



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERIAS AGRARIAS**

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

**Estudio de la eficacia de hongos
entomopatógenos en el control de
Leptoglossus occidentalis Heidemann
(Heteroptera: Coreidae)**

Alumno: Rodrigo Pérez García

Tutor: Julio Javier Díez Casero

Director: Sergio Díez Hermano

Abril 2023

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1 Descripción de <i>Leptoglossus occidentalis</i>	4
1.2. Importancia económica del piñón	7
1.3. Control biológico mediante hongos entomopatógenos	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Recolección y establecimiento de colonia.....	10
3.2. Cultivo de hongos en el laboratorio	10
3.3. Ensayos de supervivencia de <i>L. occidentalis</i>	11
3.4. Análisis de datos	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Método de inoculación por contacto directo	14
4.2. Método de inoculación mediante aerosol.....	15
5. DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES	18
7. AGRADECIMIENTOS	18
8. BIBLIOGRAFÍA.....	19

Resumen

Leptoglossus occidentalis Heidemann (Heteroptera: Coreidae) es una especie nativa de América del Norte, donde causa graves problemas en los huertos semilleros. Tras su llegada a Europa, la gran capacidad de expansión de *L. occidentalis* ha facilitado que en pocos años esté presente en todo el continente. Desde su detección en la región mediterránea se han registrado caídas en la producción de piñón de las masas de *Pinus pinea*, ocasionando grandes pérdidas económicas. Con el objetivo de encontrar estrategias respetuosas con el medio ambiente y capaces de controlar las poblaciones de este insecto, se han llevado a cabo ensayos de supervivencia con hongos hipocreales, endófitos de vegetación mediterránea, pertenecientes a los géneros *Beauveria* y *Lecanicillium*. Para ello, se recolectaron individuos de *L. occidentalis* en campo, con los que se formó una colonia estable en condiciones de laboratorio. Para determinar la efectividad de los hongos se emplearon dos técnicas de aplicación diferentes: contacto directo entre hongo y huésped e inoculación mediante aerosol (con una concentración de 10^9 conidios/ml). Todos los aislados fúngicos testados resultaron patógenos contra *L. occidentalis* mediante la técnica de contacto directo, con una mortalidad mínima del 30%. *Beauveria bassiana* alcanzó una mortalidad del 100% con un tiempo letal medio (TL₅₀) de 7 días. *Beauveria pseudobassiana* y *Lecanicillium* CDS-E1020 obtuvieron valores de virulencia equiparables, con una mortalidad del 50% y un TL₅₀ de 15 y 18 días, respectivamente. Mediante la inoculación con aerosol, *Beauveria bassiana* resultó patógena con una mortalidad del 60% y un TL₅₀ de 19 días, mientras que *Lecanicillium* CDS-E2010 no mostró actividad contra *L. occidentalis*. El conocimiento acerca de la capacidad entomopatógena de hongos endófitos de la vegetación mediterránea puede resultar de gran ayuda a la hora de abordar la gran amenaza que supone la presencia de *L. occidentalis* para el sector del piñón, y se postula como una alternativa sostenible para el manejo de plagas forestales.

Palabras clave

Control biológico, *Lecanicillium lecani*, *Beauveria*, patología forestal, chinche americana del pino, ensayo de supervivencia.

Abstract

Leptoglossus occidentalis Heidemann (Heteroptera: Coreidae) is native to North America, where it causes serious problems in seed orchards. After its arrival in Europe, the great capacity of *L. occidentalis* to spread has made it present throughout the continent within a few years. Since its detection in the Mediterranean region, pine nut production in *Pinus pinea* stands has fallen, causing large economic losses. In order to find environmentally friendly strategies capable of controlling the populations of this insect, survival trials have been carried out with hypocreales fungi, endophytes of Mediterranean vegetation, belonging to the genera *Beauveria* and *Lecanicillium*. For this purpose, individuals of *L. occidentalis* were collected in the field and a stable colony was formed under laboratory conditions. Two different application techniques were used to determine the effectiveness of the fungi: direct fungus-host contact and aerosol inoculation (with a concentration of 10^9 conidia/ml). All fungal isolates tested were found to be pathogenic against *L. occidentalis* by the direct contact technique, with a minimum mortality of 30%. *Beauveria bassiana* achieved 100% mortality with a median lethal time (TL50) of 7 days. *Beauveria pseudobassiana* and *Lecanicillium* CDS-E1020 obtained comparable virulence values, with 50% mortality and TL50 of 15 and 18 days, respectively. By spray inoculation, *Beauveria bassiana* was pathogenic with 60% mortality and a TL50 of 19 days, while *Lecanicillium* CDS-E2010 showed no activity against *L. occidentalis*. Knowledge about the entomopathogenic capacity of endophytic fungi of Mediterranean vegetation can be of great help in addressing the great threat posed by the presence of *L. occidentalis* to the pine nut sector, and is postulated as a sustainable alternative for forest pest management.

Key words

Biological control, *Lecanicillium lecani*, *Beauveria*, forest pathology, American pine bug, survival test.

1. ANTECEDENTES

1.1 Descripción de *Leptoglossus occidentalis*

Leptoglossus occidentalis Heideman (Heteroptera: Coreidae), también conocido como la chinche americana del pino, es una especie invasora considerada plaga en España, incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (Real Decreto 630/2013). Por orden de importancia dentro de las principales amenazas para la diversidad biológica, las especies invasoras ocupan el tercer lugar, solamente por detrás de la pérdida y de la fragmentación del hábitat (Baillie et al., 2004).

L. occidentalis es nativo del oeste de los Estados Unidos (Heidemann, 1910), donde está considerado una plaga relativamente grave que afecta especialmente a huertos semilleros (Bates et al., 2000). A mediados del siglo pasado comenzó a extenderse por América en dirección oeste-este (Schaffner, 1967) (Figura 1A). En la década de 1990 fue detectado en la costa atlántica del país (Gall, 1992). En Europa, la primera detección de la chinche americana del pino se citó en 1999 en el norte de Italia (Taylor et al., 2001). En alrededor de una década, se ha expandido por todo el continente y de forma mayoritaria por todos los países mediterráneos (Figura 1B).

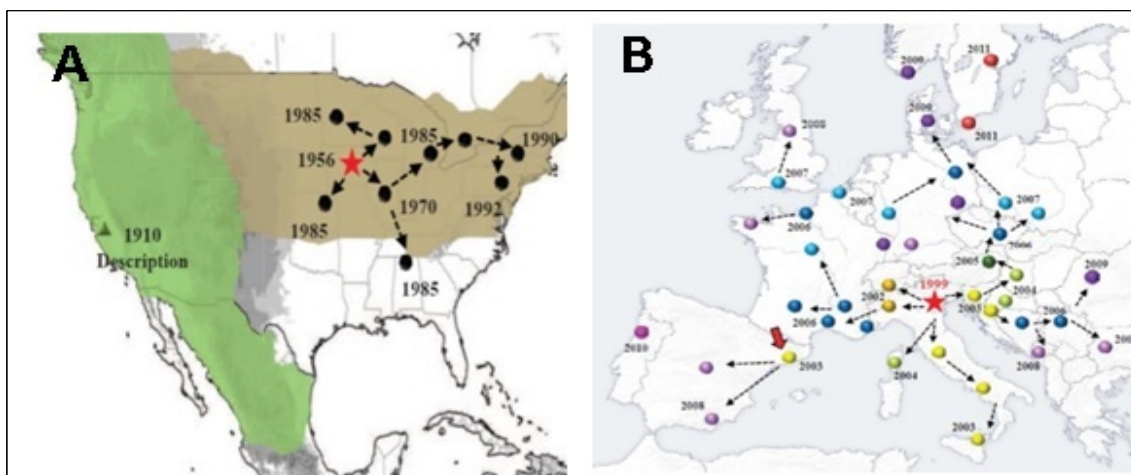


Figura 1. Expansión global de *Leptoglossus occidentalis*. **A** Expansión en EEUU. La estrella roja indica la primera cita de *L. occidentalis* en el medio oeste y las flechas representan los movimientos de colonización de la costa este del mismo. **B** Expansión en Europa. La estrella roja indica la primera cita de *L. occidentalis* en Europa, los colores indican los años en que han sido citados y la flecha roja la primera detección en España. Figura adaptada de Parlak (2017).

En España, la primera referencia de *L. occidentalis* se remonta a 2003 en Vallbona d'Anoia, provincia de Barcelona (Ribes y Escolà, 2005), posteriormente, en 2008, hubo nuevos avistamientos en Murcia (Valcárcel y Portillo, 2009) y Madrid (Vazquez et al., 2009). En Castilla y León, la primera cita de la chinche americana del pino se realiza en 2012, en la localidad de San Martín Del Agostedo (León) (Pérez, 2012).

La amplia capacidad de expansión que presenta esta chinche puede estar relacionada con el gran número de coníferas de las que puede alimentarse, llegando a ser estas un total de 48 especies (Barta, 2016). En su área de distribución nativa americana se ha observado que *L. occidentalis* tiene predilección por el género *Pinus* y el Abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) (Lesieur et al., 2014). En el continente europeo los estudios realizados muestran resultados similares, siendo capaz de alimentarse de especies autóctonas como *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus halepensis* o, *Pinus pinea*, además de otras coníferas como *Picea abies*, *Larix decidua*, *Abies spp.* y *Juniperus spp.* (Taylor et al., 2001). También se ha documentado la preferencia del

insecto por los conos de *Pinus pinea* en comparación con *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis* (Farinha et al., 2018), posiblemente motivado por el mayor tamaño del piñón.

Además de la gran polifagia que presenta el insecto, hay que sumarle las altas capacidades dispersivas del mismo, ya que están considerados como buenos voladores (Koerber, 1963). También es necesario considerar la ayuda ejercida por las acciones humanas, tanto de transporte de especímenes vegetales por mar o tierra, como de comercialización de piñas, que han ayudado a la chinche a prácticamente colonizar por completo el continente europeo.

El tamaño de *L. occidentalis* oscila entre los 15-20 mm de longitud y los 5-7 mm de anchura. Una de las principales características morfológicas es el ensanchamiento de las tibias en las patas posteriores espinosas (metatibias) (Figura 2A). Presentan en la parte posterior de los hemélitros unas líneas blancas en zig-zag. (Figura 2B) Las antenas de tipo filiforme están formadas por 4 artejos, mientras que el rostro lo componen 4 segmentos articulados de tipo tubular.

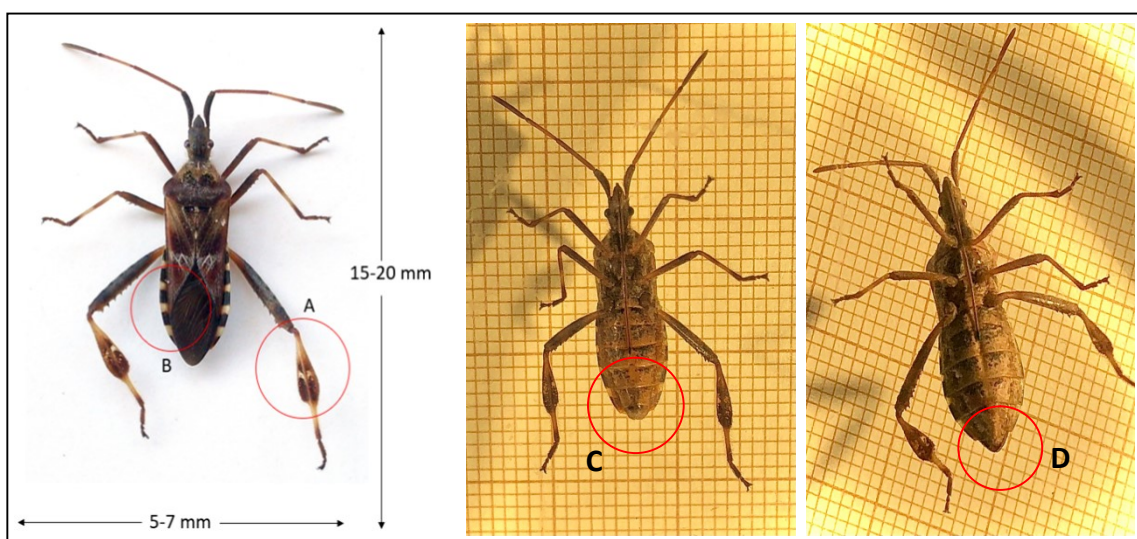


Figura 2. Características morfológicas de *Leptoglossus occidentalis*. A Ensanchamiento de las tibias posteriores. B Líneas blancas en zig-zag en la parte posterior de los hemélitros. C Macho de *Leptoglossus occidentalis*. D Hembra de *Leptoglossus occidentalis*

Esta especie presenta un claro dimorfismo sexual en la genitalia de machos y hembras. Es apreciable a simple vista, en el último segmento abdominal (esternito 7), la cápsula genital o pigóforo en los machos (Figura 2C) y una hendidura que se corresponde con la cámara genital (Figura 2D) en las hembras (Goula y Mata, 2015). También se encuentran diferencias en el tamaño de los insectos, siendo mayor el de las hembras que el de los machos (Bernardinelli y Zandigiaco, 2001).

En cuanto a la fenología de *L. occidentalis*, su umbral de desarrollo se encuentra en los 14.37°C y su integral térmica es de 533 grados-día (Barta, 2016). Según estudios realizados por Ponce y Domínguez (2020), el ciclo de la chinche de las piñas en Castilla y León presenta dos generaciones anuales (Figura 3). Los adultos postinvernantes comienzan a activarse en el mes de marzo y realizarán sus primeras puestas a mediados del mes de mayo, de las cuales emergerá la primera generación anual (F1) que se desarrollará, entre los meses de junio y julio. Posteriormente, esta generación (F1) realizará una segunda puesta (F2) que emergerá y se desarrollará entre agosto y septiembre. Esta segunda generación anual (F2) procede entonces a agruparse en lugares cerrados, con mayor temperatura y próximos a masas forestales, donde invernarán desde octubre hasta febrero del año siguiente. La localización de estos lugares más

cálidos la llevan a cabo mediante una serie de receptores de radiación infrarroja localizados en su abdomen (Takacs, 2009).

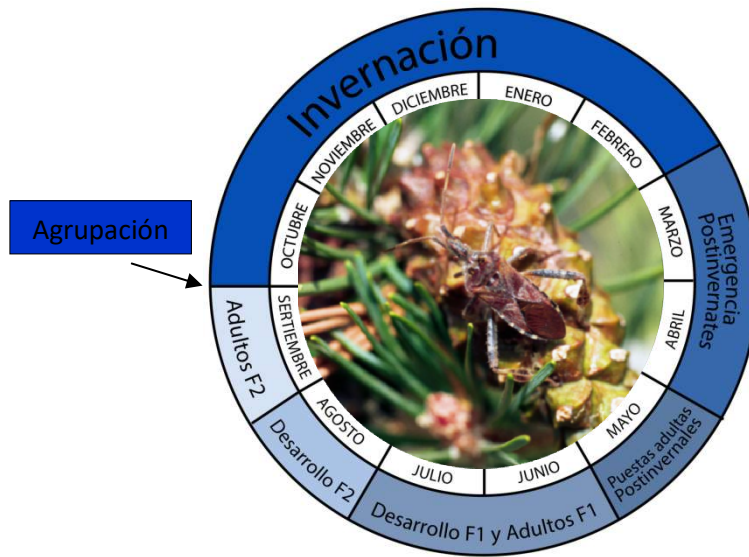


Figura 3. Ciclo biológico de *Leptoglossus occidentalis* en Castilla y León.

La reproducción de *L. occidentalis* es sexual. El macho presenta un par de apéndices quitinosos denominados parámetros que emplean para la sujeción de la hembra durante la cópula (Figura 4A). Las hembras llegan a la madurez sexual aproximadamente 8 días después de alcanzar la edad adulta (Ponce, 2017). Las puestas las realizan en hilera, adhiriendo los huevos en la cara ventral de las acículas del hospedador. (Barta, 2016) (Figura 4B). La eclosión se produce aproximadamente pasadas las dos semanas. Las ninfas atraviesan 5 estadios post emergencia (Figura 4, N1-N5). En esta fase se desarrollan las alas y se define el sexo, momento en que pasan a la edad adulta.

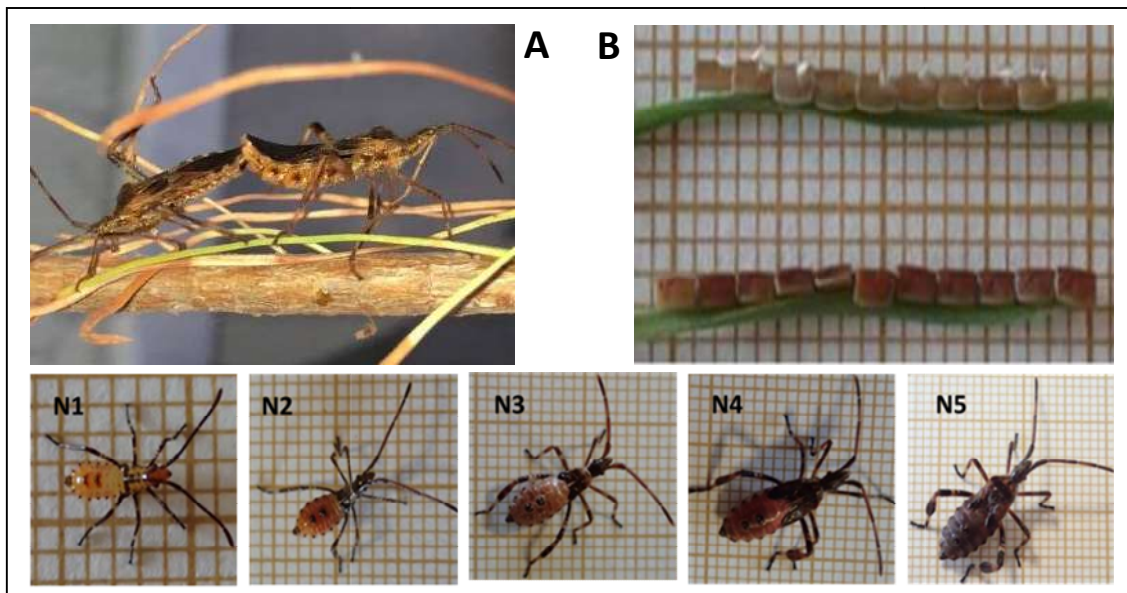


Figura 4. Reproducción de *Leptoglossus occidentalis*. A Apareamiento de *L. occidentalis*. B Puesta sobre acícula de *Pinus halepensis* (Foto de Laura Ponce Herrero). N1-N5 Estadios ninfales de *L. occidentalis* (Fotos de Laura Ponce Herrero).

L. occidentalis es un insecto fitófago, tanto ninfas como adultos se alimentan de los tejidos de las piñas. Para su alimentación está provisto de un pico o rostro (aparato bucal, picador-suctor),

el cual introduce entre las escamas de las piñas. A través del mismo inyectan una serie de enzimas capaces de degradar la pared celular, lo que permite al insecto succionar los productos licuados ([Campbell y Shea, 1990](#)). Numerosos estudios han demostrado que es en el momento de la alimentación de la chinche, cuando se producen los daños en el piñón ([Calama, 2020](#); [Ponce, 2017](#); [Farinha, 2019](#)), y con ello, el gran impacto económico asociado.

1.2. Importancia económica del piñón

El pino piñonero, *Pinus pinea*, es una especie nativa de la Península Ibérica con gran importancia desde la antigüedad en los países mediterráneos gracias al aprovechamiento de la madera, la leña y los piñones ([Prada et al., 1997](#)). Según [López et al. \(2019\)](#) la distribución de *Pinus pinea* discurre de manera natural y discontinua por el norte y el este de la Región Mediterránea, desde Portugal a Siria, pasando por costas occidentales del Mar Negro y el Líbano a lo largo de 4000 km, creciendo desde el nivel del mar y hasta los 1000 m o incluso ocasionalmente hasta los 1400 msnm (Figura 5).

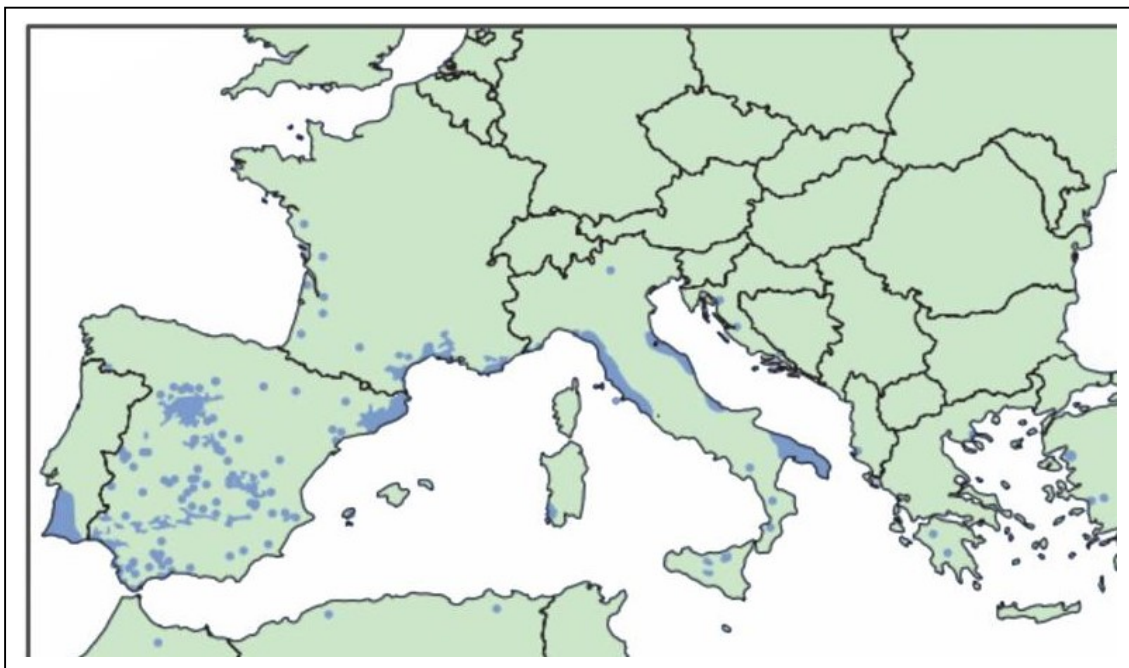


Figura 5. Distribución de *Pinus pinea* (Fuente, EUFORGEN, 2022)

Esta conífera se desarrolla bien en suelos pobres y sin apenas prácticas culturales y es capaz de resistir adversidades climáticas como sequías o heladas ([Guadaño y Mutke, 2016](#)). Desde hace décadas, la elevada demanda del mercado por los piñones ha conducido a un aumento del cultivo de esta especie en las zonas de clima mediterráneo.

Los individuos de *P.pinea* pueden alcanzar una altura de entre 20 y 25 metros en condiciones óptimas de suelo y clima. No obstante, por lo general se encuentra en tallas más reducidas, debido a la pobreza de los suelos que habita, con un diámetro de entre 40 y 50 cm al terminar la rotación silvícola. Presentan una forma característica de copa en forma de paraguas o porte aparasolado. ([Fady et al., 2004](#)) El turno empleado en su silvicultura oscila entre 60 y 150 años, dependiendo del objetivo preferente de la ordenación ([Montero et al 2008](#)), pudiendo ser esta la producción de madera, la producción mixta de madera y piña, producción exclusiva de piña o masas con un uso protector o paisajístico.

En el grupo taxonómico de los pinos mediterráneos el pino piñonero posee la semilla más grande, con un tamaño que puede llegar a los 15-20 mm. Morfológicamente son globosas y no

presentan pedúnculo. La maduración ocurre transcurridos dos años y medio desde la polinización, un año más tarde que en la mayoría de especies del género *Pinus* (Montero 2004).

Actualmente, España posee la mayor superficie a nivel mundial de *Pinus pinea* (490000 ha), sin embargo, las limitaciones tanto climáticas como orográficas sitúan a España en segundo lugar por detrás de Portugal en cuanto a producción de piñón (Calama, 2020). A partir de 2012, se ha contabilizado una gran bajada en el rendimiento (kg de piñón/kg de piña verde) de las masas de *Pinus pinea* (Figura 6). Esta caída de rendimiento puede obedecer a diversas causas. En primer lugar, las precipitaciones ocurridas durante el último año de maduración de la piña están estrechamente relacionadas con el rendimiento (Mutcke et al., 2007). Por tanto, la crisis climática podría estar contribuyendo a la bajada en la producción de piñón, debido al incremento en la frecuencia de periodos de sequía.

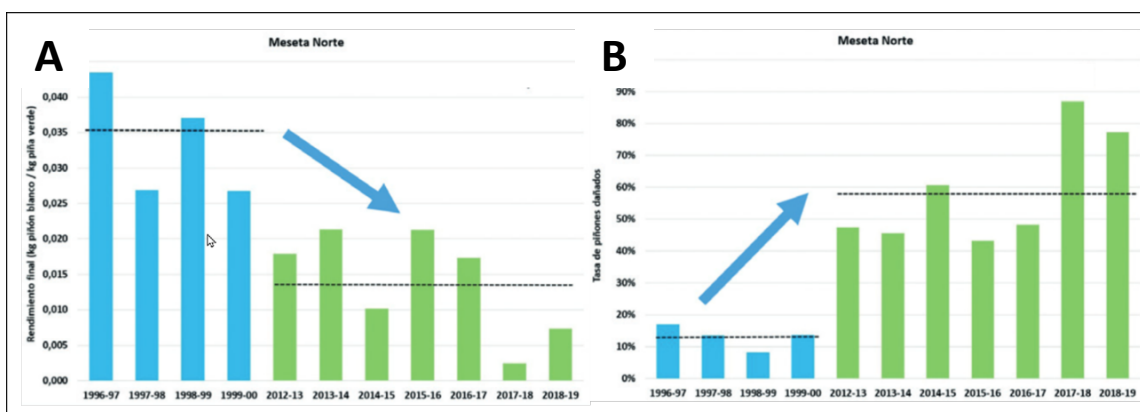


Figura 6. Impacto económico de *L. occidentalis* en la producción de piñón. A Rendimiento final en la Meseta Norte para la serie de años 1996-2019. B Tasa de piñones dañados de la Meseta Norte para la serie de años 1996-2019. Figura adaptada de Calama (2020).

En segundo lugar, el año en que se detectó por primera vez la chinche de las piñas en Castilla y León, 2012, coincide con la cronología observada en la bajada del rendimiento. En estudios realizados por Calama (2020) en la Meseta Norte se puede observar cómo en la serie de datos 1996-2000 el rendimiento medio se situaba en torno al 3.5 %, con una tasa de piñones dañados inferiores al 15% (Figura 6A). En contraposición, en la serie de años 2012-2019, el rendimiento medio cayó por debajo del 1.5% (Figura 6B), por lo que es plausible considerar la introducción de *L. occidentalis* como la causa principal del aumento en el porcentaje de piñones dañados (60%). Todo esto lleva consigo unas importantes pérdidas económicas, puesto que el valor del piñón en el mercado minorista puede llegar a ser superior a 100 € el kg.

Por tanto, es necesario buscar herramientas capaces controlar la plaga de *L. occidentalis*, de cara a mitigar su efecto pernicioso, tanto sobre la salud del árbol como sobre la actividad humana. Controlar la presencia de especies invasoras en su entorno natural requiere desarrollar nuevas estrategias que puedan ser efectivas contra el insecto y a la vez racionales, respetuosas con el medio ambiente y que estén de acuerdo con el desarrollo sostenible. Es en este punto donde entra el manejo integrado de plagas y la utilización de hongos entomopatógenos como método de control de las poblaciones de insectos plaga.

1.3. Control biológico mediante hongos entomopatógenos

Se han catalogado cerca de 100 géneros y más de 750 especies de hongos entomopatógenos (Pucheta Díaz et al. 2006). Una de las grandes ventajas que plantea su utilización se basa en que su patogenicidad no depende exclusivamente de las toxinas que generan, sino que pueden invadir al insecto a través del tegumento de manera directa, lo que complica la aparición de organismos hospedadores resistentes a los mismos (Alves, 1998).

De manera general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre sus hospedadores: germinación, formación de apresorios y estructuras de penetración, colonización y reproducción del patógeno ([Gonzalez-Castillo, 2012](#)). La primera fase comienza con la germinación de una espora del hongo sobre el tegumento del insecto, posteriormente y mediante la formación del apresorio se fija a la cutícula, y gracias al tubo germinativo o haustorio se produce la penetración en el insecto (Figura 7). En dicha penetración participan tanto mecanismos físicos, (como la presión que ejerce la formación y el crecimiento del haustorio, que termina rompiendo las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula), como procesos químicos y enzimáticos, que provocan la descomposición del tejido en la zona de penetración ([Monzón, 2001](#)).

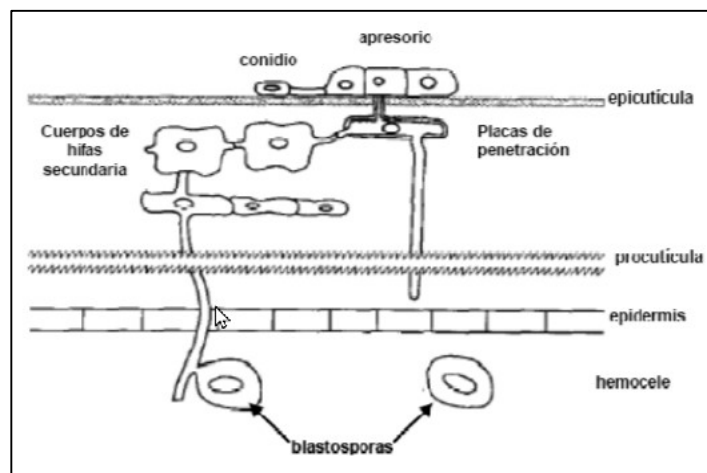


Figura 7. Esquema del proceso de invasión de los hongos entomopatógenos. Modificado de [Hajek y Leger \(1994\)](#)

Una vez dentro del insecto comienza la fase de colonización, en la cual la estructura del hongo (hifa) se ramifica y engrosa en la cavidad general del cuerpo, formándose pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (blastosporas) (Figura 7). Además de esta destrucción de tejidos y del déficit nutricional causado por el crecimiento del hongo, otra de las formas mediante las cuales el mismo causa la muerte del hospedante es la producción de toxinas, destacando entre estas las dextrusinas, ya que inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas ([Pucheta Diaz et al., 2006](#)).

Una vez muerto el insecto finaliza la fase de parasitismo para dar comienzo la fase saprofítica, en la que el hongo se desarrolla en el hemocele, formando masas miceliales que consiguen salir al exterior por las regiones intersegmentales del insecto. En este momento el hongo comienza la esporulación sobre el cadáver y produce inóculos capaces de infectar a otros insectos ([Cañedo y Ames, 2004](#)).

Los hongos entomopatógenos se pueden encontrar naturalmente en el suelo y regulando las poblaciones de insectos ([Quesada-Moraga et al., 2007](#)). Algunos de estos organismos son bien conocidos e incluso se pueden encontrar en formulaciones comerciales, por ejemplo *Lecanicillium lecanii* se puede encontrar en formulaciones como “Vertalec” o “Mycotal” producidos por Koopert Biological System. También *Beauveria bassiana* puede encontrarse de manera comercial como son los formulados “BotanicGard” y “Mycotrol”

Estos agentes de control se han sido ampliamente utilizados contra diferentes plagas de insectos ([Lecuona et al., 2001](#); [Faria y Wraight, 2001](#); [Chavan et al., 2008](#); [Chen et al., 2021](#)) y representan uno de los pilares fundamentales en el manejo integrado de plagas ([McGuire y Northfield, 2020](#)).

Por tanto, el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico se postula como una opción atractiva frente a plagas como *L. occidentalis*, gracias a la combinación de alta eficacia y bajo impacto ambiental que presentan.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en encontrar hongos entomopatógenos efectivos a la hora de controlar la plaga *Leptoglossus occidentalis*, mediante diferentes técnicas de aplicación.

Los objetivos específicos son:

- Comprobar la efectividad de hongos entomopatógenos en el control de *Leptoglossus occidentalis* mediante técnica de contacto directo.
- Comprobar la efectividad de hongos entomopatógenos en el control de *Leptoglossus occidentalis* mediante pulverización con aerosol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección y establecimiento de colonia

Se capturaron ejemplares de *L. occidentalis* en la Casa de la Madera sita en el paraje Comunero de Revenga, en Regumiel de la Sierra (Burgos), los días 12/03/2022 y 19/03/2022. En total fueron recolectados 20 individuos con los que se estableció la primera colonia en cautividad bajo condiciones controladas de laboratorio ($T_{\text{media}} = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, HR = $70 \pm 10\%$ y fotoperiodo natural).

Los individuos se dispusieron en cajas de cría con medidas 47.5 x 47.5 x 93 cm, cubiertas por un panel frontal de plástico transparente con 2 aberturas circulares para manipulación manual y con paredes laterales de malla de poliéster de 1 x 0.3 mm de luz. Para su soporte se introdujeron en las jaulas 2 plántulas de dos savias de *Pinus radiata*, que sirvieron además como alimento para el insecto, añadiéndoles semilla abiertas y maduras de *Pinus pinea* en placas Petri. Las plantas fueron regadas 2 veces por semana y los piñones fueron repuestos una vez al mes.

3.2. Cultivo de hongos en el laboratorio

Se seleccionaron 3 cepas de *Lecanicillium lecanii* en base a su capacidad entomopatógena sobre el insecto coleóptero *Tenebrio molitor* (Tabla 1) (Diez-Casero et al., datos sin publicar). *Beauveria pseudobassiana* y *Beauveria bassiana* fueron seleccionadas por su demostrada efectividad bajo técnica de suspensión acuosa (Barta, 2010).

Tabla 1.

Hongos entomopatógenos seleccionados

Nombre	Especie	Origen	Referencias
Hongo I51		Valdelosa	(Sani et al., 2020)
Hongo G-12	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Alamedilla	(Diez-Casero et al., datos sin publicar)
Hongo CDS-E1020		Cubo de Don Sancho	
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	Colección	
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Comercial	(Barta, 2010)

En la elaboración del sustrato de crecimiento se empleó PDA (Potato-Dextrose-Agar) como medio de cultivo de los hongos. Para prepararlo se disolvieron 39 g de PDA liofilizado en 1 litro de agua destilada. La solución se llevó a ebullición en agitación y se esterilizó mediante autoclave a 120°C durante 15 minutos. Una vez finalizado el proceso de esterilización, el preparado se vertió sobre placas de Petri de 5.5 cm y se dejó solidificar bajo campana de flujo laminar (Figura 8A).

Para multiplicar los hongos se llevó a cabo una repicación de los mismos (Figura 8B). Los hongos se mantuvieron en crecimiento a temperatura ambiente hasta que comenzaron a producir esporas (aproximadamente 2 semanas).

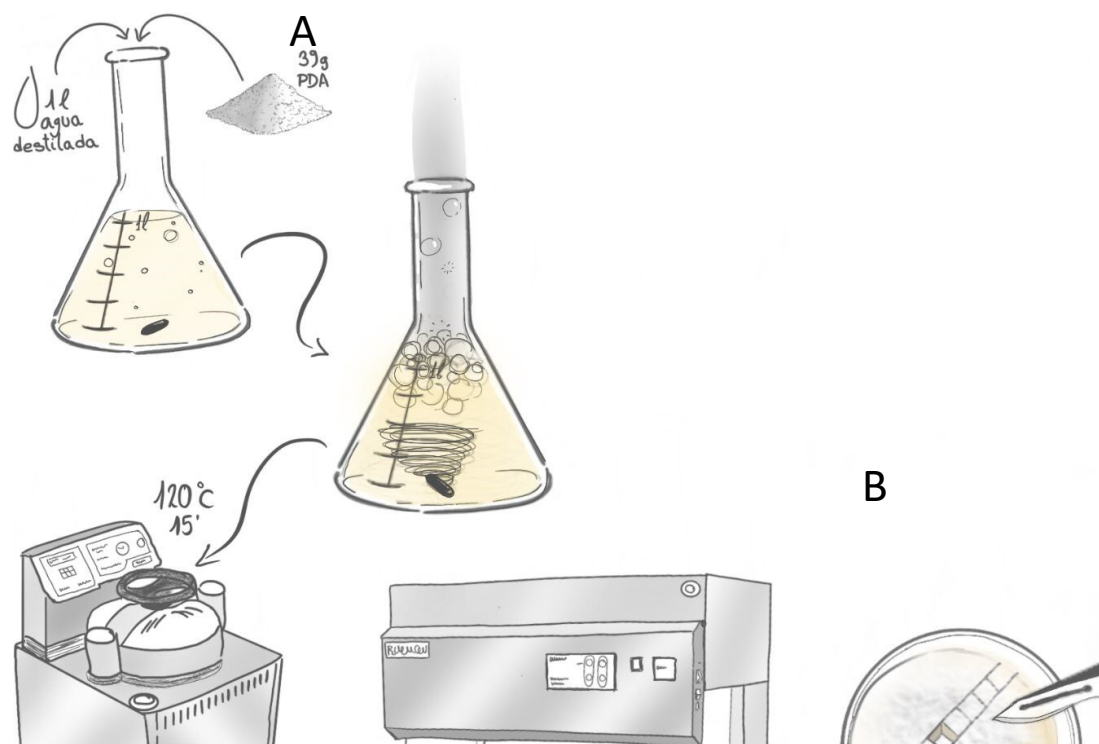


Figura 8. Cultivo de los hongos en el laboratorio. **A** Preparación del medio de cultivo. **B** Proceso de repicación

3.3. Ensayos de supervivencia de *L. occidentalis*

Se realizaron dos ensayos siguiendo distintas técnicas de inoculación del hongo: contacto directo y aerosol.

Para el experimento de inoculación del hongo por contacto directo con el insecto se muestrearon al azar 65 insectos nacidos en las colonias en cautividad (Tabla 2).

Tabla 2.

Diseño del experimento de inoculación por contacto directo

Tratamiento	Insectos a tratar
Control	10
Hongo 151	10
Hongo G-12	10
Hongo CDS-E1020	10
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	10
<i>Beauveria bassiana</i>	15

La técnica de contacto directo (Guerra-Agullo et al. 2010) consistió en introducir por pares a los insectos en placas Petri de 5,5 cm que contenían colonias de los hongos previamente seleccionados durante 10 minutos. Todos los hongos se encontraban en fase de esporulación (24 días de crecimiento) (Figura 9A). A continuación, los insectos se trasladaron a placas estériles y permanecieron 12 horas en cámara húmeda (Figura 9B) para facilitar el crecimiento del hongo. Todo el procedimiento descrito se repitió para el grupo control empleando placas que contenían únicamente el sustrato de crecimiento. Tras este período, los insectos tratados fueron aislados en jaulas con condiciones óptimas de crecimiento (Figura 9C), donde se siguió su supervivencia durante 21 días. Se registraron los días hasta la muerte de los insectos, momento en que se retiraron de la jaula.

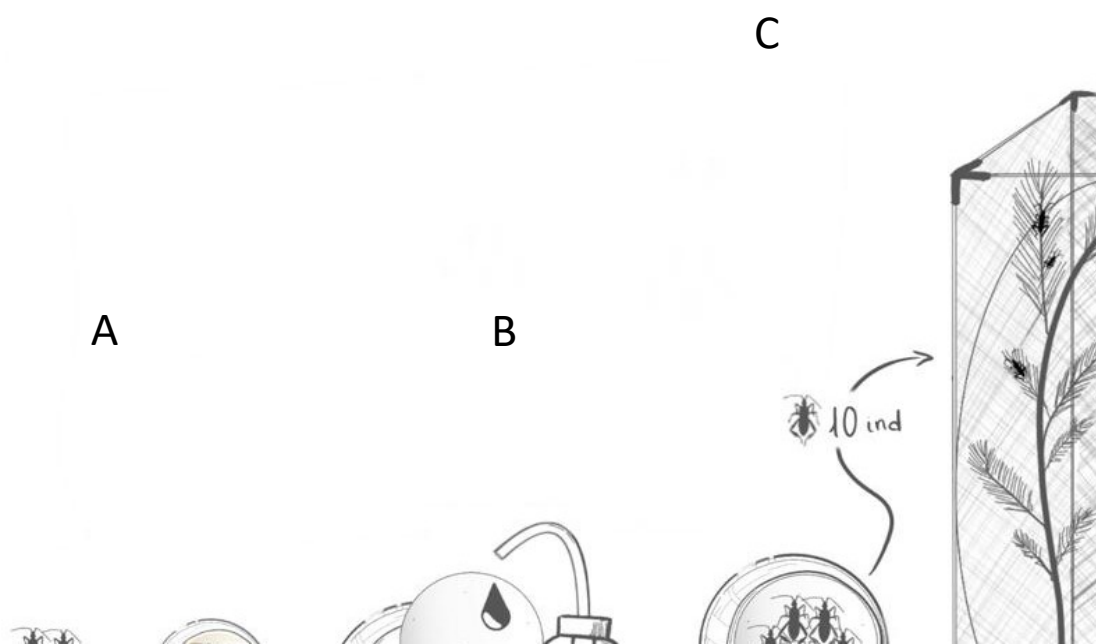


Figura 9. Ensayo de supervivencia. A Parejas de *Leptoglossus occidentalis* en placas de Petri con hongos en fase de esporulación. B Cámaras húmedas. C Jaulas preparadas para el inicio del experimento, en las mismas condiciones ya descritas en el establecimiento de la colonia (dos plántulas de *P. radiata* por jaula y cobertura con red de manipulación).

El ensayo de inoculación del hongo mediante aerosol se llevó a cabo con 45 insectos muestreados en las colonias en cautividad. Estas pruebas se llevaron a cabo con los hongos que habían alcanzado una letalidad significativa mediante la técnica de inoculación por contacto directo (Tabla 3).

Tabla 3.

Diseño del experimento de inóculo mediante aerosol

Tratamiento	Insectos a tratar
Control	15
Hongo CDS-E1020	15
<i>Beauveria bassiana</i>	15

Para la elaboración del inóculo en aerosol (Figura 10), se añadieron 6 fragmentos de micelio de 5mm^2 a 500 ml de medio de cultivo líquido. La mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas a 180 ciclos/min y 25°C . Posteriormente, se filtró en condiciones de esterilidad. La concentración final de esporas se ajustó a 10^9 esporas/ml realizando conteos mediante hemocitómetro. Se eligió una concentración un orden de magnitud por encima de la dosis más letal observada mediante técnica de suspensión acuosa (10^8) (Barta, 2010). El inóculo preparado se dispuso en atomizadores con una capacidad de 1 litro para su posterior aplicación.

La inoculación de los insectos se llevó a cabo en jaulas independientes para cada hongo, con una distancia entre las mismas de 1 m, y bajo condiciones controladas de laboratorio ($T_{\text{media}} = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{HR} = 70 \pm 10\%$ y fotoperiodo natural). Cada insecto fue rociado dos veces dentro de la propia jaula con el preparado en aerosol. El grupo control se roció con agua destilada estéril.

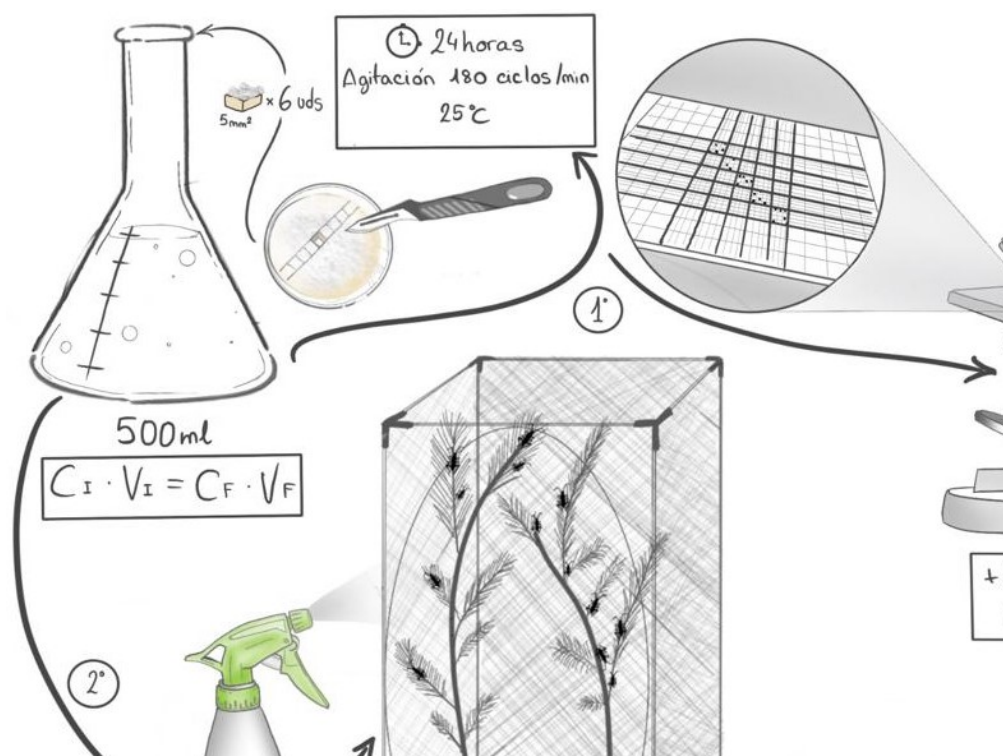


Figura 10. Elaboración del inóculo en aerosol

Todos los experimentos mencionados se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Valladolid, en el campus de la Yutera.

3.4. Análisis de datos

Todos los análisis 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). Los intervalos de confianza para las curvas se estimaron mediante transformación logarítmica. 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 Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples. Las diferencias fueran declaradas significativas para p-valores corregidos inferiores a 0.05.

4. RESULTADOS

4.1. Método de inoculación por contacto directo

Cinco aislamientos de hongos entomopatógenos fueron utilizados para comprobar su virulencia frente a adultos de *Leptoglossus occidentalis* mediante técnica de contacto directo.

La Figura 11 muestra el periodo de tiempo transcurrido hasta la muerte (supervivencia) de los insectos en el tiempo del ensayo. Ninguno de los insectos control murió durante los 21 días de seguimiento. Las comparativas entre curvas de supervivencia pueden observarse en la Figura 12. El grupo tratado con *Beauveria bassiana* presentó la mayor mortalidad (100%, Bbas vs Control p-valor < 0.01). *Beauveria pseudobassiana* y CDS-E1020 dieron lugar a resultados equiparables entre sí (mortalidad = 50%, CDS-E1020 vs B. pseudo p-valor = 0.922). Los hongos con menos capacidad entomopatógena fueron las cepas 151 y G-12, con una mortalidad del 30 % y sin diferencias significativas entre ellos (151 vs G-12 p-valor = 0.922). El tiempo letal medio (TL₅₀) fue de 18, 15 y 7 días para CDS-E1020, *Beauveria pseudobassiana* y *Beauveria bassiana*, respectivamente.

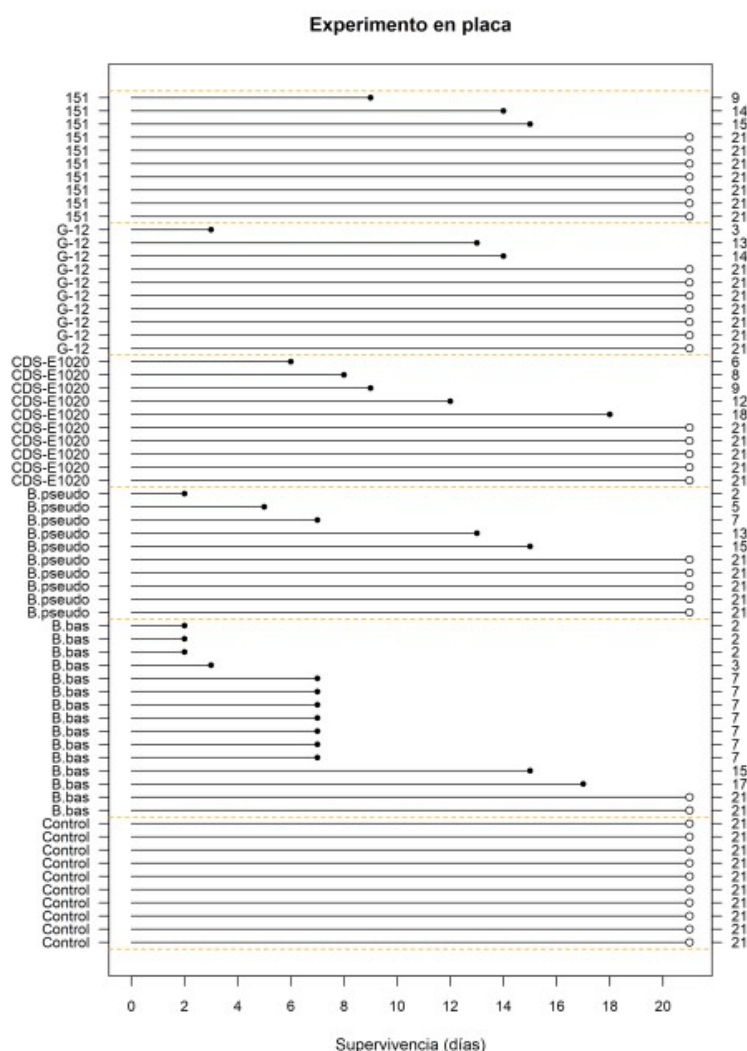


Figura 11. Perfiles de supervivencia del ensayo por contacto directo. Cada línea representa un insecto. Los puntos negros representan la muerte del insecto, mientras que los puntos blancos indican que el insecto sobrevivió. El eje horizontal representa el número de días que se realizó el seguimiento de supervivencia. El eje vertical izquierdo indica el hongo aplicado, mientras que el eje vertical derecho indica el número de días de supervivencia (expresa en forma numérica la longitud de las líneas proyectadas sobre el eje horizontal). B.pseudo: *Beauveria pseudobassiana*. B.bas: *Beauveria bassiana*.

Rodrigo Pérez García

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

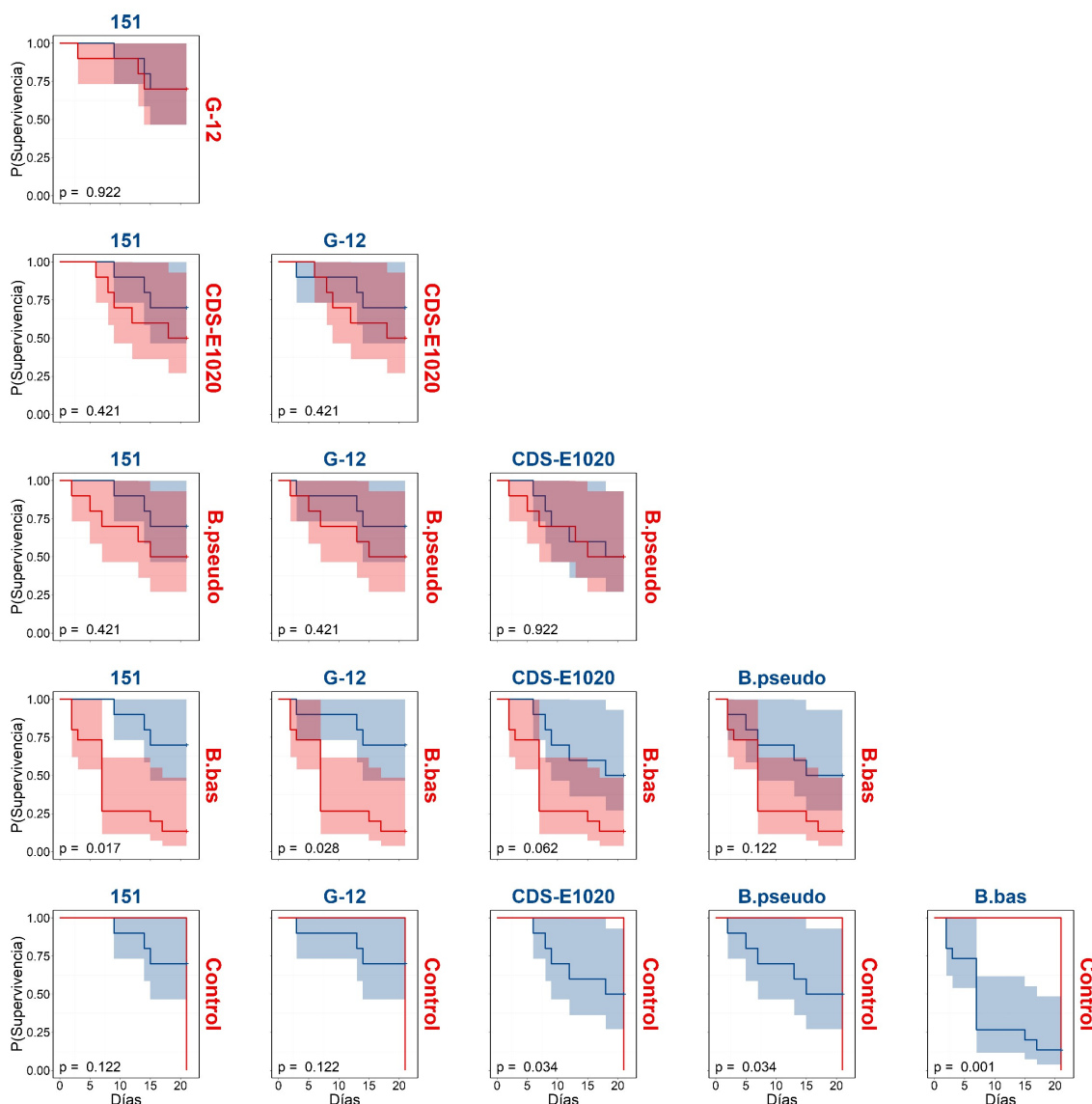


Figura 12. Análisis de supervivencia del ensayo por contacto directo. Comparaciones por parejas de los hongos aplicados. El eje vertical representa la probabilidad de supervivencia y el eje horizontal representa el tiempo, medido en días. Los colores rojo y azul indican la correspondencia entre las líneas de supervivencia y el hongo aplicado. El área sombreada en torno a las líneas representa un intervalo de confianza al 95%. Se considera que dos curvas de supervivencia son diferentes si el p-valor < 0.05 (esquina inferior izquierda de cada gráfico). B.pseudo: *Beauveria pseudobassiana*. B.bas: *Beauveria bassiana*.

4.2. Método de inoculación mediante aerosol

Dos aislamientos fueron seleccionados para este ensayo en base a la letalidad alcanzada mediante la técnica por contacto directo, *Beauveria bassiana* (B.bas vs Control p-valor < 0.01) y CDS-E1020 (CDS-E1020 vs Control p-valor < 0.05). Los insectos se expusieron a estos patógenos mediante inoculación en aerosol.

La Figura 13 muestra el periodo de tiempo transcurrido hasta la muerte (supervivencia) de los insectos en el tiempo del ensayo. Ninguno de los insectos control murió durante los 21 días de seguimiento. Las comparativas entre curvas de supervivencia pueden observarse en la Figura 14. El grupo tratado con *Beauveria bassiana* experimentó la mayor mortalidad (mortalidad = 60%, TL_{50} = 19 días, Bbas aero vs Control p-valor < 0.01, Bbas aero vs CDS-E1020 aero p-valor < 0.05). La mortalidad en el grupo tratado con CDS-E2010 fue del 20% y no se encontraron diferencias significativas respecto a la supervivencia del grupo control (CDS-E1020 aero vs Control p-valor = 0.07).

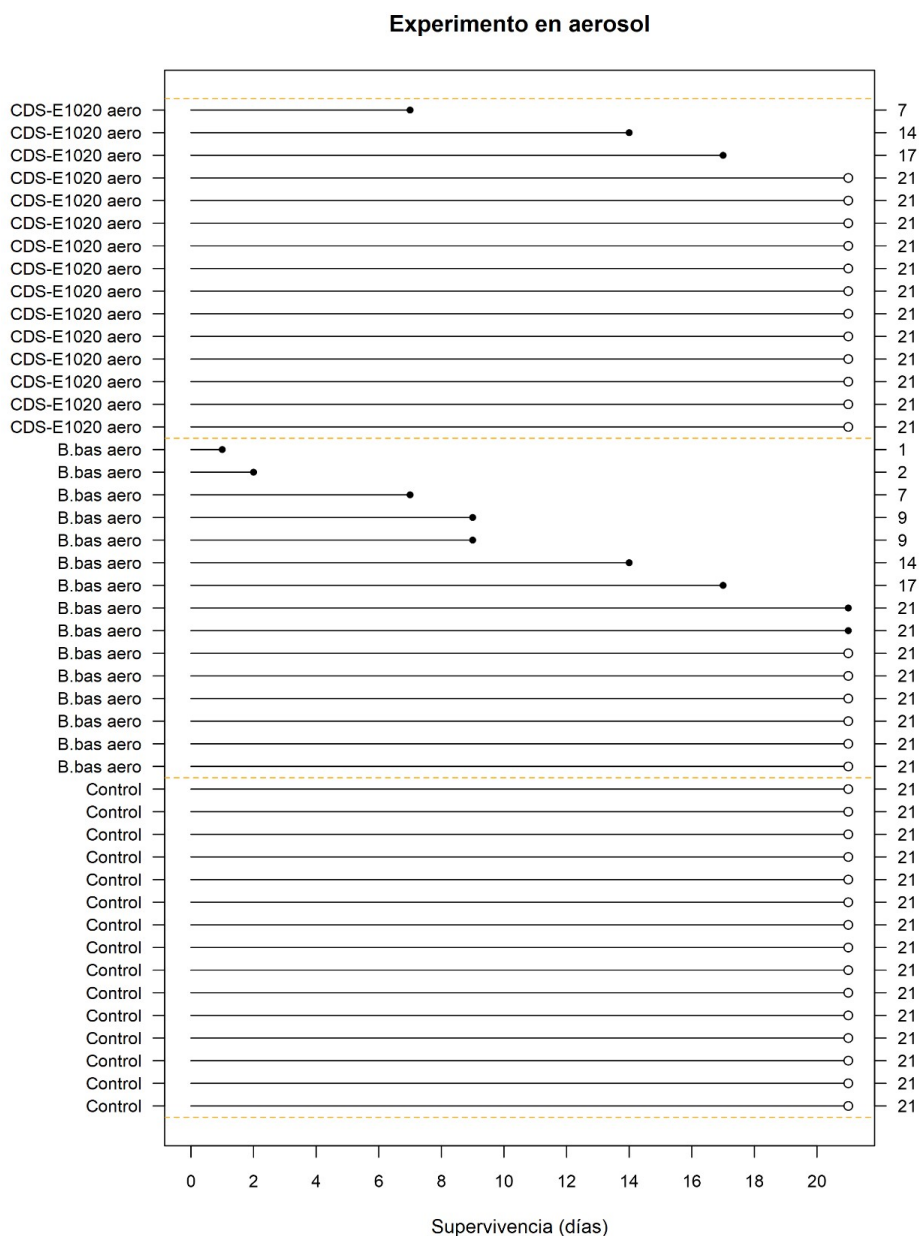


Figura 13. Perfiles de supervivencia del experimento en aerosol. Cada línea representa un insecto. Los puntos negros representan la muerte del insecto, mientras que los puntos blancos indican que el insecto sobrevivió. El eje horizontal representa el número de días que se realizó el seguimiento de supervivencia. El eje vertical izquierdo indica el hongo aplicado, mientras que el eje vertical derecho indica el número de días de supervivencia (expresa en forma numérica la longitud de las líneas proyectadas sobre el eje horizontal). B.bas: *Beauveria bassiana*.

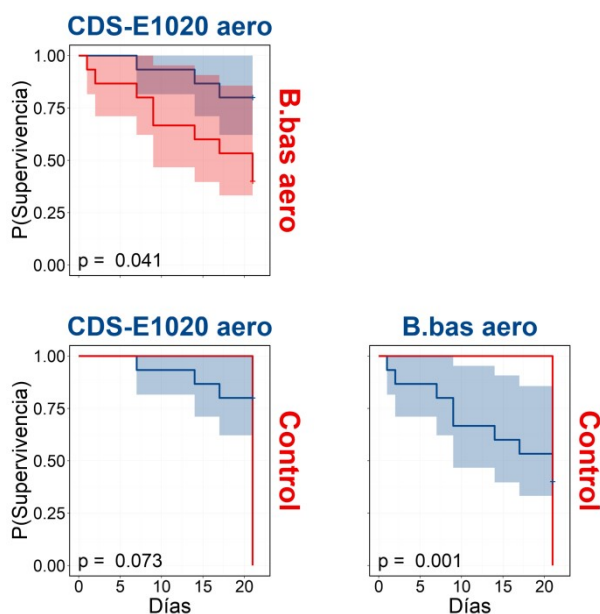


Figura 14. Análisis de supervivencia del experimento en aerosol Comparaciones por parejas de los hongos aplicados. El eje vertical representa la probabilidad de supervivencia y el eje horizontal representa el tiempo, medido en días. Los colores rojo y azul indican la correspondencia entre las líneas de supervivencia y el hongo aplicado. El área sombreada en torno a las líneas representa un intervalo de confianza al 95%. Se considera que dos curvas de supervivencia son diferentes si el p-valor < 0.05 (esquina inferior izquierda de cada gráfico). B.bas: *Beauveria bassiana*.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado la efectividad, en condiciones de laboratorio, de hongos del orden hipocreales (*Beauveria bassiana*, *Beauveria pseudobassiana* y tres cepas de *Lecanicillium lecanii*) como patógenos de la chinche de las piñas *Leptoglossus occidentalis*. Las tres especies de hongos hipocreales utilizadas en este estudio son considerados como patógenos facultativos de insectos (Alavo, 2015; Barta, 2010; Baz, 2016). En los ensayos en laboratorio se ha podido comprobar que *L. occidentalis* es susceptible a los hongos empleados, siendo mayor la virulencia del género *Beauveria* que *Lecanicillium*.

El uso de hongos entomopatógenos en la gestión de plagas ha sido ampliamente explorado con anterioridad (Biryol et al., 2022). Sin embargo, son escasos los estudios centrados en determinar el potencial entomopatógeno de los hongos contra *L. occidentalis*. Los resultados preliminares presentados por Rumine y Barzanti (2008) ya mostraban la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *L. occidentalis*. Por otra parte, Barta (2010) evaluó la virulencia de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, encontrando los aislados de *Isaria fumosorosea* como los de mayor efectividad. Por último, un estudio más reciente realizado por Eski et al (2022) encontró como mejor candidato un aislado de *Metarhizium flavoviride*, con una patogenicidad del 90% y un TL_{50} de 2.5 días, con una concentración de 10^7 conidios/ml.

Los resultados de mortalidad obtenidos en el presente trabajo son comparables a los reflejados en el trabajo de Barta (2010), que alcanzó una mortalidad del 70% mediante aplicación en suspensión acuosa, frente al 100% en contacto directo y el 60% en aerosol conseguidos aquí con *B. bassiana*. Respecto al tratamiento mediante aerosol, en el estudio de Eski et al (2022) se obtuvieron resultados similares a los aquí mostrados, con una mortalidad del 60 % para el

tratamiento de *B. bassiana* frente al rango de 40-60% que obtuvieron las diferentes cepas de *B. bassiana* empleadas en el citado trabajo.

El estudio llevado a cabo presenta algunas limitaciones. En primer lugar, *L. Occidentalis* presenta una elevada mortalidad en el estadio N2, lo que dificulta su cría en cautividad. El tiempo que tarda en llegar a adulto, con dos generaciones anuales, también resultó limitante a la hora de alcanzar el tamaño muestral deseado, teniendo en cuenta que tampoco podía utilizarse el total de los insectos para no poner en peligro la viabilidad de la colonia. Asimismo, por norma general se admite que los hongos más virulentos son los que consiguen ser aislados del propio huésped ([Papierok et al., 1984](#)), no siendo este el caso aquí presentado, ya que han sido utilizados los candidatos que obtuvieron mejores resultados sobre otro insecto, *T. molitor*.

En este trabajo se ha podido comprobar el potencial entomopatógeno de hongos hipocreales, de cara a su uso como estrategias alternativas de control de chinches coreidas. No obstante, debe tenerse en cuenta que “la susceptibilidad de los insectos a los entomopatógenos demostrada en el laboratorio generalmente no se relaciona con la tasa de infección obtenida en campo” ([Barta 2010](#)). Por lo tanto, será necesario llevar a cabo estudios adicionales, que puedan determinar la efectividad de los hongos entomopatógenos como controladores de las poblaciones de *Leptoglossus occidentalis* en condiciones naturales.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo son las siguientes:

- Respecto al primer objetivo, relativo a la capacidad entomopatógena de hongos endófitos sobre *L.occidentalis* mediante inoculación por contacto directo:
 - o El hongo con más potencial entomopatógeno fue *B.bassiana*, seguido de *B. pseudobassiana* y la cepa CDS-E1020 de *L. lecanii*.
 - o *B. pseudobassiana* y la cepa CDS-E1020 de *L. lecanii* mostraron una capacidad entomopatógena equiparable.
 - o Las cepas 151 y G-12 de *L. lecanii* no mostraron actividad entomopatógena, en comparación con el grupo control.
- Respecto al segundo objetivo, relativo a la capacidad entomopatógena de hongos endófitos sobre *L.occidentalis* mediante inoculación con aerosol:
 - o El hongo con más potencial entomopatógeno fue *B.bassiana*.
 - o La cepa CDS-E1020 de *L. lecanii* no mostró actividad entomopatógena mediante inoculación con aerosol, en comparación con el grupo control.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores Sergio y Julio, por la oportunidad de realizar este trabajo con ellos y por la ayuda y las buenas críticas hacia el mismo. A Álvaro y Mariano por la inestimable ayuda con los ensayos en el laboratorio. A Laura Ponce por allanar el camino. A Miguel por abrirme las puertas de la Casa de la Madera. A mi compañera de vida, por compartir estos años y por la gran ayuda y amor prestados, te los devolveré con creces. A mi madre y mi hermana, las raíces y el sustento de lo que soy hoy. A mis sobrinos, el futuro que seremos. Y en especial a mi padre... quien me enseñó a amar la naturaleza, disfrutar del maravilloso mundo natural en el que vivimos, del vuelo del milano, el frescor del río, a disfrutar de la senda sin importar el destino, el respeto y la grandeza escondida detrás de las pequeñas cosas. Espero que te enorgullezcas de esto y que algún día volvamos a pasear juntos.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALAVO, T. B. 2011). The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control: A review. *Journal of experimental biology and agricultural sciences*, 3(4), 337-345.

[http://dx.doi.org/10.18006/2015.3\(4\).337.345](http://dx.doi.org/10.18006/2015.3(4).337.345)

ALVAREZ-BAZ G., FERNANDEZ-BRAVO M., PAJARES, J., QUESADA-MORAGA E., 2016. Cepa nativa de *Beauveria pseudobassiana* como agente potencial en el control biológico de *Monochamus galloprovincialis*, vector del nematodo de la madera del pino. *Cuadernos De La Sociedad Española De Ciencias Forestales*, (42).

<https://doi.org/10.31167/csef.v0i42.17484>

ALVES S.B., 1998 Fungus Entomopatogenicos. p. 289-370. Controle microbiano de insetos. Fundacao de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaga, Sao Paulo, Brasil

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/12933/1/AlvesControle.pdf>

BAILLIE J., HILTON-TAYLOR C., STUART S. N., 2004. IUCN red list of threatened species: a global species assessment. IUCN

<https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2004-001.pdf>

BARTA M., 2010. Preliminary evaluation of insect-pathogenic Hypocreales against *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in laboratory conditions. *Folia Oecologica*. 37. 137-143.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10340-015-0673-z>

BARTA M., 2016. Biology and temperature requirements of the invasive seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Europe. *J Pest Sci* 89(1), 31- 44.

https://www.researchgate.net/publication/277935205_Biology_and_temperature_requirements_of_the_invasive_seed_bug_Leptoglossus_occidentalis_Heteroptera_Coreidae_in_Europe

BATES S. L., BORDEN J. H., KERMODE A. R., BENNETT R. G., 2000. Impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on Douglas-fir seed production. *Journal of Economic Entomology*, 93 (5):1444- 1451

<https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.5.1444>

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.

https://www.researchgate.net/publication/316139848_Leptoglossus_occidentalis_Heidemann_Heteroptera_Coreidae_A_conifer_seed_bug_recently_found_in_northern_Italy

BIRYOL S., DEMIRBAG Z., ERDOGAN P., DEMIR I., 2022. Development of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a mycoinsecticide to control green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) and investigation of its biocontrol potential. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 25:101878

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101878>

CALAMA R., GORDO F.J., PARDOS M., MADRIGAL G., PASCUAL S., RAPOSO R., ELVIRA-RECUENCO M., MUTKE S., 2020. Caídas en el rendimiento en piñón de las piñas de *Pinus pinea* L. y evidencia acerca de la causalidad de *Leptoglossus occidentalis*". *RevForesta*, 78: 100-107

https://www.researchgate.net/publication/348810468_Caidas_en_el_rendimiento_en_pinon_de_las_pinas_de_Pinus_pinea_L_y_evidencias_acerca_de_la_causalidad_de_Leptoglossus_occidentalis

CAMPBELL B. C., SHEA P. J., 1990. A simple staining technique for assessing feeding damage by *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) on cones. *Canadian Entomology* 122(5), 963-968.

<https://doi.org/10.4039/Ent122963-9>

CAÑEDO V., AMES T., 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. Pp 62

<http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

CARD S., JOHNSON L., TEASDALE S., CARADUS J., 2016. Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS*

<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw114>

CHAVAN B.P., KADAM J.R. SAINDANE Y.S. 2008. Bioefficacy of liquid formulation of *Verticillium lecanii* against Aphid (*Aphis gossypii*) *International Journal of Plant Protection*, Vol. 1 No. 2: 69-72

http://researchjournal.co.in/upload/assignments/1_69-72.pdf

CHEN X.M., WANG X.Y., Lu W., ZHENG X.L., 2021 Use of *Beauveria bassiana* in combination with commercial insecticides to manage *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Phaudidae): Testing for compatibility and synergy, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 24, 272-278

<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.01.016>

ESKI A., BIRYOL S., ACICI O., DEMIR I., 2022. Biocontrol of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) using indigenous entomopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 32:140

<https://doi.org/10.1186/s41938-022-00641-4>

FADY B., FINESCHI S., VENDRAMIN G.G., 2004. Directrices técnicas de EUFORGEN para la conservación y el uso genéticos del pino piñonero italiano (*Pinus pinea*). *Biodiversidad Internacional*

<http://www.redforesta.com/wp-content/uploads/2011/07/pinus-pinea.pdf>

FARIA M., WRIGHT S.P., 2001 Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20, 767-778

[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00110-7)

FARINHA A., DURPOIX C., VALENTE S., SOUSA E., ROQUES A., BRANCO M., 2018. The stone pine, *Pinus pinea* L., a new highly rewarding host for the invasive *Leptoglossus occidentalis*. *NeoBiota*, 41, p.1.

<http://dx.doi.org/10.3897/neobiota.41.30041>

FARINHA A.O., 2019. *Impact and ecological adaptation of Leptoglossus occidentalis (Hemiptera, Coreidae) on Pinus pinea* [Tesis Doctoral, Universidad de Lisboa]

https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/18324/1/PhD%20THESIS_Farinha_Jan2019.pdf

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

<https://scholar.valpo.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1783&context=tgle>

GARRIDO-JURADO I., RESQUIN-ROMERO G., AMARILLA S.P., RIOS-MORENO A., CARRASCO L., QUESADA-MORAGA E., 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science*.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-016-0767-2>

GONZALEZ-CASTILLO M., AGUILAR C.N., RODRIGUEZ-HERRERA R., 2012. Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 4 (8): 42-55.

<https://docplayer.es/12005190-Control-de-insectos-plaga-en-la-agricultura-utilizando-hongos-entomopatogenos-retos-y-perspectivas.html>

GOULA M. y MATA L., 2015. Orden Hemiptera. *Revista IDE@-SEA*, 53, 1-30.

http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_53.pdf

GUADAÑO C., Y MUTKE S., 2016. Establecimiento de plantaciones clonales de *Pinus pinea* para la producción de piñón mediterráneo. Monografías INIA: Serie Forestal N° 28. INIA, Madrid

https://www.researchgate.net/publication/310287648_Establecimiento_de_plantaciones_clonales_de_Pinus_pinea_para_la_produccion_de_pinon_mediterraneo_Monografias_INIA_Serie_Forestal_N_28

GUERRI-AGULLO B., GOMEZ-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. *Microsc. Res. Tech.* 73, 714–725.

<https://doi.org/10.1002/jemt.20812>

HAJEK A.E., ST. LEGER R.J., 1994. Interactions between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39, 293-322.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>

HEIDEMANN, O. 1910. New species of *Leptoglossus* from North America (Hemiptera; Coreidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington, 12: 191-197.

https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/71061/Heidemann_1910_191-197.pdf?sequence=1&isAllowed=y

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>.

KOERBER T. W., 1963. *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a Newly Discovered Pest of Coniferous Seed. Annals of the Entomological Society of America, 56(2), pp. 229-234.

<https://doi.org/10.1093/aesa/56.2.229>

LECUONA R.D., EDELSTEIN J.D., BERRETA M.F., LA ROSA F.R., ARCAS J.A., 2001 Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), *Journal of Medical Entomology*, 38 172-179

<https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.172>

LESIEUR V., YART A., GUILBON S., LORME P., AUGER-ROZENBERG M. A., ROQUES A., 2014. The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity?. *Biol Invasions* 16(9), 1833-1849

<http://dx.doi.org/10.1007/s10530-013-0630-9>

LOPEZ J.A., ALBA F., SANCHEZ D., LUENGO E., 2019. Los pinares de la Sierra de Gredos. Pasado, presente y futuro. Institución Gran Duque de Alba. 1ª ed, Ávila: Diputación de Ávila

https://www.researchgate.net/publication/332672463_Los_pinares_de_la_Sierra_de_Gredos_Pasado_presente_y_futuro

MCGUIRE A.V., NORTHFIELD T.D., 2020. Tropical Occurrence and Agricultural Importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:6.

<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>

MONTERO G., CALAMA R., RUIZ-PEINADO R., 2008. Selvicultura de *Pinus pinea* L. Compendio de Selvicultura de Especies. Editado por G. Montero, R. Serrada, y J. Reque. INIA - Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid. PP. 431-470

https://www.researchgate.net/publication/267642086_SELVICULTURA_DE_PINUS_PINEA

MONTERO G., RUIZ-PEINADO R., CANDELA J.A., CAÑELLAS I., GUTIERREZ M., PAVON J., ALONSO A., DEL RIO M., BACHILLER A., CALAMA R., 2004. Selvicultura de *Pinus pinea* L. (Cap. 2923) En *El Pino piñonero (Pinus pinea L.) en Andalucía: Ecología, Distribución y Selvicultura*, p. 293-313-252. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, España.

<https://gregoriomontero.files.wordpress.com/2016/09/2004-el-pino-pic3blonero-en-andalucc3ada.pdf>

MONZON A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Formato de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos- Manejo integrado de Plagas (Costa Rica)63: 95-103.

<http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

MUTKE S., IGLESIAS S., GIL L., 2007. Selection of Mediterranean stone pine clones for cone production. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales. 16(1): 39-51

<http://dx.doi.org/10.5424/srf/2007161-00996>

PAPIEROK B., SILVIE P., LATGE J.P., DEDRYVER C.A., RABASSE J.M., REMAUDIERE G., 1984. Biological Control of Cereal Aphids with Entomophthorales. CEC Programme on Integrated and Biological Control: Final Report, pp. 339–352.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.003>

PARLAK S., 2017. An invasive species: *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann) how does it affect forestry activities? Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 17(3), 531-542.

<http://dx.doi.org/10.17475/kastorman.292220>

PEREZ N., 2012. Primera cita de la chinche americana del pino, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemípteros:Coreidae), en la provincia de León (España) Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), nº 51 (31/12/2012): 311–312.

https://www.researchgate.net/publication/258076911_Primer_cita_de_la_chinche_americana_del_pino_Leptoglossus_occidentalis_Heidemann_Hemiptera_Coreidae_en_la_provincia_de_Leon

PONCE L., 2017 Determinación del Daño por *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) en Piñas de *Pinus pinea* L. [TFM] Universidad de Valladolid.

<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/26389/TFM-L327.pdf?sequence=1>

PONCE L., DOMINGUEZ J. C., 2020. El chinche de las piñas *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Revista Foresta Nº 78, 90-99

<https://www.forestales.net/Canales/Ficha.aspx?IdMenu=b6947309-987f-4bff-808d-4e7e974ccaf8&Cod=e0bc80f8-56d3-47d9-9bac-8dc74707a7dd&Idioma=es-ES>

PRADA M.A., GORDO J., DE MIGUEL L., MUTKE S., CATALAN G., IGLESIAS S., GIL L., 1997. Las regiones de procedencia de *Pinus pinea*. En España, OAPN-MAPA, Madrid, 130p ISBN 978-84-7498-565-8.

https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/publicaciones/Pinus_pinea_tcm30-139352.pdf

PUCHETA D. M., FLORES A., RODRIGUEZ S., DE LA TORRE M., 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia, vol. 31 numero 012. Asociación intercienca. Caracas, Venezuela. Pp 856-860

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

QUESADA-MORAGA E., NAVAS-CORTES J.A., MARANHÃO E.A.A., ORTIZ-URQUIZA A., SANTIAGO-ALVAREZ C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycological Research 111: 947–966

<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.006>

R CORE TEAM 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

<https://www.R-project.org/>.

RIBES J. y ESCOLA O., 2005 “Leptoglossus occidentalis” Heidemann., 1910, hemípter neártic Trobat a Catalunya (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae)». Sessió Conjunta d’Entomologia, Núm. 13, diciembre de 2005, p. 47-50.

<https://raco.cat/index.php/SessioEnto/article/view/153649>

RUMINE P., BARZANTI G.P., 2008. Controllo microbiologico della “cimice delle conifere”: prove preliminari di laboratorio [Microbiological control of the leaf-footed bug *Leptoglossus occidentalis*: first laboratory trials]. Giornate Fitopatologiche, 1: 307–308.

<http://www.giornatefitopatologiche.it/it/download/23?idMat=33198>

SANI I., ISMAIL S.I., ABDULLHA S., JALINAS J., JAMIAN S., SAAD N., 2020. A Review of the Biology and Control of Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic Fungi. *Insects*. 2020; 11(9):619.

<https://doi.org/10.3390/insects11090619>

SCHAFFNER J.C., 1967. The occurrence of *Theognis occidentalis* in the midwestern unite states (Heteroptera: Coreidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 40. 141-142.

<https://www.jstor.org/stable/25083655>

TAKACS S., BOTTOMLEY H., ANDRELLER I., ZARADNICK T., SCHWARZ J., BENNETT R., STRONG W., GRIES G., 2009. infrared radiation from hot cones on cool conifers attracts seed-feeding insects. *Proc. R. Soc. B.* 276: 649–655

<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2008.0742>

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.

<https://www.biodiversitylibrary.org/item/93089#page/113/mode/1up>

THERNEAU T., 2022. A Package for Survival Analysis in R_. R package version 3.4-0.

<https://CRAN.R-project.org/package=survival>.

VALCARCEL J.P. y PORTILLO P., 2009. Primer registro de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae) para Murcia (S.E. de la Península Ibérica). *Archivos Entomológicos*, 2:5.

https://www.aegaweb.com/archivos_entomoloxicos/ae02_2009_valcarcel_portillo_leptoglossus_occidentalis_murcia.pdf

VAZQUEZ M. A., COSTAS M., OURTERELO R., MELERO-ALCIBAR, R., 2009. Una chinche invasora en la Comunidad de Madrid: *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae). *Heteropterus Revista de Entomología*, 9(1), 49-51.

<http://bba.bioucm.es/cont/docs/146.pdf>