopatógena. Los materiales utilizados para el ensayo fueron: 5 placas Petri con el hongo a inocular aislado, preferiblemente esporulado, 10 ejemplares de *T. molitor* por hongo a inocular, agua destilada, 1 placa Petri grande de vidrio vacía para hacer cámara húmeda y 10 placas Petri vacías individuales para cada insecto, papel de filtro autoclavado del tamaño de la placa Petri con la que se vaya a hacer cámara húmeda y de tamaño de las placas individuales, salvado de trigo autoclavado, mechero de alcohol, alcohol y pinzas, una placa Petri con la tapa agujereada para cada insecto, cronómetro y rotulador indeleble.

El método de inoculación fue el empleado en el proyecto LIFE Mycorestore para la búsqueda de hongos insecticidas con hongos aislados de campo y que se describe a continuación:

Se prepara todo el material estéril el día anterior (agua destilada, papel de filtro y placas Petri), así como 5 placas con el hongo aislado a inocular que ocupe toda la placa y preferiblemente que esté esporulado. Se hacen tres agujeros con un punzón caliente sobre la tapa de cada placa Petri donde vayan a estar los insectos durante el ensayo, para facilitar su aireación. Se mojan las pinzas en alcohol y se queman en el mechero hasta haber consumido todo el alcohol. Se espera a que se enfríen y se cogen con ellas los insectos, colocándolos de dos en dos en las cinco placas Petri con el hongo a inocular. Se deja que los insectos se muevan por la placa durante 10 minutos (agitándolos si no se mueven) para que se impregnen de las esporas o el micelio del hongo. Los insectos utilizados tienen que ser coetáneos para evitar muertes en el caso de insectos viejos. Se prepara una placa Petri grande colocando dentro un papel de filtro del tamaño de la placa humedecido con agua destilada autoclavada; a la que se transfieren los insectos durante 12 horas (placa cerrada). Se separan los insectos individualmente en placas de pequeño tamaño con papel de filtro para permitirles que se den la vuelta si se giran y una cama de salvado de trigo que les sirva como alimento. Se realiza el mismo procedimiento, pero con placas de PDA sin hongo con otros 10 insectos que sirvan de control. Cada 2 días se les proporciona a los insectos un cubo de aproximadamente 2 mm de PDA a cada placa con insecto para que actúe como su fuente de agua y se comprueba diariamente la supervivencia de los insectos. El ensayo de contacto duró 26 días.

Según van muriendo los tenebrios, se anota la fecha para elaborar unas curvas de supervivencia que servirán para comparar la eficacia entomopatógena de cada hongo. También se van transfiriendo a placas para cultivar los hongos que puedan transportar, y comprobar si el hongo inoculado está presente.



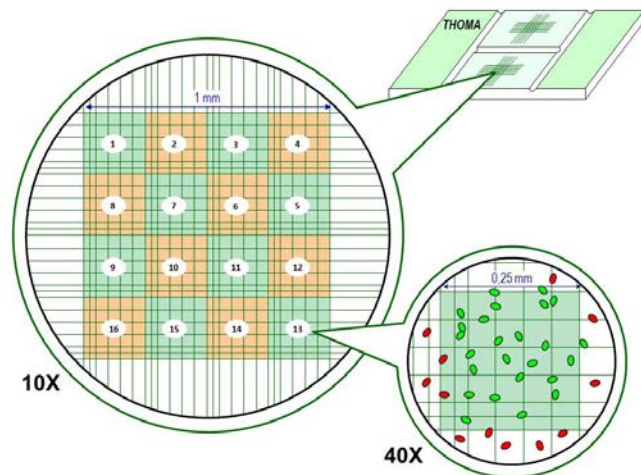
**Figura 7.** *T. molitor* en contacto con un hongo



**Figura 8.** *T. molitor* en cámara húmeda tras la inoculación.

Los insectos infectados por el hongo 20 presentaban síntomas muy parecidos a las infecciones por *Beauveria bassiana* (Moino *et al.*, 2001), consistentes en una cobertura completa del insecto de una pelusa blanca. A la vista de los buenos resultados obtenidos con dicho hongo, se llevó a cabo un segundo ensayo inoculando de la misma forma, pero dejando los insectos durante 15 minutos en contacto con el hongo (Güerri-Agulló, 2010). Además, se realizó un tercer ensayo inoculando al insecto mediante un spray con una suspensión esporal (Mantzoukas *et al.*, 2019).

El procedimiento para elaborar el espray consistió en realizar un conteo de esporas para luego diluir hasta conseguir una suspensión de concentración conocida. Los materiales empleados fueron: el hongo aislado, bisturí, botella de 1 litro, puntas de pipeta (1  $\mu$ l) estériles, tubo de microcentrífuga de 1ml, agua destilada estéril, hemocitómetro o cámara Thoma, microscopio y rotulador indeleble. El conteo de esporas se realizó de la siguiente forma: primero se añade el hongo aislado a la botella de 1 litro que contiene agua destilada estéril y se pone en un agitador orbital magnético hasta que la suspensión esté bien homogeneizada. A continuación, se diluyó esa suspensión cogiendo un  $\mu$ l y poniéndolo en un tubo de microcentrífuga con 1 ml de agua destilada estéril, de modo que la cantidad de esporas a contar no sea excesiva y pueda dar lugar a errores. A continuación, se realiza el conteo de esporas en el hemocitómetro, o cámara Thoma. Éste está dividido en una cuadrícula de recuento formada por un cuadrado central grande (que se puede ver en su totalidad con el objetivo 10X), de 1 mm<sup>2</sup> de superficie. Éste cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos (que se pueden ver en su totalidad con el objetivo 40X) cada uno de ellos con 16 cuadrados en su interior.



**Figura 9.** Ejemplo de conteo de esporas en hemocitómetro

Se coloca una gota de la suspensión diluida bajo el cubreobjetos, de tal forma que la muestra cubra por completo la superficie de la cámara, alcanzando una altura de 0,1 mm. Teniendo estos datos en cuenta, el volumen contenido en el cuadrado grande central será:  $1 \cdot 1 \cdot 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$ . Para el conteo de esporas se eligen los cuadrados medianos situados en la diagonal. El volumen contenido en cada uno de ellos es:  $0,2 \cdot 0,2 \cdot 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,000004 \text{ ml}$ . Se cuentan todas las esporas en cada uno de los cuadrados de la diagonal, incluyendo las que están tocando los lados superior e izquierdo de los mismos, aunque estén parcialmente fuera. Las que toquen los lados inferior y derecho no se cuentan. Se repite el proceso al menos dos veces por cada muestra. Si al hacer el procedimiento aparecen hifas, se obvian.

Por último, se hace la media aritmética de las lecturas realizadas, en este caso, 0,6 en ambas muestras. Dividiendo la media entre 0,000004 ml se obtiene la concentración del tubo en el que se diluyó la suspensión de la botella:  $C_{\text{tubo}} = 0,6 \text{ esporas} / 0,000004 \text{ ml} = 150000 \text{ esporas/ml}$ . Conociendo esta concentración, que es 1000 veces menor que la botella, se obtiene la concentración de esporas en la botella:  $1,5 \cdot 10^8 \text{ esporas/ml}$ .

Ésta concentración se consideró adecuada para realizar la inoculación mediante espray (Spence *et al.*, 2020), por lo que se procedió de dos maneras distintas para observar si había alguna diferencia en cómo afecta el hongo a los insectos.

- Por un lado, se inoculó a 10 tenebrios en una placa aparte y se les introdujo posteriormente en una cámara húmeda con agua destilada, igual a las cámaras utilizadas en el ensayo de inoculación por impregnación.

- Por otro lado, se inoculó a 10 tenebrios directamente en la cámara húmeda, dejándolos las 12 horas en humedad con el hongo.

El ensayo de inoculación mediante aerosol también duró 26 días.

### 3.5. Análisis estadístico

Para analizar los datos de supervivencia de *T. molitor* se utiliza el método de Kaplan-Meier, que permite estimar la curva de supervivencia. Se trata de un método no paramétrico que no presupone que los datos sigan una distribución particular, solo requiere que los sujetos censurados (en este caso, insectos vivos al final del ensayo) se hubiesen comportado del mismo modo que los insectos que iban muriendo (Molina *et al.*, 2022).

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el entorno de programación R (R Core Team, 2022). Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier para datos censurados implementado en el paquete survival (Therneau, 2022). Las diferencias entre pares de curvas se estimaron mediante la familia de test G-rho ( $\rho = 0$ , equivalente a un test log-rank) implementado en el paquete survminer (Kassambara *et al.*, 2021). Se aplicó la corrección de Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Las diferencias fueran declaradas significativas para p-valores corregidos inferiores a 0.05.

## 4. Resultados

### 4.1. Identificación morfológica de insectos

Los resultados de la identificación de los insectos recogidos en La Alamedilla fueron los siguientes:

- **Orden Coleoptera, Familia Tenebrionidae, *Heliotaurus ruficollis* (Fabricius, 1781)**: conocido como toro del sol. Es una especie muy común en la región mediterránea occidental. Las larvas viven en el suelo y se alimentan de detritos, mientras que los adultos se alimentan de néctar, polen y de los pétalos de las flores de los propios órganos florales, por lo que juega un papel importante en la polinización de las flores de las que se alimenta.



Figura 7. *Heliotaurus ruficollis*

- **Orden Coleoptera, Familia Tenebrionidae, *Tentyria platyceps* (Steven, 1829):** coleóptero que habita en las regiones meridionales, centrales y occidentales de la Península Ibérica.



Figura 8. *Tentyria platyceps*

- **Orden Coleoptera, Familia Tenebrionidae, *Scaurus uncinus* (Forster, 1771):** se distribuye por el Mediterráneo occidental, por la Península Ibérica, el sur de Francia, hasta Cerdeña, Marruecos (incluida la región atlántica) y el noroeste de Argelia. Habitual de zonas secas y arenosas.



Figura 9. *Scaurus uncinus*

- **Orden Coleoptera, Familia Carabidae, *Pterostichus* sp. (Bonelli, 1810):** los escarabajos de este género son por lo general carnívoros y viven preferentemente en bosques y prados húmedos, aunque hay especies de zonas secas y otras de montaña. Los adultos salen en otoño e invernan, mientras que el desarrollo de las larvas tiene lugar en el suelo.



Figura 10. *Pterostichus* sp.

- **Orden Coleoptera, Familia Carabidae, *Amara* sp. (Bonelli, 1810):** si bien los escarabajos de tierra son en su mayoría carnívoros, numerosas especies de *Amara* se alimentan de semillas de plantas tanto la larva como el adulto (Raupach *et al.*, 2018). Son habituales en zonas secas de toda Europa



Figura 11. *Amara* sp.

- **Orden Coleoptera, Familia Geotrupidae, *Bolbelasmus* sp. (Boucomont, 1911):** este escarabajo vive en galerías excavadas en el suelo, encuentra los hongos hipogeos que les sirven de alimento. Al anochecer abandonan sus galerías, saliendo a la superficie donde levantan el vuelo, son vuelos cortos y de poca altura (Gonzalez, 1979).



Figura 12. *Bolbelasmus* sp.

- **Orden Coleoptera, Familia Zopheridae, *Colydium elongatum* (Fabricius, 1787):** esta especie vive debajo de la corteza de varios árboles caducifolios y coníferas muertos, y se alimenta de varias especies de escarabajos xilófagos. Es común en Francia, Alemania e Inglaterra, aunque se está avistando cada vez con más frecuencia en España, Suecia, Italia y Portugal.

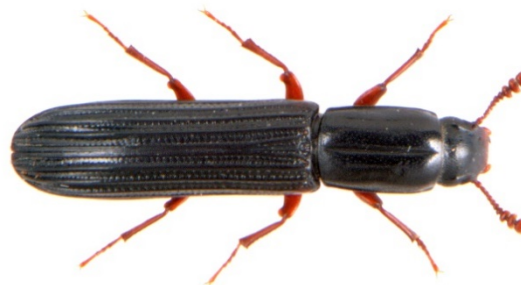


Figura 13. *Colydium elongatum*

- **Orden Coleoptera, Familia Cerambycidae, *Cerambyx welensii* (Küster, 1846):** esta especie está muy extendida en el sur de Europa, el norte de África y Oriente Próximo. Las larvas de estos escarabajos son xilófagas. Se alimentan principalmente de roble pubescente (*Quercus pubescens*), encina (*Quercus ilex*) y alcornoque (*Quercus suber*) y se consideran una plaga de los robles. Por éste motivo, se describe con más detalle en el anexo 8.3.



Figura 14. *Cerambyx welensii*

- **Orden Dermaptera, Familia Forficulidae, *Forficula auricularia* (Linneo, 1758):** la tijereta común se encuentra frecuentemente bajo las piedras y en las frutas. Es la tijereta más común de Europa, incluida la Península Ibérica.



Figura 15. *Forficula auricularia*.

- **Orden Diptera, Familia Muscidae, *Stomoxys calcitrans* (Linneo, 1758):** la mosca de los establos es abundante en y alrededor de donde se guarda el ganado. Sus larvas se ven a menudo en el estiércol putrefacto cerca del ganado y de las aves de corral. Los adultos de ambos sexos se alimentan de la sangre de animales de sangre caliente durante el día. Después, los huevos se ponen entre la materia orgánica en descomposición, como heno, estiércol y madera.



Figura 16. *Stomoxys calcitrans*

- **Orden Diptera, Familia Muscidae, *Musca autumnalis* (De Geer, 1776):** la mosca de otoño se ha extendido por la mayor parte de Europa, Asia Central, también al norte de la India, Pakistán, China, algunas partes norteñas de África y fue introducida en Norteamérica alrededor de la década de 1940. En el ganado y los caballos, se alimentan de las secreciones de alrededor de los ojos, la boca y narinas. Las moscas adultas también se alimentan de la sangre de los anfitriones a través de heridas, como por ejemplo picaduras de tábano. Es considerada una especie plaga, ya que transmite *Thelazia rhodes*, un nemátodo que parasita los ojos y keratoconjuntivitis contagiosa vacuna al ganado.



Figura 17. *Musca autumnalis*

- **Varias especies de coleópteros** que no pudieron identificarse hasta nivel de género ni especie por ser restos parciales del insecto (patas, élitros, tórax, etc.).

#### 4.2. Identificación de hongos

Antes de enviar a identificar las muestras tras la PCR, se midió la concentración de ADN mediante absorbancia en el espectrofotómetro del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, así como los niveles de contaminación por ARN y por fenoles, siendo los resultados de cada muestra enviada los recogidos en los anexos.

Los productos de la PCR se enviaron a secuenciar al laboratorio de STAB VIDA. Una vez se tuvieron los resultados de la secuenciación, se usa un BLAST que compara las secuencias obtenidas con las secuencias de la base de datos de la National Library of Medicine y las ordena por orden de coincidencia. Se asignaron taxones fúngicos al nivel de género o especie cuando mostraban una homología igual o superior al 99% en al menos un marcador molecular.



La siguiente tabla recoge los hongos que se obtuvieron de cada uno de los insectos utilizados, y su nombre científico, resultado de la identificación:

Insecto	Referencia aislado	Nombre científico
<i>L. occidentalis</i> esterilizados	1	<i>Coniochaeta acaciae</i>
	2	<i>Penicillium sp.</i>
	5	<i>Cladosporium sp.</i>
	7	<i>Pyronema omphalodes</i>
	9	<i>Chaetomium elatum</i>
	13	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>
	14	<i>Chaetomium nigricolor</i>
	15	<i>Phoma herbarum</i>
<i>L. occidentalis</i> no esterilizados	3	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	4	<i>Aspergillus sp.</i>
	6	<i>Cladosporium sp.</i>
	8	<i>Trichoderma citrinoviride</i>
	10	<i>Coniothyrium olivaceum</i>
	11	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Cerambyx welensii</i>	12	<i>Didymella macrostoma</i>
	18	<i>Trichoderma reesei</i>
	19	Sin identificar
	20	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>Heliotaurus ruficollis</i>	23	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Tentyria platyceps</i>	17	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>
<i>Musca autumnalis</i>	25	<i>Leptobacillium leptobactrum</i>
<i>Stomoxys calcitrans</i>	21	<i>Ustilaginoidea virens</i>
Coleópteros no identificados	16	<i>Trichoderma reesei</i>
	22	<i>Fusarium sp.</i>
	24	<i>Penicillium sp.</i>

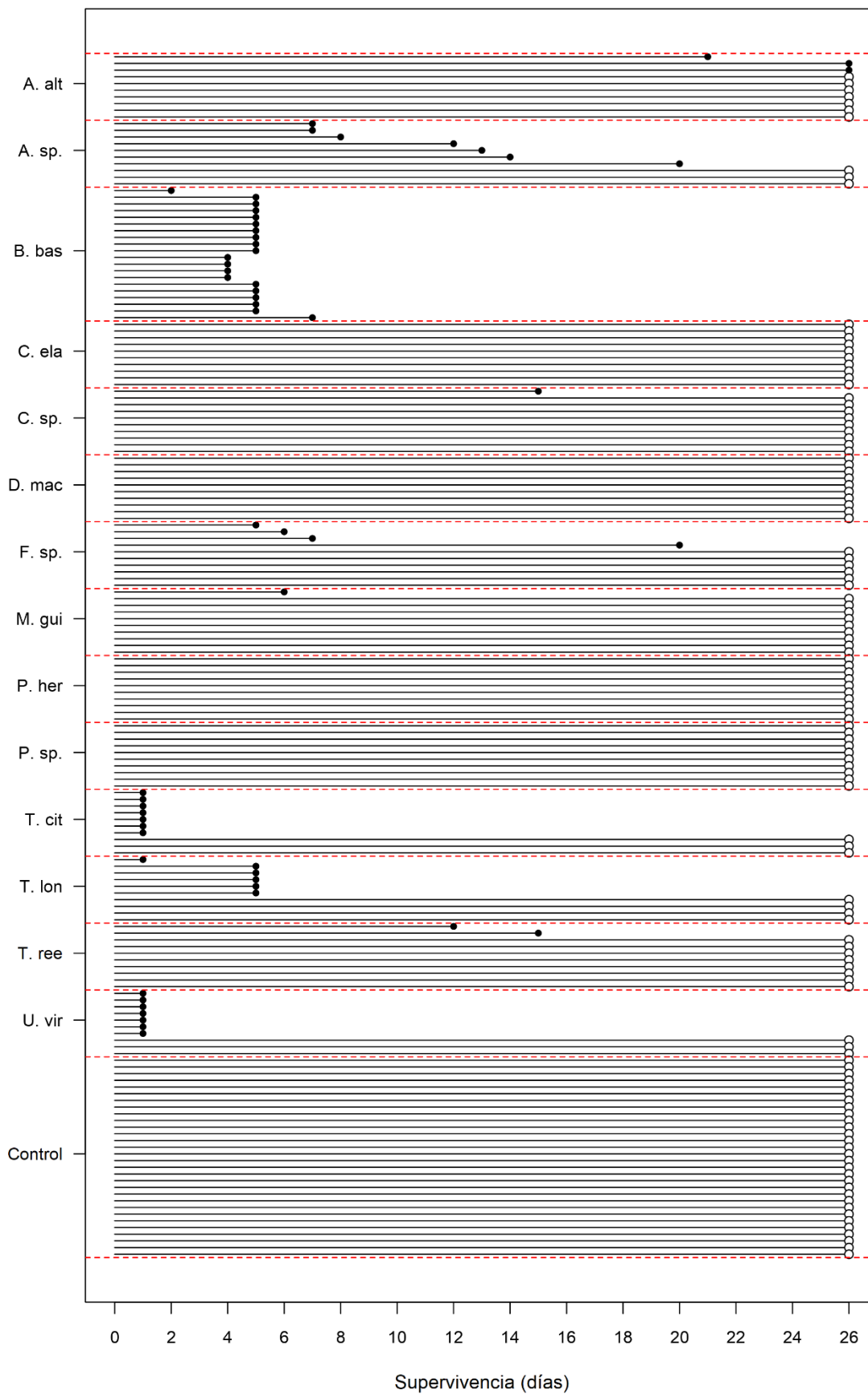
**Tabla 1.** Resultados de la identificación de los hongos empleados en este estudio

En la tabla aparecen los nombres científicos de los hongos identificados a partir de todas aquellas muestras de las que ha sido posible obtener un resultado claro. Se puede observar que el hongo 19 no se ha podido secuenciar correctamente. Tampoco aparecen todos los insectos recogidos en La Alamedilla, ya que hubo casos en los que no creció nada en la placa tras la esterilización, o aparecía tanta contaminación bacteriana que hacía imposible su aislamiento. En este caso, se comprobó visualmente que los hongos que aparecían en las placas contaminadas ya habían sido aislados en placas anteriores.

### 4.3. Análisis estadístico

A continuación, se muestran los resultados de supervivencia de los dos ensayos realizados, tanto el de contacto directo en placa (fig. 21), como el de aerosol (fig. 22). En las gráficas, cada línea representa un ejemplar de *T. molitor*, con los puntos negros indicando la fecha de la muerte del insecto, mientras que los puntos blancos indican que el individuo sobrevivió hasta el final del ensayo.

En el eje horizontal se representa el número de días de seguimiento de la supervivencia. Se puede observar que no se contabilizaron muertes en el grupo de control del ensayo en placa al final del ensayo, pero si se contabilizó una en un insecto control del ensayo con aerosol.



**Figura 21.** Resultados de supervivencia del ensayo por contacto directo en placa

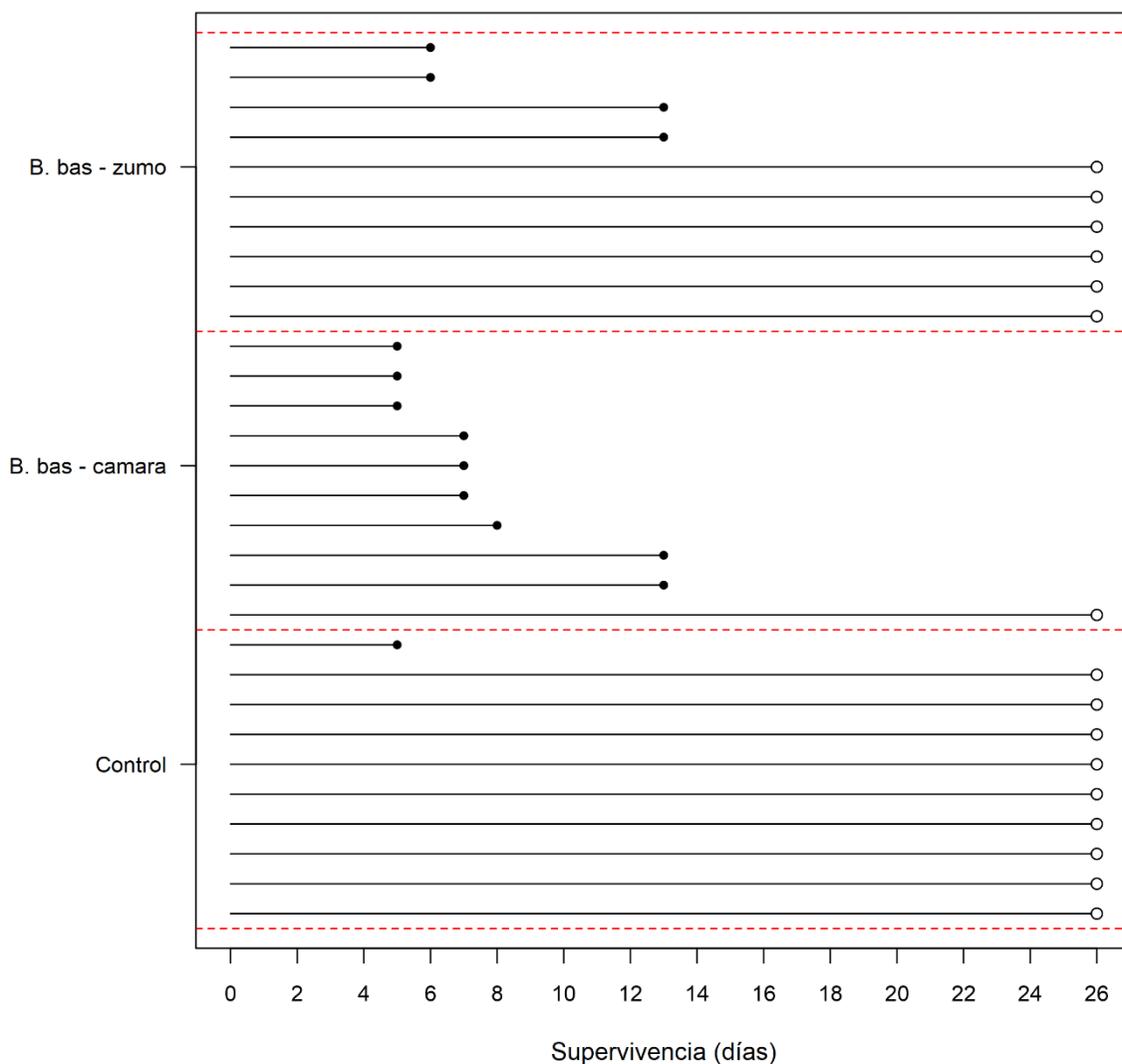
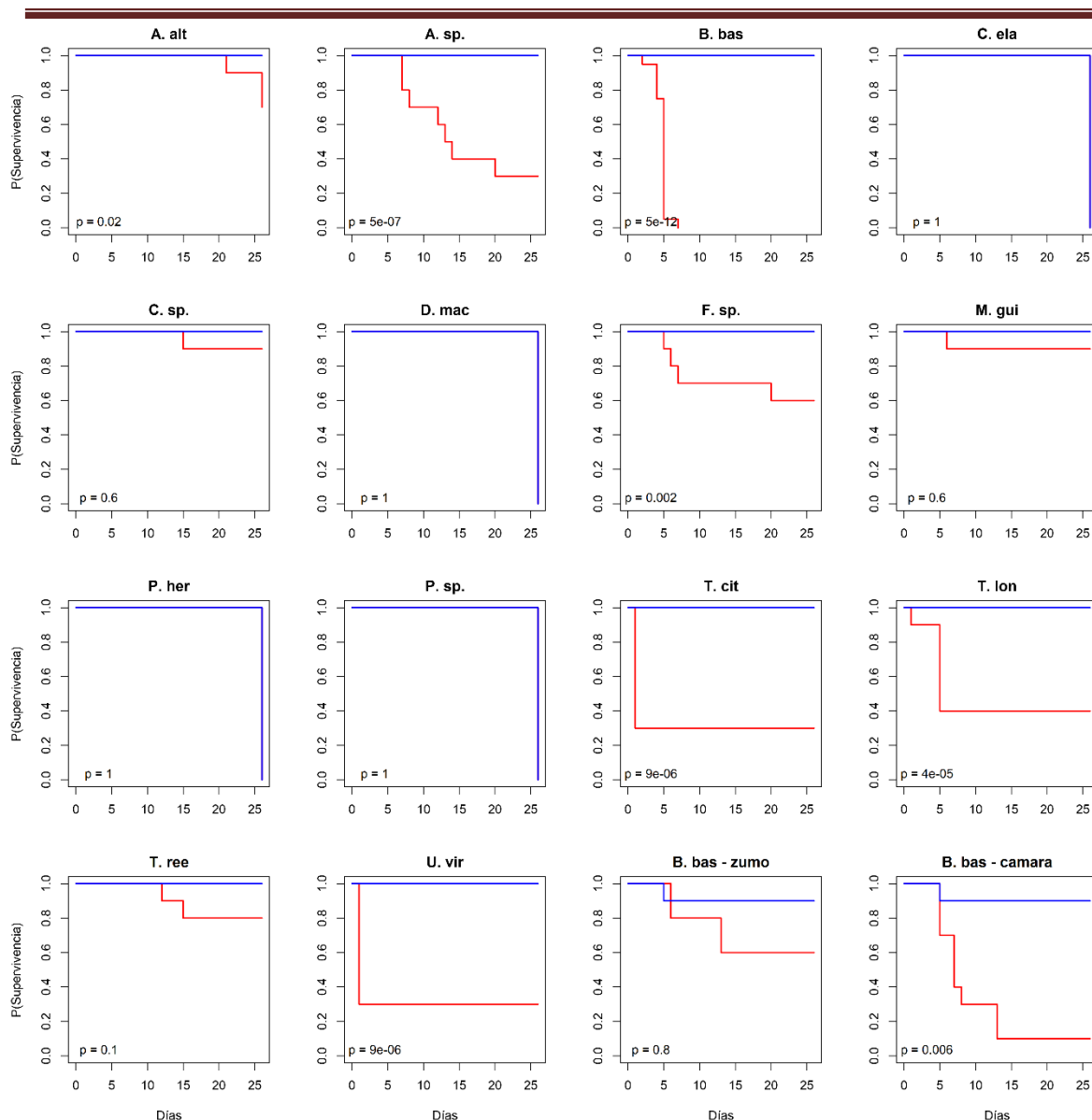


Figura 22. Resultados de supervivencia del ensayo con aerosol

La figura 23 aparecen representadas las curvas de supervivencia. En cada gráfica, la curva azul representa el grupo de control y la roja, el hongo. El p-valor que aparece en la esquina inferior izquierda puede ser interpretado como de efecto significativo si es menor de 0,05, es decir, en estos casos el hongo mata más que lo que se esperaría por azar. Se puede observar que la curva del control es plana en todos los hongos utilizados en el ensayo en placa debido a que no se registraron muertes. En aquellas gráficas en las que sólo hay curva azul es porque el hongo tampoco produjo mortalidad, estando la curva roja justo debajo.



**Figura 23.** Curvas de supervivencia de los ensayos fúngicos

Algunos comentarios que se pueden hacer relativos a las curvas es que hay diferencias muy pequeñas (por ejemplo, gráfica de *Alternaria alternata*) que son significativas ( $p < 0.05$ ), y eso se debe a que el control tiene un tamaño muestral amplio y no tiene variabilidad (no hay muertes), lo que ayuda a detectar hasta los cambios más pequeños. Ahora bien, que sea estadísticamente significativo no implica que sea biológicamente interesante, y es posible que una diferencia tan pequeña no lo sea.

En el ensayo no se comparó la eficacia de unos hongos contra otros debido a que el estudio se diseñó para contrastar la eficacia de cada hongo en relación al control, y en base a eso se estimó un tamaño muestral que permitiera detectar esas variaciones. Si se incrementara el número de contrastes de hipótesis, el tamaño muestral escogido no sería suficiente para mantener una potencia estadística razonable, y se obtendrían muchos falsos negativos entre los resultados. Habría que rediseñar el estudio para que fuera posible tener en cuenta las citadas comparaciones dos a dos entre hongos.

## 5. Discusión

De los hongos obtenidos de los insectos se puede confirmar que el hongo 20 es *Beauveria bassiana*, lo que coincide con la sintomatología que presentaban los insectos inoculados con él, y lo que explica también su alta eficacia entomopatógena probada en otros estudios como los de Moino *et al.*, 2001 y Sacristán y Pajares, 2017. *B. bassiana* es un hongo ascomiceto mitosporico que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su uso como insecticida ya ha sido probado en el manejo de numerosas plagas de artrópodos agrícolas, veterinarios y forestales (Mascarin & Jaronski, 2016). La aplicación de cepas de este hongo ha sido estudiada para el control de plagas como el picudo rojo; *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (1790), Coleoptera Curculionidae, (Dembilio *et al.*, 2010; Francardi *et al.*, 2013), *Cylas formicarius* Fabricius (1798) (Coleoptera Brentidae) (Yasuda, 1999) o de *Popillia japonica* Newman (1838) Coleoptera, Scarabaeidae (Klein y Lacey, 1999).

Han aparecido también varias especies de *Trichoderma* sp.: los hongos de este género son mohos que pueden colonizar diferentes tipos de sustratos, incluidos paredes, alimentos, el suelo y los tejidos vegetales. Algunas especies de *Trichoderma* pueden producir metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lo que les permite competir con otros organismos en su entorno (Contreras *et al.*, 2018). En algunos estudios se ha observado que ciertas especies de *Trichoderma* pueden tener efectos tóxicos o inhibir el desarrollo de algunas especies de insectos. Sin embargo, es importante destacar que no todas las especies de *Trichoderma* tienen este efecto y que la capacidad insecticida puede variar dependiendo de la especie de insecto y del aislado específico de *Trichoderma* utilizado (Macías *et al.*, 2020). Además, los mecanismos exactos mediante los cuales *Trichoderma* puede afectar a los insectos no están completamente claros y son objeto de investigación continua (Ferreira & Musumeci, 2021).

También se ha identificado el género *Aspergillus*, formado por hongos filamentosos y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Si bien la mayoría de las especies de *Aspergillus* se consideran principalmente saprófitas y se asocian con la descomposición de materia orgánica, algunas especies tienen la capacidad de ser patógenas o simbioses facultativos de insectos (Pfliegler *et al.*, 2019). En particular, una especie bien conocida de este género, *Aspergillus flavus*, ha sido estudiada en relación con su interacción con los insectos. Esta especie puede infectar los insectos y establecer una relación simbiótica facultativa. Algunos estudios han demostrado que las esporas de *A. flavus* pueden adherirse a la cutícula de los insectos y germinar, lo que resulta en la colonización interna del insecto. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la capacidad de *Aspergillus* para infectar insectos puede variar entre las diferentes especies del género y los diferentes tipos de insectos. No todas las especies de *Aspergillus* tienen esta capacidad y las interacciones específicas pueden depender de factores ambientales y de la especificidad huésped-parásito (Scully & Bidochka, 2009). Su alta eficacia relativa con *T. molitor* es muy probable que se deba a que el hongo se encontraba muy esporulado en las placas, apareciendo como un fino polvo negro que cubría por completo al insecto y que taponaba los espiráculos de las tráqueas respiratorias.

Entre los restos de un coleóptero que no pudo ser identificado hasta nivel de género/especie, apareció *Fusarium* sp., otro género de hongos filamentosos que se encuentran en el suelo y en plantas.

A diferencia de algunos otros géneros de hongos como *Beauveria* o *Metarhizium*, *Fusarium* no se considera tradicionalmente como un hongo entomopatógeno especializado, es decir, no se asocia típicamente con la infección y el control de insectos (Sharma & Marques, 2018). Sin embargo, algunos estudios han reportado casos de infecciones por *Fusarium* en insectos, como en el caso de *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera; Cynipidae) (Muñoz-Adalia *et al.*, 2012). Estas infecciones pueden ocurrir cuando los insectos entran en contacto con esporas o con estructuras fúngicas de *Fusarium* presentes en su entorno.

Algunas especies de *Fusarium* han sido identificadas como patógenos secundarios en insectos que están debilitados o dañados, pero no suelen ser tan eficaces como los hongos entomopatógenos especializados (Da Silva *et al.*, 2020). Es importante destacar que la capacidad de *Fusarium* para infectar insectos y su efectividad como agente de control biológico no está tan extensamente estudiado como otros hongos entomopatógenos debido a que, en general, este género se considera principalmente un fitopatógeno, y su estudio se centra principalmente en sus interacciones con plantas (Sharma & Marques, 2018).

También merece la pena comentar la presencia de *Meyerozyma guilliermondii*, que se trata de una levadura que se encuentra comúnmente en diversos entornos, incluyendo el suelo, las plantas y los insectos (Wrent *et al.*, 2016). Si bien esta levadura es conocida por su versatilidad y capacidad de adaptación a diferentes condiciones, no se considera un hongo entomopatógeno especializado (Corte *et al.*, 2015), sino que su papel principal en la naturaleza se asocia más a interacciones con otros organismos, como las plantas. Algunos estudios han demostrado que *M. guilliermondii* puede formar relaciones simbióticas con insectos, como ciertas especies de escarabajos y moscas, en las que se ha encontrado presente en los tractos digestivos o en otras partes del cuerpo (Sharma *et al.*, 2018).

Por lo que se refiere a los distintos ensayos llevados a cabo, en el ensayo del aerosol, se observa que el resultado del registro de mortalidad fue superior en el caso de la inoculación aparte y la cámara húmeda solo con agua que en de la inoculación directa en la cámara húmeda. Esto podría deberse a que la propia humedad de la cámara evitó que las esporas se fijaran a la cutícula al formarse una película alrededor de los insectos.

## 6. Conclusiones

En relación a los objetivos específicos planteados en este estudio, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Se han identificado un total de 11 especies de insectos, alguno de los cuales constituyen plagas de masas forestales, como *L. occidentalis* y *C. welensii*, mientras que otros especímenes aparecidos son ocasionales en el biotopo, utilizando éste como zona de refugio o alimentación.
- Se ha logrado identificar 24 de los 25 hongos obtenidos a partir de los insectos asociados a masas forestales recolectados, algunos de ellos con potencial entomopatógeno probado, como *Beauveria bassiana* y otros potenciales como, *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., o *Fusarium* sp.
- Los resultados del ensayo fúngico sobre insectos vivos muestran que la mayor eficacia entomopatógena se ha dado con *B. bassiana*, siendo más efectivo el método de inoculación por contacto que el método de inoculación por suspensión esporal.

## Agradecimientos:

En primer lugar, agradezco a Julio y Mercedes la oportunidad de hacer este trabajo con ellos, la tremenda labor de identificar los restos recogidos en campo y la paciencia que han tenido durante todo el camino. A la buena gente del laboratorio: a Álvaro por la infinita ayuda, las charlas y los escarabajos; a Edu y Raquel por las horas compartidas extrayendo ADN; a Irene por los ánimos cuando las cosas no salían y la propuesta del calentón; a Sergio por la parte estadística; y a Wilson, al que espero que le vaya genial allá donde esté. A mi padre, que ha llegado a tener más ganas de que entregue este trabajo que yo, y sin el que no habría llegado hasta aquí. A mis hermanas y sobrinos. Y sobre todo a mi madre, a quien dedico este trabajo, por enseñarme a ver el lado bueno de la vida. Espero que estés orgullosa de lo logrado.

## 7. Bibliografía

- ABDEL-RAHE M., 2019. Isolation, mass production and application of entomopathogenic fungi for insect pests control. Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications. 28 November 2019, 231-251. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0_7)
- AHN S. J., SON D., CHOO H. Y. & PARK C. G., 2013. The first record on *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) in Korea, a potential pest of the pinaceous tree species. J Asia Pac Entomol 16(3), 281-284.
- ANWAR W., NAWAZ K., JAVED M. A., AKHTER A., SHAHID A. A., HAIDER M. S., UR REHMAN M. Z. & ALI S., 2020. Characterization of fungal flora associated with sternorrhyncha insects of cotton plants. Biologia 76, 533-547 (2021). <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00549-0>
- AVERY P. B., BOJORQUE V., GÁMEZ C., DUNCAN R. E., CARRILLO D. & CAVE R. D., 2018. Spore acquisition and survival of ambrosia beetles associated with the laurel wilt pathogen in avocados after exposure to entomopathogenic fungi. Insects. 2018 Jun; 9(2): 49. <https://doi.org/10.3390/insects9020049>
- BERNARDINELLI I., ZANDIGIACOMO P., 2001. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae): a conifer seed bug recently found in northern Italy. J For Sci 47(2), 56-58.
- CASSAGO A., PANEPUCCI R., BAIÃO A. & HENRIQUE-SILVA F., 2002. Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. BMC Microbiol 2, 14 (2002). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-14>
- CONTRERAS CORNEJO H. A., MACÍAS RODRÍGUEZ L., DEL VAL E. & Larsen J., 2018. Interactions of *Trichoderma* with Plants, Insects, and Plant Pathogen Microorganisms: Chemical and Molecular Bases. In: Merillon, JM., Ramawat, K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8\\_23-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_23-1)

- CORTE L., DI CAGNO R., GROENEWALD M., ROSCINI L., COLABELLA C., GOBBETTI M. & CARDINALI G., 2015. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. Food Microbiology, volume 48, 2015, ps 206-215, ISSN 0740-0020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.014>
- DA SILVA SANTOS A. C., GONÇALVES DINIZ A., VIEIRA TIAGO P. & TINTI DE OLIVEIRA N., 2020. Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. Fungal Biology Reviews, volume 34, issue 1, 2020, pages 41-57, ISSN 1749-4613. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.12.002>
- DEMBILIO, Ó., QUESADA-MORAGA, E., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. y JACAS, J.A., 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 104, no. 3, pp. 214-221.
- FAÚNDEZ E. I., ROCCA J. R., 2017. La chinche de las coníferas occidental, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) en Chile; rápida expansión, posibles impactos y desafíos. Rev Chil Entomol 42, 25-27.
- FENT M. & KMENT P., 2011. First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. North-West J Zool 7(1), 72-80.
- FERREIRA F. V. & MUSUMECI M. A., 2021. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. World J Microbiol Biotechnol 37, 90 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>
- FRANCARDI V., BENVENUTI C., BARZANTI G. y ROVERSI P., 2013. Autocontamination trap with entomopathogenic fungi: a possible strategy in the control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). Redia, vol. 96, no. October, pp. 57-67.
- FRANCO F. P., TÚLER A. C., GALLAN D. Z., GONÇALVES F. P., FAVARIS A. P., PEÑAFLORES M. F. G. V., LEAL W. S., MOURA D. S., BENTO J. M. S. & SILVA-FILHO M. C., 2021. Fungal phytopathogen modulates plant and insect responses to promote its dissemination. The ISME Journal volume 15, pages 3522–3533 (2021). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac035>
- GALL W. K., 1992. Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae): Well-documented dispersal of a household nuisance. Great Lakes Entomol 25(3), 159-171.
- GALLEGO D., MÁS H., GONZÁLEZ-ROSA E. & SÁNCHEZ-GARCÍA, F. J., 2013. Primeros resultados sobre el origen de las poblaciones de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 en la península Ibérica. 6º Congreso Forestal Español. Vitoria, España, jun 10-14.



- GONZALEZ PEÑA C, 1979. Contribución al conocimiento del género *Bolbelasmus* sp. (*Col. Geotrupidae*): su hábitat, sus costumbres y su distribución en Aragón. Bol. Asoc. Esp. Entom., Vol. 3: páginas 23-27, Salamanca, noviembre 1979
- GOULI V., GOULI S., MARCELINO J. A. P., SKINNER M. & PARKER B. L., 2013. Entomopathogenic fungi associated with exotic invasive insect pests in northeastern forests of the USA. *Insects* 2013, 4(4), 631-645. <https://doi.org/10.3390/insects4040631>
- GÜERRI-AGULLÓ B., GÓMEZ-VIDAL S., ASENSIO L., BARRANCO P. & LOPEZ-LLORCA L. V., 2010. Infection of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: a SEM study. *Volumen* 73, Issue 7, Julio 2010, 714-725. <https://doi.org/10.1002/jemt.20812>
- INGLIS G.D., GOETTEL M.S., BUTT T.M., STRASSER H., 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. En Butt, T.M., Jackson, C.W. y Magan, N. (eds.) - *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial*. CABI Internacional, Wallingford, U.K. Capitulo 3, 23-69.
- ISLAM W., ADNAN M., SHABBIR A., NAVEED H., ABUBAKAR Y. S., QASIM M., TAYYAB M., NOMAN A., NISAR M. S., KHAN K. A. & ALI H, 2021. Insect-fungal interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis*, Volume 159, 2021, 105122, ISSN 0882-4010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>
- JABER S., MERCIER A., KNIO K., BRUN S. & KAMBRIS Z., 2016. Isolation of fungi from dead arthropods and identification of a new mosquito natural pathogen. *Parasites Vectors* 9, 491 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1763-3>
- JAMÂA M.B., MEJRI M., NAVES P. & SOUSA E., 2013. Detection of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) in Tunisia. *African Entomol* 21(1), 165-167.
- KASSAMBARA A., KOSINSKI M., BIECEK P., 2021. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- KLEIN M.G. y LACEY L.A., 1999. An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, vol. 9, no. 2, pp. 151-158.
- KOERBER T.W., 1963. *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a newly discovered pest of coniferous seed. *Ann Entomol Soc Am* 56(2), 229-234.
- MACÍAS RODRÍGUEZ L., CONTRERAS CORNEJO H. A., ADAME GARNICA S. G., DEL VAL E. & Larsen J., 2020. The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. *Microbiological Research*, volume 240, 2020, 126552, ISSN 0944-5013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126552>

- MANTZOUKAS S., LAGOIANNIS I., MPEKIRI M., PETTAS I., & ELIOPOULOS P. A., 2019. Insecticidal action of several isolates of entomopathogenic fungi against the granary weevil *Sitophilus granarius*. Agriculture, 2019, vol. 9, issue 10, 1-13.
- MASCARIN G.M. & JARONSKI S.T., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World J Microbiol Biotechnol 32, 177 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- MCNEILL J., 2009. Fungi for the biological control of insect pests. <https://eorganic.org/node/2597>
- MEYER J. M. & HOY M. A., 2008. Removal of fungal contaminants and their DNA from the surface of *Diaphorina citri* (hemiptera: psyllidae) prior to a molecular survey of endosymbionts. Florida Entomologist, 91(4):702-705 (2008). <https://doi.org/10.1653/0015-4040-91.4.702>
- MOINO A., ALVES S. B., BIAGGIONI LOPES R., OLIVEIRA P. M., NEVES J., PEREIRA R. M. & VIEIRA S. A., 2001. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. Entomology, Sci. agric. (Piracicaba, Braz.) 59 (2). <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000200010>
- MOLINA ARIAS M, ORTEGA PÁEZ E, OCHOA SANGRADOR C, 2022. Estudios de supervivencia. Método de Kaplan-Meier. Evid Pediatr. 2022;18:20.
- MUÑOZ-ADALIA, E.J., RODRÍGUEZ, D., CASADO, M., Díez J.J., FERNÁNDEZ, M.M. Fungal community of necrotic and healthy galls in chestnut trees colonized by *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae) Doi: 10.3832/for3014-012, vol. 12, pp. 411-417.
- PACHECO HERNÁNDEZ M. L, RESÉNDIZ MARTÍNEZ J. F. & ARRIOLA PADILLA V. J., 2019. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México. Revista mexicana de ciencias forestales vol.10 n. 56 México nov./dic. 2019.
- PÉREZ C., N. 2004. Manejo ecológico de plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural- CEDAR. La Habana, Cuba. Ed. ACTAF, 191-223
- PÉREZ N., 2012. Primera Cita de la Chinche Americana del Pino *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) en la Provincia de León. S.E.A. 51, 311-312.
- PFLIEGLER W. P, PÓCSI I., GYÖRI Z. & PUSZTAHELYI T., 2019. The *Aspergilli* and their mycotoxins: metabolic interactions with plants and the soil biota. Front Microbiol. 2019; 10: 2921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02921>

- PONCE HERRERO L., OLIVEIRA FARINHA A., PANDO FERNÁNDEZ V., PAJARES ALONSO J. A. & ALVES SANTOS F. M., 2022. Native egg parasitoids on *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) in Spain: Potential biological control agents? Journal of applied entomology, volume 146, Issue5, June 2022, pages 525-538. <https://doi.org/10.1111/jen.12974>
- RAUPACH M. J., HANNIG K., MORINIÉRE J. & HENDRICH L., 2018. A DNA barcode library for ground beetles of Germany: the genus *Amara* Bonelli, 1810 (Insecta, Coleoptera, Carabidae). 2018 May 17;(759):57-80. doi: 10.3897/zookeys.759.24129. eCollection 2018.
- RUBIO S., GUZMÁN L. & NAVARRETE J. L., 2000. Especies entomopatógenas (Fungi: Ascomycota) en México. Boletín del Instituto de Botánica 7: 135-157.
- SACRISTÁN VELASCO A. & PAJARES ALONSO J. A., 2017. Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber. URI: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/28492>
- SAIN S. K., MONGA D., KUMAR R., NAGRALE D. T., KRANTHI S. & KRANTHI K. R., 2021. Comparative effectiveness of bioassay methods in identifying the most virulent entomopathogenic fungal strains to control *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). J Invertebr Pathol, 2021 Jul; 183: 107618. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107618>
- SCULLY L. R., BIDOCHKA M. J., 2009. An alternative insect pathogenic strategy in an *Aspergillus flavus* auxotroph. Mycological Research, volume 113, issue 2, 2009, pages 230-239, ISSN 0953-7562. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.10.007>
- SHARMA L., BOHRA N., RAIPUT V. D., QUIROZ-FIGUEROA F. R., SINGH R. K. & MARQUES G., 2020. Advances in entomopathogen isolation: a case of bacteria and fungi. Microorganisms 2021, 9(1), 16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>
- SHARMA L., GONÇALVES F., OLIVEIRA I., TORRES L. & MARQUES G., 2018. Insect-associated fungi from naturally mycosed vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), Biocontrol Science and Technology, 28:2, 122-141. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1428733>
- SHARMA L. & MARQUES G., 2018. *Fusarium*, an entomopathogen - A myth or reality? Pathogens 2018, 7(4), 93. <https://doi.org/10.3390/pathogens7040093>
- SPENCE E. L., CHANDLER D., EDGINGTON S., BERRY S. D., MARTIN G., O'SULLIVAN C., SVENDSENA C. & HESKETHA H., 2020. A standardised bioassay method using a bench-top spray tower to evaluate entomopathogenic fungi for control of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Pest Manag Sci. 2020 Jul;76(7): 2513-2524. <https://doi.org/10.1002/ps.5794>

- TAYLOR S. J., TESCARI G., VILLA M., 2001. A nearctic pest of Pinaceae accidentally introduced into Europe: *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Northern Italy. Entomol News 112(2), 101-103.
- TEJEDA REYES M. A., RODRÍGUEZ MACIEL J. C., ALATORRE ROSAS R., LAGUNES TEJEDA A. & VARGAS HERNÁNDEZ M., 2021. A new methodology to evaluate entomopathogenic fungi and formulated insecticides to control adults of *Aedes aegypti* (diptera: culicidae). Florida Entomologist, 101(3):511-514 (2018). <https://doi.org/10.1653/024.101.0311>
- THERNEAU T., 2022. A Package for Survival Analysis in R\_. R package version 3.4-0. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
- TORRES VILA L. M., MENDIOLA DÍAZ F. J., CONEJO RODRÍGUEZ Y. & SÁNCHEZ GONZÁLEZ, 2016. Reproductive traits and number of matings in males and females of *Cerambyx welensii* (Coleoptera: Cerambycidae) an emergent pest of oaks. Bulletin of Entomological Research, 106(3), 292-303. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000747>
- TORRES VILA L. M., MENDIOLA DÍAZ F. J., LÓPEZ R., SÁNCHEZ Á., PONCE F., FERNÁNDEZ F., ZUGASTI C. DE JUAN J. M., ECHEVARRÍA LEÓN E., CÁCERES Y. & PARÍS M., 2022. Distribución actualizada del género *Cerambyx* Linneo, 1758 (Coleoptera: Cerambycidae) en Extremadura: desde los registros históricos al muestreo a escala nacional. Graellsia, 78(2): e169 julio-diciembre 2022, ISSN-L: 0367-5041. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2022.v78.340>
- TORRES VILA L. M., SÁNCHEZ GONZÁLEZ A., PONCE ESCUDERO F., MARTÍN VERTEDOR D. & FERRERO GARCÍA J. J., 2012. Assessing mass trapping efficiency and population density of *Cerambyx welensii* Küster by mark-recapture in dehesa open woodlands. Eur J Forest Res 131, 1103–1116 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0579-0>
- WRENT P., RIVAS E. M., PEINADO J. M. & DE SILÓNIZ M. I., 2016. Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. International Journal of Food Microbiology, volume 217, 2016, ps 1-6, ISSN 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.008>
- XIAOYAN L., YINGFANG B., RENXIANG M., ZHAOYUN C., ZHENZHEN C., ZHIWEI Z. & MINGXUE C., 2018. Isolation, identification, and characterization of *Ustilaginoidea virens* from rice false smut balls with high ustilotoxin production potential. J Basic Microbiol. 2018 Aug; 58(8): 670-678. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800167>
- YASUDA K., 1999. Auto-infection system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* using a modified sex pheromone trap in the field. Applied Entomology and Zoology, vol. 34, no. 2, pp. 501-505.

## 8. Anexos

### 8.1. Proporciones de la mezcla para la PCR

La siguiente tabla recoge el volumen de cada reactivo que hay que añadir a un tubo de microcentrifuga para realizar una PCR en función del número de muestras a colocar en el termociclador:

Muestras	Agua MiliQ (µl)	Green Mix (µl)	Forward (µl)	Reverse (µl)	Volumen final (µl)
1	15,75	6,25	1	1	24
2	31,5	12,5	2	2	48
3	47,25	18,75	3	3	72
4	63	25	4	4	96
5	78,75	31,25	5	5	120
6	94,5	37,5	6	6	144
7	110,25	43,75	7	7	168
8	126	50	8	8	192
9	141,75	56,25	9	9	216
10	157,5	62,5	10	10	240
11	173,25	68,75	11	11	264
12	189	75	12	12	288
13	204,75	81,25	13	13	312
14	220,5	87,5	14	14	336
15	236,25	93,75	15	15	360
16	252	100	16	16	384
17	267,75	106,25	17	17	408
18	283,5	112,5	18	18	432
19	299,25	118,75	19	19	456
20	315	125	20	20	480
21	330,75	131,25	21	21	504
22	346,5	137,5	22	22	528
23	362,25	143,75	23	23	552
24	378	150	24	24	576
25	393,75	156,25	25	25	600
26	409,5	162,5	26	26	624
27	425,25	168,75	27	27	648
28	441	175	28	28	672
29	456,75	181,25	29	29	696
30	472,5	187,5	30	30	720
31	488,25	193,75	31	31	744
32	504	200	32	32	768
33	519,75	206,25	33	33	792
34	535,5	212,5	34	34	816
35	551,25	218,75	35	35	840
36	567	225	36	36	864
37	582,75	231,25	37	37	888
38	598,5	237,5	38	38	912
39	614,25	243,75	39	39	936
40	630	250	40	40	960

**Tabla 2.** Proporciones de la mezcla de reactivos para la PCR

## 8.2. Resultados del espectrofotómetro

Las siguientes tablas recogen todos los resultados de la medida de la concentración por absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro del Laboratorio de Técnicas Instrumentales, ordenadas por fecha, excepto la última tabla que recoge los resultados de las muestras enviadas:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
2	20,4	1,74	0,0541
5	31,2	1,42	0,0865
8	25,1	1,40	0,157
11	18,7	1,47	0,192
14	17,2	1,60	0,396
21	9,8	1,50	0,195
24	7,9	1,50	0,166

**Tabla 3.** Resultados del día 30-3-2023

Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
3	383	1,05	0,85
4	9,6	2,26	10,7
6	24,8	2,20	4,28
7	195	1,31	0,685
10	18,9	1,09	0,382
13	55,1	1,76	1,43
15	-4,2	1,12	0,913
18	$1,05 \cdot 10^3$	1,09	0,665
19	512	1,24	0,688
20	-14,4	1,77	0,652
21	-23,7	0,994	0,944
23	83,7	2,05	1,35
25	19,4	-6,36	-2,13

**Tabla 4.** Resultados del día 13-4-2023

Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
3	78,5	1,21	1,28
4	19,5	1,33	43,3
10	25,5	1,42	3,25
13	3,2	0,877	-0,172
17	18,6	1,52	-2,31
18	16,6	1,17	0,816
19	87,1	2,10	3,08
20	5,2	1,89	-0,435
21	15,4	1,02	11,4
22	23,9	2,14	-3,76
23	27,1	1,72	20,1
25	1,5	-2	-0,0671

**Tabla 5.** Resultados del día 18-4-2023

Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
1	38,9	1,22	0,827
3	15	1,79	0,971
4	19,9	1,66	0,717
6	24	1,64	0,791
7	9,7	1,59	0,716
8	19,7	1,59	0,922
9	35,5	1,28	1,02
10	9,1	1,32	0,286
12	111	1,48	1,19
13a	20,5	1,94	1,21
13b	7	1,82	0,541
15	51,2	1,71	1,25
16	80,7	1,82	1,13
17	4,8	1,85	1,05
18	0,1	-0,2	0,00656
19	3,1	2,07	0,371
20	18,3	1,68	0,593
21	2,75	2,04	0,124
22	11	1,7	0,559
23a	13,3	1,42	0,494
23b	15,2	1,57	0,541
24	16,4	1,38	1,05
25	25,8	1,35	1,03

**Tabla 6.** Resultados del día 3-5-2023

Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
1	38,9	1,22	0,827
2	20,4	1,74	0,0541
3	15	1,79	0,971
4	19,9	1,66	0,717
5	31,2	1,42	0,0865
6	24	1,64	0,791
7	9,7	1,59	0,716
8	19,7	1,59	0,922
9	35,5	1,28	1,02
10	25,5	1,42	3,25
11	18,7	1,47	0,192
12	111	1,48	1,19
13	20,5	1,94	1,21
14	17,2	1,60	0,396
15	51,2	1,71	1,25
16	80,7	1,82	1,13
17	4,8	1,85	1,05
18	16,6	1,17	0,816
19	3,1	2,07	0,371
20	18,3	1,68	0,593
21	2,75	2,04	0,124
22	11	1,7	0,559
23	15,2	1,57	0,541
24	16,4	1,38	1,05
25	25,8	1,35	1,03

**Tabla 7.** Resultados del espectrofotómetro de las muestras enviadas

Las muestras de ADN extraído de los hongos recogidas en la tabla 9 son las que fueron seleccionadas para enviar a secuenciar debido a que, de todas las mediciones realizadas en el espectrofotómetro del LTI, y que aparecen en el anexo 8.3, no todas cumplen con los requisitos mínimos de concentración y absorbancia exigidos por el laboratorio para realizar la identificación usando secuencias ITS. Para ello, es necesaria una concentración mínima de 20 ng/μl y unos valores de absorbancia 260/280 entre 1,8 y 2,1 serían los óptimos, siendo aceptables valores entre 1,6 y 1,7, con valores menores de 1,6 indicando contaminación por fenoles, y por encima de 2,1 indican contaminación por ARN. Aquellas muestras que tienen una concentración inferior a la señalada se seleccionaron en base a sus buenos resultados de absorbancia, ya que es preferible enviar una muestra con poco ADN "limpio" que muestras con mayores concentraciones, pero muy contaminadas.

### 8.3. Insectos de interés en patologías forestales

#### *Leptoglossus occidentalis* como insecto asociado a pinares

La chinche americana de las piñas es una plaga que está incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (Real Decreto 630/2013), que recoge, entre otras, las especies exóticas que constituyen una amenaza para los recursos económicos asociados al uso del patrimonio natural. Al depender la alimentación de esta chinche de las piñas de las coníferas, su presencia se ha asociado a la disminución del rendimiento de la producción de semillas (Ponce *et al.*, 2022), lo que supone un perjuicio económico para todos aquellos sectores dedicados a la producción y venta de piñones.

Las dimensiones de *L. occidentalis* están entre 15 y 20 mm de longitud y entre 5 y 7 mm de anchura. Entre sus características morfológicas destacan el ensanchamiento de las tibias de las patas posteriores en forma de hoja, la parte inferior membranosa de las alas anteriores en forma de V invertida y el dorso del abdomen de color amarillo con 5 manchas negras, que resulta visible durante el vuelo. En ocasiones hay dimorfismo sexual en el tamaño, ya que las hembras pueden presentar dimensiones superiores (Bernardinelli y Zandigiaco, 2001).

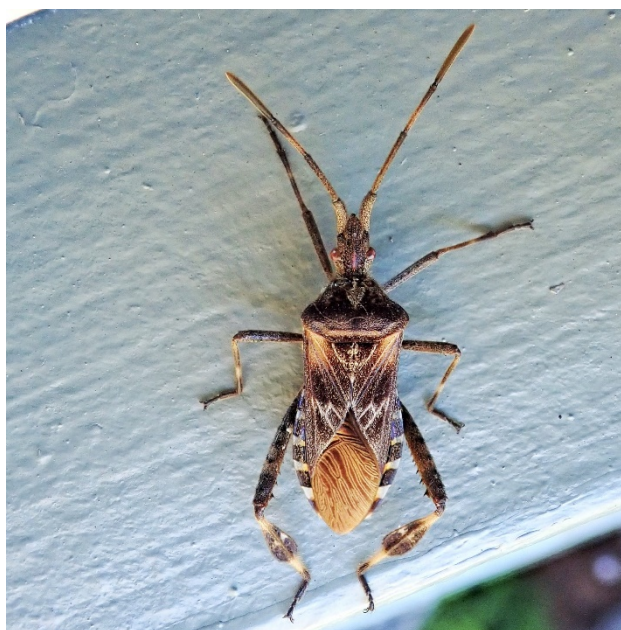


Figura 24. *Leptoglossus occidentalis*

La puesta es realizada en tiras longitudinales sobre las acículas, siendo el tamaño medio de los huevos de 2 x 1 mm, su número oscila entre 1 y 20, y eclosionan aproximadamente a las 2 semanas. Las ninfas pasan por 5 estadios ápteros antes de alcanzar el estado de adulto, aproximadamente a las 8 semanas, momento en el que se desarrollan las alas.



*L. occidentalis* se observó por primera vez en el año 1880 en California y fue descrito por Heidemann en 1910 (Gall, 1992). Las colecciones entomológicas permiten afirmar que el chinche de las piñas es una especie nativa del oeste de Norteamérica, abarcando desde el sur de la Columbia Británica hasta México y desde el oeste de Colorado hasta la costa pacífica (Koerber, 1963). Posteriormente fue citado a lo largo de Estados Unidos, y alcanzó la costa atlántica entre 1985 y 1990 (Gall, 1992), lo que supone una velocidad de dispersión entre ambas costas de 3.000 km en 90 años. Actualmente, *L. occidentalis* está presente en Turquía y Túnez, dónde se registró por primera vez en 2009 y 2010, respectivamente (Fent y Kment, 2011; Jamâa *et al.*, 2013). En el año 2012 se detectó en Korea (Ahn *et al.*, 2013) y recientemente ha sido encontrada en Chile (Faúndez, *et al.*, 2017). La primera referencia del chinche en Europa se citó en el norte de Italia en 1999 (Taylor *et al.*, 2001), desde donde se ha extendido prácticamente por todo el continente y mayoritariamente por todos los países mediterráneos:



**Figura 25.** Puesta y ninfas recién eclosionadas



**Figura 26.** Distribución mundial de *L. occidentalis* (fuente: [www.discoververlife.com](http://www.discoververlife.com))

En España, el primer individuo de *L. occidentalis* se observó al este del Pirineo catalán en el año 2003. Se ha determinado que se han producido dos grandes eventos de invasión de esta plaga en la Península: el primero, a partir de 2003, desde el este de los Pirineos hasta las sierras litorales, Sistema Ibérico y Montes de Toledo; y el segundo en 2007 desde el oeste de los Pirineos, extendiéndose por el País Vasco, Sistema Central, costa catalana y Sistema Ibérico (Gallego *et al.*, 2013). El primer registro en Castilla y León se citó en octubre de 2012 en la provincia de León (Pérez, 2012).

### ***Cerambyx welensii* como insecto asociado a encinares**

Como ya se ha comentado, las larvas de estos cerambícidos se consideran una plaga de los robles. Su ciclo biológico comienza cuando los adultos aparecen a finales de primavera, en verano y/o a principios de otoño. Tras la fecundación las hembras ponen los huevos en el tronco de los árboles, y al eclosionar, las larvas, que pueden llegar a medir 9 cm de largo y 1,5 cm de ancho, excavan anchas y profundas galerías a la vez que se van alimentando. Esta fase puede llegar hasta los 3 años o 4 años durante los cuales recorre y atraviesa todo el tronco del quercus que habita. Cuando la larva va a pasar a su estado de pupa excava un orificio de salida del árbol, tras lo que vuelve a la galería del interior de la madera para pupar con suficiente protección. La pupa eclosiona en otoño, pero el imago permanece todo el invierno en la galería hasta su emergencia a comienzos de verano (Torres Vila *et al.*, 2012).



**Figura 27.** Ejemplar de *Cerambyx welensii*

Los árboles infestados con ataques iniciales no muestran síntoma alguno. Conforme aumenta la población de larvas y el tamaño de las mismas, pueden observarse acumulaciones de serrines. Tras las primeras emergencias de adultos se observan claramente los orificios de salida y una mayor abundancia de serrines. Estos insectos pueden seguir reproduciéndose sobre los mismos árboles durante años, ya que las larvas se alimentan de xilema, no produciendo una muerte directa e inmediata del árbol. De cualquier modo, la copa del árbol afectado, o una parte de ella si sólo afecta a una rama gruesa, va perdiendo vigor y la defoliación se hace más patente con el paso de los años. Con la destrucción de los vasos xilemáticos disminuye a la cantidad de agua que puede subir el árbol a la copa y este reacciona reduciendo su masa foliar. Los árboles atacados por *C. welensii* suelen ser susceptibles al ataque de hongos u otros insectos debido a la pérdida de vigor (Torres Vila *et al.*, 2016).



**Figura 28.** Galerías en un tocón de encina

Aunque *C. welensii* es nativo de la región mediterránea de Europa, ha experimentado una expansión de su distribución en las últimas décadas. Se ha registrado en varios países europeos, incluyendo España, Francia, Italia, Portugal, Alemania y otros (Torres Vila *et al.*, 2022).



**Figura 29.** Orificio de salida de *C. welensii*

## 8.4. Hongos con capacidad entomopatógena

### ***Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912)**

Como ya se ha comentado, *B. bassiana* es un hongo ascomiceto mitosporico que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la enfermedad de la muscardina blanca, que afecta sobre todo como plaga al gusano de seda.

La producción comercial de *Beauveria bassiana* implica varios pasos. Aquí se expone un resumen general del proceso de producción:

- Selección y aislamiento de cepas: se seleccionan y aíslan cepas de *Beauveria bassiana* con propiedades deseables, como alta virulencia contra las plagas objetivo y capacidad de crecimiento rápido en condiciones de cultivo.
- Cultivo en masa: las cepas seleccionadas se cultivan en grandes volúmenes utilizando un medio de cultivo adecuado que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo. Los cultivos se incuban en condiciones óptimas de temperatura, humedad y agitación para promover el crecimiento y la producción de conidios (esporas).
- Formulación: una vez que se ha alcanzado una biomasa suficiente, los cultivos de *Beauveria bassiana* se procesan para producir diferentes formulaciones comerciales, como polvos mojables, líquidos concentrados, gránulos dispersables o gránulos secos. Estas formulaciones ayudan a mejorar la estabilidad y la facilidad de aplicación del producto.
- Secado: en el caso de formulaciones líquidas, el proceso de secado se lleva a cabo para reducir el contenido de agua y obtener un producto final en forma de polvo o gránulo. El secado se realiza mediante diferentes métodos, como secado al aire, liofilización o secado por atomización.
- Calidad y control de viabilidad: se realizan pruebas de calidad y control para asegurar la viabilidad y la efectividad del producto final. Esto incluye la verificación de la concentración de conidios viables, la evaluación de la pureza del producto y la realización de pruebas de eficacia contra las plagas objetivo.

Hay que tener en cuenta que los detalles y los métodos específicos pueden variar según el fabricante y el producto comercial en particular. (Mascarin & Jaronski, 2016)

## 8.5. Anexo fotográfico

*Figura 30. Ejemplares de L. occidentalis con los primeros hongos*

*Figura 31. Hongos aislados de Leptoglossus occidentalis*

**Figura 32.** *Tenebrio molitor* en cámara húmeda tras la inoculación por contacto

**Figura 33.** Cámaras húmedas con *Tenebrio molitor*

**Figura 34.** *Tenebrio molitor* en placas individuales para medir la supervivencia.

**Figura 35.** Hongo 20 aislado (*Beauveria bassiana*)