



**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CONSERVACIÓN Y USO  
SOSTENIBLE DE LOS SISTEMAS FORESTALES**

**TESIS DOCTORAL:**

**Daños causados por *Leptoglossus occidentalis* Heidemann  
en *Pinus pinea* L., prospección de parasitoides de huevos  
y evaluación de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet)  
como agente de control biológico**

Presentada por Laura Ponce Herrero para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Fernando Manuel Alves Santos  
Dr. Valentín Pando Fernández

-2023-

En memoria de Dr. Juan A. Pajares Alonso

Me enseñaste a pensar de forma un poco más crítica

Dedicada a Alberto Sacristán Velasco

Gracias por estar siempre y acompañarme en todo

# ÍNDICE

Listado de figuras .....	1
Listado de tablas.....	10
Listado de abreviaturas y siglas.....	15
Resumen.....	17
Abstract .....	19
1. Introducción .....	21
1.1. El pino piñonero: <i>Pinus pinea</i> L.....	21
1.1.1. Taxonomía y morfología .....	21
1.1.2. Distribución .....	25
1.1.3. Ecología.....	28
1.1.4. Fenología .....	28
1.1.5. Aprovechamientos forestales.....	30
1.1.6. Producción de piñón.....	33
1.1.7. Plagas de las piñas .....	36
1.2. La chinche de las piñas: <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann .....	38
1.2.1. Taxonomía y morfología .....	38
1.2.2. Biología y fenología .....	41
1.2.3. Distribución y especies hospedantes .....	43
1.2.4. Daños causados por <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	51
1.3. <i>Leptoglossus occidentalis</i> y <i>Pinus pinea</i> .....	59
1.4. <i>Leptoglossus occidentalis</i> , la Gestión Integrada de Plagas (GIP) y el Manejo Integrado de Plagas (MIP) .....	66
1.4.1. Resistencia genética del hospedante .....	68
1.4.2. Control cultural.....	69
1.4.3. Estrategias de persuasión y atracción .....	70
1.4.4. Control químico .....	71
1.4.5. Control biológico .....	72
2. Objetivos .....	88
3. Material y métodos .....	90
3.1. Zonas de experimentación .....	90
3.2. Colonia de laboratorio de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	91

3.3. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de <i>Pinus pinea</i> causados por la alimentación de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	92
3.3.1. Embolsamiento de piñas con <i>Leptoglossus occidentalis</i> : daños estacionales .....	92
3.3.2. Ensayo de exclusión: daños causados por la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> ....	94
3.3.3. Procesado de piñas y piñones .....	95
3.4. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	98
3.4.1. Prospección de parasitoides de huevos nativos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	98
3.4.2. Monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	101
3.5. Evaluación de <i>Ooencyrtus obscurus</i> como enemigo natural de <i>Leptoglossus occidentalis</i> en laboratorio .....	101
3.5.1. Colonia de laboratorio de <i>Ooencyrtus obscurus</i> .....	101
3.5.2. Diseño experimental.....	102
3.6. Análisis de datos .....	105
3.6.1. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de <i>Pinus pinea</i> causados por la alimentación de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	105
3.6.2. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	107
3.6.3. Evaluación de <i>Ooencyrtus obscurus</i> como enemigo natural de <i>Leptoglossus occidentalis</i> en laboratorio.....	108
4. Resultados .....	111
4.1. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de <i>Pinus pinea</i> causados por la alimentación de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	111
4.1.1. Embolsamiento de piñas con <i>Leptoglossus occidentalis</i> : daños estacionales .....	111
4.1.2. Ensayo de exclusión: daños causados por la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> ..	119
4.2. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	122
4.2.1. Prospección de parasitoides de huevos nativos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	122
4.2.2. Monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .....	131
4.3. Evaluación de <i>Ooencyrtus obscurus</i> como enemigo natural de <i>Leptoglossus occidentalis</i> en laboratorio .....	133
5. Discusión .....	138
6. Conclusiones.....	168
Referencias.....	170
Agradecimientos .....	215

## Listado de figuras

**Figura 1. Masa de *Pinus pinea* L.** Pinar maduro de pino piñonero con copas aparasoladas. Monte “Corbejón y Quemados” nº 43 de UP, La Pedraja de Portillo (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 23

**Figura 2. Masa joven de *Pinus pinea* L.** Plantación joven de pino piñonero con copas esféricas. Monte “Común y Escobares” nº 17 de UP, Nava del Rey (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 23

**Figura 3. (a) Acículas; (b) braquiblastos y fascículos las acículas; (c) yemas y piña de primer año de *Pinus pinea* L.** Banco clonal “El Molinillo” Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. .... 24

**Figura 4. (a) Estróbilos femeninos; (b) brácteas y escudetes de una piña de tercer año de *Pinus pinea* L.** Banco clonal “El Molinillo” Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 24

**Figura 5. (a) Piñón con cáscara y ala; (b) partes del piñón de *Pinus pinea* L.** Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 24

**Figura 6. Distribución de *Pinus pinea* L. en la cuenca mediterránea.** Naranja: localidades con distribución conocida. Azul: áreas de distribución nativa. Gris: países con distribución nativa (Wazen y Fady, 2015). .... 25

**Figura 7. Distribución del *Pinus pinea* L. en España.** Verde: masas autóctonas. Azul: masas no autóctonas (SIG-FOREST, 2023). .... 26

**Figura 8. Distribución de *Pinus pinea* L. en Castilla y León.** Verde: masas de pino piñonero (MITECO, 2023b). .... 27

<b>Figura 9. (a) Estróbilos femeninos; (b) segunda floración junto con piñas de primer año; (c) piña de segundo año; (d) piña de tercer año. Banco clonal “El Molinillo” Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 10. Producción de piñón estimada a nivel mundial por año. Toneladas (INC, 2020).....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 11. Principales países productores de piñones a nivel mundial. Piñones comestibles por especie y país (INC, 2019).....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 12. Producción e importaciones estimadas de piñón blanco en España. Datos anuales de producción (gris) e importaciones (negro) de piñón blanco en toneladas. *Producción en 2004, importaciones disponibles para la serie de datos 1999 - 2006 y 2019 - 2021 (INC, 2020; MITECO, 2020). .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13. Piñas de <i>Pinus pinea</i> L. dañadas por <i>Dioryctria mendacella</i> Stgr. (a) piña de primer año; (b) piña de segundo año; (c) piña de tercer y larva de <i>D. mendacella</i>. Autoría: Ponce-Herrero, L., Sacristán-Velasco, A. y Ponce Díaz, A. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14. Piñas de <i>Pinus pinea</i> L. dañadas. (a) Orificios de salida de imagos de <i>P. validirostris</i>; (b) daños de ardilla; (c) puesta de <i>T. pityocampa</i>. Autoría: Ponce-Herrero, L., y Ponce Díaz, A.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 15. Morfología de los imagos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. (A) macho; (B) hembra. Modificación de Lee et al. (2023).....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 16. Puesta y huevos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. (a) Puesta sobre acícula de <i>P. pinea</i> con ninfas en avanzado estado de desarrollo; (b) huevo recién ovipositado; (c) huevo con ninfa en avanzado estado de desarrollo; (d) huevo eclosionado. Autoría: Ponce-Herrero, L.....</b>	<b>40</b>

**Figura 17. Morfología de los estadios inmaduros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (A) primer estadio (N1); (B) segundo estadio (N2); (C) tercer estadio (N3); (D) cuarto estadio (N4); (E): quinto estadio (N5) (Lee et al., 2023). ..... 40

**Figura 18. Ciclo de vida de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (I) Comienzo de la actividad tras oligopausa (gris claro); (II) alimentación de los adultos; (III) cópula; (IV y V) puesta; (VI) emergencia de las ninfas; (VII) ninfas de primer estadio (N1); (VIII) ninfas de segundo estadio (N2); (IX) ninfas de tercer estadio (N3); (X) ninfas de cuarto estadio (N4); (XI) ninfas de quinto estadio (N5); (XII) los adultos pueden volver a copular para dar lugar a más de una generación anual o agregarse, al igual que las ninfas de último estadio, para iniciar la oligopausa (gris oscuro). Autoría de las fotografías: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A..... 43

**Figura 19. Distribución de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en Norteamérica.** Distribución nativa de la especie al oeste de las Montañas Rocosas (sombreado en gris), y expansión y primeros registros al este de Norteamérica (Dusoulie et al., 2007). .... 44

**Figura 20. Distribución mundial de *L. occidentalis* Heidemann.** Puntos amarillos: avistamientos (EPPO, 2023)..... 46

**Figura 21. Registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en Europa.** Puntos: registros de *L. occidentalis* (Jung et al., 2023). ..... 46

**Figura 22. Modelo de dispersión global de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en 2050.** Escenarios de emisión moderada (RCP 2.5) y elevadas (RCP 8.5) de gases de efecto invernadero (GEI) (Oliveira et al., 2021)..... 50

**Figura 23. Semillas sanas y expuestas a la alimentación *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Semilla de *P. menziesii* sana; (b) semilla de *P. menziesii* dañada; (c) semillas de *P. ponderosa* sanas (arriba) y dañadas (abajo); (d) semillas de *P. sylvestris* sanas (arriba), abortadas de forma natural (abajo) y diferente intensidad de daño en el

endospermo (medio). Modificación de Dale y Schenk (1978); Koerber (1963) y Lesieur et al. (2014). ..... 53

**Figura 24. Rendimiento del piñón blanco por kilo de piñón con cáscara de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016.** Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020). ..... 61

**Figura 25. Rendimiento de piñón con cáscara por kilo de piña fresca de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016.** Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020). ..... 61

**Figura 26. Rendimiento de piñón blanco por kilo de piña fresca de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016.** Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020). ..... 62

**Figura 27. Proporción de piñones dañados de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016.** Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis*. Se incluyen piñones vanos y piñones con daños en el endospermo (Calama et al., 2020). ..... 62

**Figura 28. Piñones de *Pinus pinea* L. con el endospermo dañado por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Piñones blancos expuestos a la alimentación de tres adultos de *L. occidentalis* durante dos meses en condiciones de laboratorio. Modificación de Farinha et al. (2018a). ..... 63

**Figura 29. Categorización de los piñones de *Pinus pinea* L. según Farinha et al. (2018b).** ..... 64

**Figura 30. Adultos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann afectados por un hongo entomopatógeno.** Conidios de *Metarhizium flavoviride*. White conidia: tras 6 días en cámara húmeda; green conidia: tras 10 días en cámara húmeda (Eski et al., 2022). 75

**Figura 31. *Trichopoda pennipes* (F.).** (A) hembra; (B) macho (Ricarte et al. 2020). ..... 76

**Figura 32. Parasitoides de huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead; (b) *Ooencyrtus pityocampae* Mercet. Modificación de Mercet (1921) y Roversi et al. (2011b). ..... 81

**Figura 33. Fecundidad a lo largo de la vida de *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead.** Número de prole hembras por hembra y porcentaje de supervivencia de las hembras por día (Sabbatini Peverieri, 2012). ..... 84

**Figura 34. Distribución de la oviposición a lo largo de la vida de las especies pro-ovigénicas y sinovigénicas.** Los huevos ovipositados por hembras pro-ovigénicas aumentan linealmente con el tiempo porque emergen con todos los huevos maduros, mientras que en las sinovigénicas aumenta de forma escalada y progresiva porque emergen con una parte de los huevos inmaduros y el resto se desarrollan con el tiempo (Heimpel y Rosenheim, 1998). ..... 85

**Figura 35. Banco clonal “El Molinillo”.** Parcela 15 (B23TORa) (línea continua) y parcelas 19 y 20 (B23TORa) (línea discontinua). Modificación de Visor IDECyL (2023). ..... 91

**Figura 36. Colonia de laboratorio de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Laboratorio de Plagas y Enfermedades Forestales de la Universidad de Valladolid (Palencia). Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 92

**Figura 37. Piñas de *Pinus pinea* L. embolsadas.** (a) Piñas de primer, (b) segundo y (c) tercer año embolsadas para el desarrollo de los ensayos de caracterización y cuantificación de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* a lo largo de su desarrollo fenológico. Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. .... 92

**Figura 38. Piñas de primer, segundo y tercer año de *Pinus pinea* L. abortadas.** (a) Piña de primer año embolsada con dos hembras del 10 al 24 de abril (izq.) al lado de una

piña de tercer año no embolsada con insectos (der.), fotografiada el 21 de mayo. (b) Piña de segundo año embolsada con dos hembras del 7 al 21 de mayo (der.) al lado de una piña de segundo año no embolsada con insectos (izq.), fotografiada el 4 de junio. (c) Piña de primer año embolsada con dos ninfas del 2 al 9 de julio. Piña de primer año sana fotografiada el 9 de julio (izq.) y una semana más tarde abortada (der.). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. .... 94

**Figura 39. Ensayo de exclusión.** Pinos con cinco piñas embolsadas y cinco expuestas para estimar los daños causados por la población de *L. occidentalis* a lo largo de su desarrollo fenológico. Parcela 15 (B23TORa) del banco clonal “El Molinillo”. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 95

**Figura 40. Procesado de piñas y piñones de *Pinus pinea* L.** (a) Piña verde; (b) pesaje de piña seca; (c) piñones extraídos de una piña seca; (d) apertura manual y clasificación de piñones. Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. .... 96

**Figura 41. Clasificación de piñones.** (Excluidos) piñones con una longitud menor a 6 mm; (Sanos), piñones comercializables, endospermo no dañado; (Abortados) piñones vanos, sin embrión ni endospermo; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado; (Ilf) piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 97

**Figura 42. Prospección de parasitoides nativos de huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Pino con colonias formadas por dos hembras y un macho para la obtención de puestas en campo; (b) rama con puestas expuestas al parasitismo; (c) puestas recolectadas tras una semana de exposición al parasitismo en campo. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 99

**Figura 43. Categorización de los huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann de las puestas expuestas al parasitismo en campo.** (A) Huevo fértil sin emergencia de ninfa;

(B) huevo fértil tras emergencia de la ninfa; (C) huevo no fértil; (D) huevo no fértil y deshidratado; (E) huevo abortado; (F) huevo depredado (G) huevo parasitado con stalks (círculos blancos); (H) huevo parasitado con detritus y puntos negros bajo el corion. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 100

**Figura 44. Huevos parasitados de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann no eclosionados.** (a) Huevo parasitado no eclosionado; (b) disección de huevo con masa translúcida y granular; (c) larva abortada. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 101

**Figura 45. Colonia de parasitoides de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Parte de la colonia de *O. obscurus*; (b) huevos de *L. occidentalis* almacenados en frío. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 102

**Figura 46. Ensayos de parasitismo de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Desarrollo de los ensayos de parasitismo en condiciones estándar de laboratorio; (b) detalle de las puestas de *L. occidentalis* sobre las acículas grapadas a un trozo de papel secante dentro del tubo de ensayo. Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 103

**Figura 47. Hembras de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) parasitando huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. .. 104

**Figura 48. Huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann parasitados y dos *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) emergidos.** Autoría: Ponce-Herrero, L. .... 104

**Figura 49. Mortalidad y rendimiento de las piñas.** Mortalidad media de las piñas (%) y rendimiento medio de las piñas (%). (a) (b) Ensayo 1. Piñas de tercero embolsada con hembras; (c) (d) Ensayo 2. Piñas de segundo embolsadas con hembras; (e)(f) Ensayo 3. Piñas de primero embolsadas con ninfas. Las columnas en la misma gráfica con la misma letra no son significativamente diferentes (t-test; *p*-valor < 0,05). .... 115

<b>Figura 50. Secuencia de daños en piñas y piñones de <i>P. pinea</i> en función del momento de la alimentación de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann a lo largo de su desarrollo fenológico. Autoría fotografías: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A. ....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 51. <i>Ooencyrtus obscurus</i> (Mercet). (a) Vista superior y (b) vista inferior de un macho de <i>O. obscurus</i>. Autoría: Ponce-Herrero, L. ....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 52. <i>Ooencyrtus pityocampae</i> (Mercet). (a) Vista superior y (b) vista inferior de una hembra de <i>O. pityocampae</i>. Autoría: Ponce-Herrero, L. ....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 53. Periodo de actividad de <i>Ooencyrtus obscurus</i> (Mercet) y <i>Ooencyrtus pityocampae</i> (Mercet) en huevos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. Banco clonal 2017, 2018 y 2019, y Repoblación 2019. Actividad estimada por comparación del número de huevos parasitados por cada especie y el total de huevos ovipositados por las hembras en las colonias de campo (barras) por semana. Parasitoides de las especies <i>O. obscurus</i> (○) y <i>O. pityocampae</i> (□) encontrados sobre puestas de <i>L. occidentalis</i> de las colonias de campo.....</b>	<b>130</b>
<b>Figura 54. Monitoreo visual de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. (a) Adulto en acícula; (b) ninfas de segundo (N2) y tercer (N3) estadio sobre una piña; (c) ninfas de primer (N1) y segundo (N2) estadio en acícula; (d) puesta con un huevo parasitado diferenciado por su color más oscuro (cuarto desde arriba). Autoría: Ponce-Herrero, L., Ponce Díaz, A.....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 55. Registro de la población de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann en el banco clonal. Número de huevos, huevos parasitados, ninfas por estadio (N1, N2, N3, N4 y N5), y adultos encontrados en ramas y piñas bajas durante los monitoreos semanales realizados en las parcelas 15, 19 y 20 del banco clonal en 2018 y 2019. ....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 56. Relación entre la edad de las hembras y la <i>sex ratio</i> (% hembras) de la progenie de <i>Ooencyrtus obscurus</i> (Mercet). Modelo mixto de regresión lineal (<i>t</i>-valor =</b>	

2,48 con  $p$ -valor = 0,024) para la edad de las hembras y la sex ratio (% hembras) de la progenie de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27)..... 135

**Figura 57. Fecundidad de las hembras de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) a lo largo de su vida en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Fecundidad media (+SE) de las hembras a una edad específica (barras) y supervivencia de las hembras (%) de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27)..... 136

**Figura 58. Apariencia externa de los huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann parasitados por *Ooencyrtus obscurus* (Mercet).** (a) Stalks sobre el corion; (b) puntos y/o líneas negras bajo el corion que indican el desarrollo del parasitismo; (c) detritus bajo el corion que revela la emergencia de la larva y su desarrollo; (d) orificios de salida de los parasitoides; (e) parasitoide emergiendo. Condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27)..... 137

## Listado de tablas

<b>Tabla 1. Nomenclatura común de <i>Pinus pinea</i> L. por zona geográfica.</b> (López González, 2007; Prada et al., 1997).....	21
<b>Tabla 2. Distribución de <i>Pinus pinea</i> L. en la cuenca mediterránea.</b> Superficie ocupada por las masas de pino piñonero por país (MITECO, 2020; Mutke et al., 2015b). .....	25
<b>Tabla 3. Distribución de <i>Pinus pinea</i> L. en Castilla y León.</b> Superficie en hectáreas ocupada por las masas puras de pino piñonero en Castilla y León por provincia y porcentaje de superficie arbolada respecto al total para cada una de las provincias según el Cuarto Inventario Forestal Nacional (IFN4) (MITECO, 2023b). .....	27
<b>Tabla 4. Ecología de <i>Pinus pinea</i> L.</b> Parámetros principales que definen la ecología del pino piñonero en su área de distribución nativa (Calama y Montero, 2007; Guadaño y Mutke, 2016; López González, 2007; Mutke et al., 2005b; 2012; Prada et al., 1997). .....	28
<b>Tabla 5. Umbrales de plantación recomendados para las masas productoras de piñón blanco.</b> Principales parámetros de plantación del pino piñonero enfocados a la producción de piñón blanco (Guadaño y Mutke, 2016). .....	33
<b>Tabla 6. Especies de pinos productoras de piñones comestibles.</b> Área de distribución, importancia económica y uso de las principales especies de piñones comestibles a nivel mundial (Awan y Petenella, 2017; INC, 2019). .....	33
<b>Tabla 7. Operadores de piñas y piñones en Castilla y León.</b> Datos por provincia (Junta de Castilla y León, 2023). .....	36
<b>Tabla 8. Características morfológicas de los imagos de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann.</b> (Allen, 1969; Heidemann, 1910; Koerber, 1963; Lee et al., 2023). .....	38

<b>Tabla 9. Características morfológicas de los estadios inmaduros de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. (Koerber, 1963; Lee et al., 2023).</b> .....	39
<b>Tabla 10. Primeros registros de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann en Europa. Año en el que se detectó por primera vez <i>L. occidentalis</i> por país y fuente.</b> .....	45
<b>Tabla 11. Registros de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann en España. Año en el que se citó por primera vez <i>L. occidentalis</i> por Comunidad Autónoma y fuente.</b> .....	47
<b>Tabla 12. Especies hospedantes de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. Modificación de Werner (2011).</b> .....	48
<b>Tabla 13. Parámetros de una tabla de vida. Definición y unidad de los parámetros de una tabla de vida (Roversi et al., 2017).</b> .....	82
<b>Tabla 14. Parámetros demográficos. Definición, unidad y fórmula de los parámetros demográficos (Jervis et al., 2007).</b> .....	83
<b>Tabla 15. Parámetros de los ensayos de caracterización y cuantificación de los daños a piñas y piñones de <i>Pinus pinea</i> L. causados por la alimentación de <i>Leptoglossus occidentalis</i> Heidemann. Número y estadio de <i>L. occidentalis</i> embolsados por piña, número de pinos, número de piñas embolsadas con insectos (E) y número de piñas protegidas (P) de la alimentación de la población de <i>L. occidentalis</i> por pino, fecha de embolsamiento y ensayo.</b> .....	93
<b>Tabla 16. Colonias de campo. Número de colonias instaladas por semana (S) y mes en el banco clonal (2017, 2018 y 2019) y en la repoblación (2019) de <i>P. pinea</i> para la obtención de huevos de <i>L. occidentalis</i> en campo para la prospección de parasitoides de huevos nativos.</b> .....	98

**Tabla 17. Piñas de tercer año embolsadas con hembras.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (lp) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (lt) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test;  $p$ -valor < 0,05). ..... 116

**Tabla 18. Ensayo 2. Piñas de segundo año embolsadas con hembras.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (lp) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (lt) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test;  $p$ -valor < 0,05). ..... 117

**Tabla 19. Ensayo 3. Piñas de primer año embolsadas con ninfas.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (lp) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (lt) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test;  $p$ -valor < 0,05). ..... 118

**Tabla 20. Ensayo de exclusión.** Mortalidad media de las piñas por año (%), rendimiento (%), número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu)

piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (lp) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (lt) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test;  $p$ -valor < 0,05). ..... 120

**Tabla 21. Puestas y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann obtenidos en las colonias de campo. Clasificación por categoría y semana (S) en el banco clonal (2017, 2018 y 2019) y en la repoblación (2019). ..... 123**

**Tabla 22. Porcentaje medio (95% IC) del índice de eficiencia de descubrimiento, porcentaje de parasitismo, índice de eficiencia de explotación de las puestas e impacto sobre la población plaga. Por especie y ensayo. BC: banco clonal; R: repoblación. Las medias en la misma fila por índice con la misma letra no son significativamente diferentes (t-test,  $p$ -valor < 0,05). ..... 127**

**Tabla 23. Número de parasitoides emergidos de las puestas parasitadas de las colonias de campo. Sex ratio (machos:hembras) y ratio de emergencia (Número de parasitoides emergidos/huevo) por especie y ensayo. .... 129**

**Tabla 24. Parámetros de la tabla de vida de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Valores medios ( $\pm$  SE) para *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27). ..... 134**

**Tabla 25. Parámetros demográficos de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Valores medios en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27). ..... 137**

**Tabla 26. Comparación de algunos parámetros de la tabla de vida y demográficos de varios parasitoides de huevos y plagas. C: Coreidae P: Pentatomidae; A: reproducción arrenotóquica; <sup>1</sup>sex ratio (machos/hembras); <sup>2</sup>sex ratio (% hembras) (Catalán y Verdú, 2005; Ganjisaffar y Perring, 2020; Giovannini et al., 2020; Martel et al., 2019; Mohammadpour et al., 2018; Nechols et al., 1989; Power, 2020; Roversi et al., 2017; Sabbatini Peverieri et al., 2012; Straser et al., 2022; Tunca et al., 2019)..... 167**

## Listado de abreviaturas y siglas

A: reproducción arrenotóquica

ACB: agente de control biológico

Aprox.: aproximadamente

BC: banco clonal

C: Coreidae

CC: madera con corteza

CDW: peso seco de la piña

CFW: peso fresco de la piña

CFW\*: peso fresco de la piña estandarizado

CS: estructura de simetría compuesta de la varianza

Diam.: diámetro

GEI: gases de efecto invernadero

GIP: gestión integrada de plagas

GLIMMIX: modelo lineal mixto generalizado

GRR: tasa bruta de reproducción

H: humedad

HR: humedad relativa

IC: intervalo de confianza

IFN4: cuarto Inventario Forestal Nacional

$l_x$ : ratio de supervivencia de las hembras a una edad específica

L:O: horas de luz:oscuridad

Long.: longitud

Max.: máximo

MIXED: modelo lineal mixto

MS: materia seca

$m_x$ : fecundidad de las hembras de parasitoides a una edad específica

P: Pentatomidae

PCB: programa de control biológico

PS: peso de los piñones sanos

R: repoblación

RCP: escenario de emisión de gases de efecto invernadero

$r_m$ : tasa intrínseca de crecimiento

$R_0$ : tasa neta de reproducción

S: semana

SCW: peso de los piñones sanos

SE: error estándar de la media

T: duración media de una generación

$T_d$ : tiempo de duplicación de la población

UE: Unión Europea

UN: matriz de covarianza aleatoria no estructurada

UP: utilidad pública

x: edad de las hembras madre

$\lambda$ : capacidad finita de incremento

$\rho$ : rendimiento de piñón blanco por piña

## Resumen

*Leptoglossus occidentalis* Heidemann es una plaga nativa de Norteamérica, asociada con daños en piñas y semillas en huertos semilleros, dónde presenta su principal enemigo natural, *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead. La introducción de esta plaga en la cuenca mediterránea coincide con la reducción del rendimiento de las cosechas de piñón blanco, producto forestal con alto valor económico, fenómeno denominado “síndrome de la piña seca”. Los objetivos de este estudio se centran en relacionar los daños causados por *L. occidentalis* en piñas de *Pinus pinea* L. con dicho síndrome, en identificar especies de parasitoides nativos, estimar su sincronización con *L. occidentalis*, y en evaluar la aptitud como agente de control biológico del parasitoide con mayor impacto en la población plaga. Los daños estacionales en piñas y piñones se estimaron mediante tres ensayos de embolsamiento de piñas con insectos en diferentes momentos de su desarrollo fenológico, mientras que los daños causados por la población se estimaron mediante la protección y exposición de piñas durante su desarrollo fenológico en un banco clonal. Se realizaron cuatro prospecciones de parasitoides de huevos nativos, tres en el banco clonal y una en una repoblación de *P. pinea*. El impacto de las especies se estimó mediante el cálculo de cuatro índices de parasitismo y su sincronización con *L. occidentalis* se definió mediante el monitoreo visual de la plaga en el banco clonal durante dos años. La aptitud de *O. obscurus* como agente de control biológico se estimó en condiciones estándar de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40\% \pm 10\%$ ) y luz blanca (16:8; L:O) mediante la comparación de sus parámetros biológicos y demográficos con los de *H. pennsylvanicus*. Los resultados indican que *L. occidentalis* es uno de los causantes del “síndrome de la piña seca”, aunque no se puede descartar la influencia de otros factores. La severidad de los daños varía en función del momento del desarrollo fenológico de las piñas y piñones en la que se alimenta esta especie, reduciéndose con el avance de su desarrollo. La mortalidad de las piñas de primer (10,0% - 100,0%) y tercer año (0,0% - 90,0%) se reduce con el endurecimiento de las brácteas, mientras que la mortalidad de las piñas de segundo año fluctúa manteniéndose elevada durante todo su desarrollo (10,0% - 100,0%). En las piñas de tercer año, el rendimiento (2,1% - 3,6%) aumenta de forma progresiva a partir de junio con la maduración de los piñones, mientras que la severidad de los daños en

los piñones disminuye siguiendo la secuencia: piñones abortados, tipo If, tipo Ilu, tipo It y tipo Ip. Se identificaron dos parasitoides nativos, *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) y *Ooencyrtus obscurus* (Mercet), no solapándose con *L. occidentalis* hasta julio. *Ooencyrtus obscurus* supone una nueva relación parasitoide-hospedante y tiene un mayor impacto sobre la población plaga (9,9% - 26,7%) que *O. pityocampae* (1,3% - 15,8%). Los parámetros demográficos de *O. obscurus* indican que su dinámica poblacional tiende a aumentar, siendo su tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) 3,55 hembras/hembra/generación en una generación (T) de 23,93 días, y su periodo de duplicación de la población de 14,34 días. *Ooencyrtus obscurus* es una especie sinovigénica, con un periodo de oviposición medio de 2,3 días y una fecundidad media de 7,7 parasitoides/hembra. Su ratio de emergencia es de 1,7 parasitoides/huevo, tratándose de una especie gregaria. Su sex ratio (% hembras) es 41,2%, aunque es capaz de reproducirse por partenogénesis pseudo-arrenotóquica. Los resultados obtenidos, tanto en campo como en laboratorio, sugieren que *O. obscurus* tiene una menor aptitud como agente de control biológico de *L. occidentalis* que su principal enemigo natural en Norteamérica. Sin embargo, no hay que desestimar sus ventajas como especie nativa.

## Abstract

*Leptoglossus occidentalis* Heidemann, is a pest native to North America where it is associated with cone damage in seed orchards. In this area, *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead is the main natural enemy of *L. occidentalis*. The introduction of this pest in the Mediterranean area coincides with a reduction in the yield of pine nut crops in the Mediterranean region, a forest product of high economic value, known as "dry cone syndrome". The objectives of this study are to correlate the damage caused by *L. occidentalis* on *Pinus pinea* L. with this syndrome, to identify native parasitoids of *L. occidentalis* eggs, estimate their synchrony with *L. occidentalis*, and to evaluate the suitability of the parasitoid with the greatest impact on the pest population as a biological control agent. Seasonal damage to cones and kernels was defined by three insect bagging trials at different times of cone development, while population damage was estimated by protecting and exposing cones throughout their development in a clonal bank. Four surveys of native egg parasitoids were conducted, three in the clone bank and one in a *P. pinea* reforested pine forest. Four parasitism indices were used to estimate the impact of the native egg parasitoids on the *L. occidentalis* population, and their synchronization was defined by two years of visual monitoring of the pest in the clone bank. The suitability of *O. obscurus* as a biological control agent was evaluated under standard laboratory conditions ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; RH  $40\% \pm 10\%$ ) and white light (16:8; L:D) by comparing its biological and demographic parameters with those of *H. pennsylvanicus*. The results suggest that *L. occidentalis* is one cause of the "dry cone syndrome", although the influence of other factors cannot be excluded. The severity of the damage varies with the development of the cones and kernels on which this species feeds, decreasing as development progresses. Mortality of first (10.0% - 100.0%) and third (0.0% - 90.0%) year cones decreased with bract hardening, while mortality of second year cones fluctuated and remained high throughout their development (10.0% - 100.0%). In third year cones, cone yield (2.1% - 3.6%) increases progressively with cone maturity from June, while the severity of kernel damage decreases in the following order: aborted kernels, type II<sub>f</sub>, type II<sub>u</sub>, type I<sub>t</sub> and type I<sub>p</sub>. Two native parasitoids were identified, *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) and *Ooencyrtus obscurus* (Mercet), which do not overlap with *L. occidentalis* until July. *Ooencyrtus obscurus* involves a new

parasitoid-host relationship and has a greater impact on the pest population (9.9% - 26.7%) than *O. pityocampae* (1.3% - 15.8%). The demographic parameters of *O. obscurus* indicate that its population dynamics tend to increase, with a net reproductive rate ( $R_0$ ) of 3.55 female/female/generation in a generation time (T) of 23.93 days and a population doubling time of 14.34 days. *Ooencyrtus obscurus* is a synovigenic species. The mean oviposition time is 2.3 days, and the mean fecundity is 7.7 parasitoids/female. This species is gregarious with an emergence rate of 1.7 parasitoids/egg. Its sex ratio (% females) is 41.2%, although it can reproduce asexually by pseudo-arrhenotokous parthenogenesis. Field and laboratory results suggest that *O. obscurus* is less suitable as a biological control agent for *L. occidentalis* than its main natural enemy in North America. However, its advantages as a native species should not be underestimated.

# 1. Introducción

## 1.1. El pino piñonero: *Pinus pinea* L.

### 1.1.1. Taxonomía y morfología

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una conífera mediterránea perteneciente a la familia Pinaceae, al subgénero *Diploxylon* y al género *Pinus* (Mutke, 2022; Mutke et al., 2012). También es denominada *P. domestica* Mathiol, *P. fastuosa* Salisb., *P. masderensis* Tenore, *P. sativa* C. Bauh o *P. umbraculifera* Toumeh (Prada et al., 1997). Su nomenclatura común varía geográficamente (Tabla 1).

**Tabla 1. Nomenclatura común de *Pinus pinea* L. por zona geográfica.** (López González, 2007; Prada et al., 1997).

Zona geográfica	Nombre común	
España	Andalucía	Pino real Pino de la tierra
	Baleares	Pi ver Pi vé
	Cataluña	Pi pinyoner Pi bo
		Pi de llei
	Cuenca	Pino doncel
	Galicia	Pino manso Pino cernil
	Meseta Norte (Castilla y León)	Pino piñonero Pino albar
	País Vasco	Pinazi pinua
	Valencia	Pino vero
	Francia	Pin parasol Pin pingnon
Italia		Pino domestico Pino da pinoli Pino italico
	Portugal	Pinheiro-manso

El pino piñonero es una especie perenne que alcanza los 10 - 20 m de altura a turno (80 - 120 años) en su hábitat natural, aunque puede llegar a los 35 m. Su copa en forma de paraguas es característica y típica de los paisajes mediterráneos (Figura 1) (Mutke, 2022; Mutke et al., 2012). Puede llegar a vivir 200 - 250 años, encontrándose ejemplares de hasta 400 años (Prada et al., 1997).

El sistema radicular del pino piñonero es robusto y bien desarrollado, formado por raíces secundarias que se extienden vertical y horizontalmente, superando la proyección de la copa. Las raíces de diferentes pinos se pueden fusionar formando injertos radiculares a través de los que intercambian nutrientes (anastomosis). La raíz de las plántulas es pivotante y filiforme, y aborta temprano (Prada et al., 1997).

El tronco del pino piñonero es derecho, cilíndrico y puede alcanzar un diámetro de 1,5 m. La corteza es de color marrón-rojizo, gruesa y profundamente agrietada en placas verticales. La corteza de las ramas superiores es más fina y de color anaranjada (Mutke et al., 2012; Prada et al., 1997).

La copa tiene una elevada plasticidad fenotípica en respuesta a la luz. La guía principal pierde su dominancia apical temprano dando lugar a verticilos formados por numerosas ramas de grosor y longitud similar. En la fase juvenil la copa es esférica (Figura 2), transformándose en aparasolada con la madurez (Prada et al., 1997). Las ramas con mayor disponibilidad de luz tienen un mayor crecimiento apical y se ramifican más que las sombreadas, maximizando el número de brotes y piñas (Mutke et al., 2005c).

Los fascículos están formados por dos acículas punzantes (Figura 3a), ocasionalmente tres, de 10 a 20 cm de largo y 1 - 2 mm de grosor. Las acículas son de color verde claro con el borde finamente aserrado y la cara interna algo convexa. Estas se encuentran ancladas al ramillo por una vaina escamosa persistente o braquiblasto (Figura 3b). En los ejemplares jóvenes, las acículas verdeazuladas son más cortas y se insertan directamente sobre el tallo individualmente (López González, 2007; Mutke et al., 2012; Prada et al., 1997).

Las yemas no resinosas son gruesas y ovadas, agudas en el ápice y están rodeadas de escamas pardas con una franja blanca (Figura 3c). Pueden alcanzar una longitud de 6 - 12 mm (Prada et al., 1997).

Los estróbilos masculinos son amarillentos, pequeños y alargados (de hasta 15 mm de longitud), y se agrupan de forma compacta y helicoidal en la base de los brotes del tercio inferior de la copa. Los estróbilos femeninos son amarillo-verdosos, ovalados y de hasta 1 cm de longitud (Figura 4a). Pueden aparecer aislados o en grupos, de dos o más, en el ápice de brotes cortos de ramas vigorosas situadas en el tercio superior de la copa. Su periodo de maduración es de tres años (ver Epígrafe 1.1.4.). Las brácteas de las piñas se encuentran ensanchadas hacia el ápice y presentan en el centro un escudete gris, prominente y romboidal (Figura 4b). En cada bráctea se forman dos piñones cuya cubierta protectora está formada por una capa interna papirácea de color castaño y lustrosa que está en contacto con la semilla (tegmen) y por una capa externa dura (testa) en la que se inserta un ala rudimentaria muy pequeña. Cuando los piñones maduran, la

testa se cubre de una capa pulverulenta marrón-negrucza conocida como cisco en la meseta Norte. La semilla o piñón blanco es de color crema (Figura 5). Existe una variedad de piñón denominada *fragilis* debido a que la testa se puede romper fácilmente con los dedos (López González, 2007; Mutke et al., 2012; Prada et al., 1997).



**Figura 1. Masa de *Pinus pinea* L.** Pinar maduro de pino piñonero con copas aparasoladas. Monte “Corbejón y Quemados” nº 43 de UP, La Pedraja de Portillo (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L.



**Figura 2. Masa joven de *Pinus pinea* L.** Plantación joven de pino piñonero con copas esféricas. Monte “Común y Escobares” nº 17 de UP, Nava del Rey (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L.



Figura 3. (a) Acículas; (b) braquiblastos y fascículos las acículas; (c) yemas y piña de primer año de *Pinus pinea* L. Banco clonal "El Molinillo" Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.



Figura 4. (a) Estróbilos femeninos; (b) brácteas y escudetes de una piña de tercer año de *Pinus pinea* L. Banco clonal "El Molinillo" Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L.

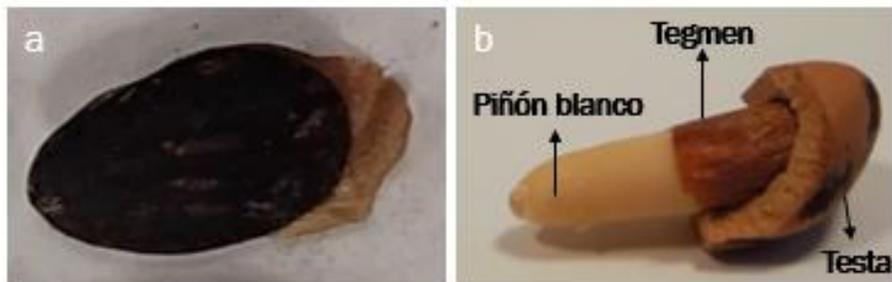


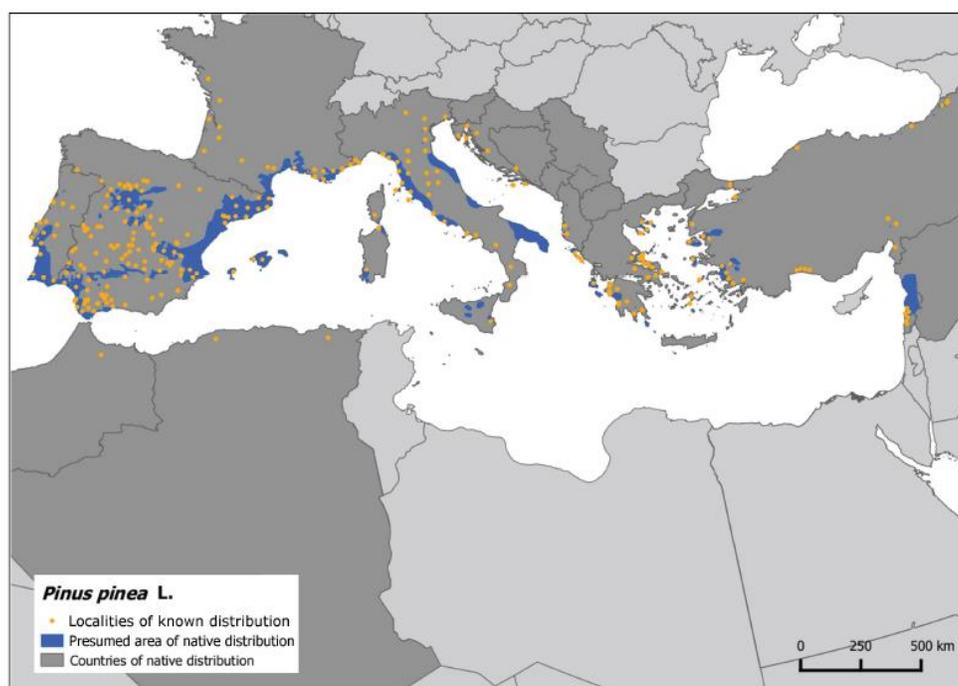
Figura 5. (a) Piñón con cáscara y ala; (b) partes del piñón de *Pinus pinea* L. Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 1.1.2. Distribución

Las masas de pino piñonero son nativas de la cuenca mediterránea dónde ocupan una extensión superior a las 700.000 ha (Tabla 2, Figura 6). Fuera de esta región se extiende de forma natural a lo largo de la costa atlántica portuguesa y las montañas del Líbano (Mutke et al., 2015b).

**Tabla 2. Distribución de *Pinus pinea* L. en la cuenca mediterránea.** Superficie ocupada por las masas de pino piñonero por país (MITECO, 2020; Mutke et al., 2015b).

País	Superficie (ha)
España	414.068
Portugal	175.000
Italia	46.000
Turquía	43.000
Túnez	21.000
Francia	13.500
Líbano	12.000
Marruecos	3.000
Israel	2.000
Grecia	1.500
<b>Total</b>	<b>713.068</b>



**Figura 6. Distribución de *Pinus pinea* L. en la cuenca mediterránea.** Naranja: localidades con distribución conocida. Azul: áreas de distribución nativa. Gris: países con distribución nativa (Wazen y Fady, 2015).

España es actualmente el país con mayor superficie de pino piñonero (414.068 ha de masas puras) (MITECO, 2020), siendo la mayor parte masas naturales (Mutke et al.,

2000) localizadas principalmente en Castilla y León (123.042,95 ha), Cataluña (22.669,81 ha), Comunidad de Madrid (11.896,71 ha), Extremadura (30.664,50 ha), Andalucía (272.407,71 ha) y Castilla La Mancha (58.475,87 ha) (Figura 7). Sin embargo, la superficie exacta ocupada por esta especie es difícil de determinar porque se encuentra frecuentemente mezclada con otras especies, como en Castilla y León (14.900,06 ha), Cataluña (19.483,46 ha), Extremadura (10.880,56 ha) o Canarias (771,78 ha) (MITECO, 2023b, 2023c; Prada et al., 1997).



**Figura 7. Distribución del *Pinus pinea* L. en España.** Verde: masas autóctonas. Azul: masas no autóctonas (SIG-FOREST, 2023).

En Castilla y León, las únicas provincias en las que no se encuentran masas de pino piñonero son León y Soria (Figura 8, Tabla 3) (MITECO, 2023b). En esta comunidad destacan las masas de la comarca de Tierra de Pinares (Valladolid, Segovia, Ávila) y de los Valles del Tiétar y Alberche. En la provincia de Valladolid se concentra la mitad de la superficie de pino piñonero de Castilla y León, representado el 45,63% respecto al resto de especies arbóreas de la provincia (Calama et al., 2007; MITECO, 2023b; Mutke et al., 2000; Prada et al., 1997).

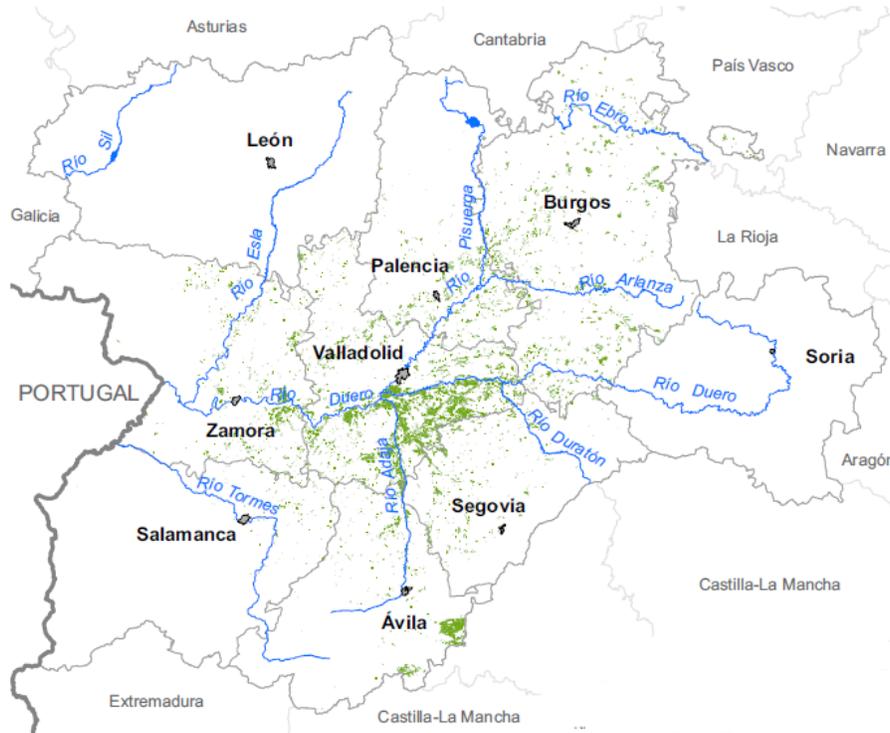


Figura 8. Distribución de *Pinus pinea* L. en Castilla y León. Verde: masas de pino piñonero (MITECO, 2023b).

Tabla 3. Distribución de *Pinus pinea* L. en Castilla y León. Superficie en hectáreas ocupada por las masas puras de pino piñonero en Castilla y León por provincia y porcentaje de superficie arbolada respecto al total para cada una de las provincias según el Cuarto Inventario Forestal Nacional (IFN4) (MITECO, 2023b).

Provincia	Superficie (ha)	% superficie arbolada
Valladolid	60.834,24	45,63
Ávila	14.214,18	5,07
Zamora	10.972,32	3,84
Segovia	8.080,82	3,14
Palencia	7.334,34	4,21
Burgos	7.223,52	1,41
Salamanca	1.98,27	0,22

Durante el último siglo las plantaciones de pino piñonero han aumentado tanto en su área de distribución nativa (Calama et al., 2008; Mutke et al., 2012) como fuera (Georgia, Crimea, Chile, Argentina, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Zimbabue) (Loewe-Muñoz et al., 2023; Mutke et al., 2012, 2014, 2015b; Prada et al., 1997). En España, el 4,0% (114 ha) de las forestaciones de tierras agrícolas realizadas en el año 2020 se ejecutaron solamente con esta especie (MITECO, 2020) debido a su rusticidad, facilidad de cultivo y alto valor comercial de los frutos (Bono y Aletà, 2013; Mutke et al., 2000; Prada et al., 1997).

### 1.1.3. Ecología

El pino piñonero es una especie termófila y xerófila capaz de desarrollarse desde el nivel del mar hasta los 1.500 m de altitud en las zonas montañosas del Líbano. En España se limita a los 1.000 m, por debajo de las nevadas que quiebran sus ramas. Esta especie, capaz de colonizar terrenos rasos y arenosos, se localiza en los pisos bioclimáticos termo y mesomediterráneo, aunque en su distribución oriental también abarca el supramediterráneo (Guadaño y Mutke, 2016; Mutke et al., 2012; Prada et al., 1997). Los principales factores climáticos y edafológicos del pino piñonero en su área nativa se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Ecología de *Pinus pinea* L.** Parámetros principales que definen la ecología del pino piñonero en su área de distribución nativa (Calama y Montero, 2007; Guadaño y Mutke, 2016; López González, 2007; Mutke et al., 2005b; 2012; Prada et al., 1997).

Parámetro	Rango
Precipitación media anual	350 - 1.000 mm (250 mm - 1.500 mm)
Precipitación estival	0 - 50 mm
Duración del periodo seco	0 - 5,6 meses
Temperatura media anual	10 - 19 °C
Oscilación térmica	11 - 22 °C
Temperatura media zonas cálidas	21 - 26 °C
Temperatura media zonas frías	3 - 11 °C
Temperatura máxima extrema	40 °C
Temperatura mínima extrema	-20 °C
Heladas	No soporta las heladas fuertes, continuadas, tardías o tempranas
Meses con heladas seguras	0 - 4 meses
Altitud	0 - 1.000 m
Estructura del suelo	Textura suelta (arena, marga arenosa o grava). % arena fina: 15 - 100; % arena: 12 - 98; % limo: 2 - 38; % arcilla: 1 - 28 No tolera suelos con contenido en arena < 40%, en limo > 40% y en arcilla > 30%
Tipo de suelos	Incipientes y pobres, incluso con yeso (arenosoles, regosoles y litosoles, o cambisoles maduros o luvisoles)
pH del suelo	Moderadamente ácido a básico (5,1 - 8,5). Preferencia por suelos neutros
Porcentaje caliza activa	0 - 42%
Capacidad de retención de agua	> 60 mm. No tolera terrenos encharcados
Luz	Muy exigente, abundante

### 1.1.4. Fenología

El pino piñonero es una gimnosperma monoica con crecimiento y ramificación monocíclica o por entrenudos sucesivos (Mutke, 2000; Mutke et al., 2001), de tal forma que la distancia entre dos verticilos de ramas es igual al crecimiento anual (Prada et al., 1997).

La producción de piñas con semillas desarrolladas comienza en torno a los 15 años (Tapias et al., 2001). Las piñas pasan por un periodo de maduración de cuatro años desde la formación de las yemas terminales, en los que se encuentran los primordios,

hasta la diseminación de las semillas (Abellanas y Pardos, 1989; Mutke et al., 2005b; 2012; Valdivieso et al., 2017), por lo que en un mismo pino se pueden llegar a solapar anualmente tres cohortes de piñas (Calama et al., 2012).

El desarrollo vegetativo del pino piñonero depende de la temperatura, por lo que es diferente en función de su situación geográfica (Mutke et al., 2001). En la meseta Norte, región de procedencia más continental y fría de *P. pinea*, el periodo vegetativo comienza a finales del invierno: durante el año 0, se forma la yema terminal que contiene los primordios a partir de los que se forman los estróbilos y las ramas laterales. A partir de esta yema se forma un brote entre los meses de abril y junio del año 1 (Figura 3c) que da lugar a un verticilo de ramas laterales, una nueva yema terminal y estróbilos femeninos (brotes gruesos o macroblastos: 2 - 16 mm, Figura 4a) o masculinos (brotes finos o mesoblastos: 2 - 5 mm). No en todos los brotes llegan a formarse estructuras reproductivas. El vigor de los brotes, dependiente de la luz, define la localización de los estróbilos femeninos (Figura 9a) en la parte alta de la copa, y los masculinos en la parte baja. Éstos últimos son pequeños, perecederos y se localizan en el ápice de los ramillos laterales flexibles. El viento hace oscilar a los ramillos y dispersa el polen. La polinización tiene lugar durante el mes de junio del año 1, pudiendo variar algunos días o semanas de un año a otro en función de la temperatura. Tras la polinización comienza el crecimiento de las acículas, que acaban por envolver a las piñas de primer año. En los ápices dominantes se puede llegar a formar un segundo ciclo reproductivo o brote de verano, con yemas laterales vegetativas y reproductivas, que no prospera por la falta de polinización (Figura 9b). Sin embargo, puede llegar a formar un brote reproductivo durante la siguiente primavera. Durante año 2 de desarrollo, los estróbilos femeninos se vuelven globulares y alcanzan una longitud media de 20 a 40 mm (Figura 9c). Mientras que durante el año 3 se produce el crecimiento principal de las piñas, entre los meses de abril y julio, alcanzando una longitud final de 8 a 15 cm y un peso fresco final de 200 a 500 g (Figura 9d). La fecundación y embriogénesis de las semillas tiene lugar durante la primera quincena de junio del tercer año de desarrollo de las piñas y la testa se comienza a lignificar durante la segunda quincena de julio, aunque la maduración de los piñones no finaliza hasta el otoño. En Castilla y León, las piñas de tercer año se pueden cosechar a partir de noviembre (ORDEN FYM/905/2014), cuando alcanzan la

madurez comercial. Si las piñas no se cosechan, la dehiscencia y dispersión de las semillas (diszoocoria) se produce durante la primavera o principios de verano del año 4, pudiéndose alargar hasta el otoño (Abellanas y Pardos, 1989; Calama et al., 2012; Mutke, 2000; Mutke et al., 2001, 2003, 2005b, 2012; Valdivieso et al., 2017).



**Figura 9.** (a) Estróbilos femeninos; (b) segunda floración junto con piñas de primer año; (c) piña de segundo año; (d) piña de tercer año. Banco clonal “El Molinillo” Tordesillas (Valladolid). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

#### 1.1.5. Aprovechamientos forestales

Las masas de pino piñonero tienen carácter productor, protector y social, y sus principales productos forestales son la madera y el piñón blanco. Esta especie se caracteriza por su potencial uso en sistemas agronómicos y silvopastorales (Afonso et al., 2020; Calama et al., 2008; Prada et al., 1997).

En España, el volumen de madera cortada de pino piñonero representó solamente el 2,0% (227.576 m<sup>3</sup> CC) del volumen total cortado en el año 2020. Por otro lado, los precios de la madera en pie (15,4 €/m<sup>3</sup> CC) y en cargadero (38,0 €/m<sup>3</sup> CC) son bastante menores en comparación con las principales especies maderables, *Pinus radiata* D. Don y *Pinus sylvestris* L., que llegan a alcanzar valores en cargadero de 45,1 y 50,3 €/m<sup>3</sup> CC, respectivamente (MITECO, 2020). Los propietarios de las masas de pino piñonero obtienen más ingresos con la producción de piñón blanco que con la explotación madera, por lo que el piñón blanco es el principal producto de las masas de pino piñonero (Mutke et al., 2013).

El piñón blanco es un fruto seco silvestre considerado uno de los productos forestales no maderables más relevantes de la cuenca mediterránea (Calama et al., 2012, 2016a, 2020; Mutke et al., 2013; Pasalodos-Tato et al., 2016), dónde es consumido desde el Mesolítico y comercializado desde el Neolítico (Carmona García, 2013; Mutke et al.,

2012; Prada et al., 1997). Actualmente, se considera un alimento gourmet por su sabor y por su valor dietético. Su concentración de proteínas (35,0%) es superior a la de otras especies de piñones comestibles, y contiene ácidos grasos (50,0%) entre los que destacan el ácido oleico (serie omega 9-) y linoleico (serie omega 6-), por prevenir cardiopatías; carbohidratos (5 - 6%); vitaminas (B1: 0,5 mg/100 mg materia seca (MS); B2: 0,2 mg/100 mg MS) y minerales como el potasio (K), magnesio (Mg), azufre (S), calcio (Ca), manganeso (Mn), zinc (Zn), hierro (Fe), boro (B), cobre (Cu) y sodio (Na) (Evaristo et al., 2010; Mutke, 2022; Mutke et al., 2012; 2013).

Aunque, como ya se ha mencionado, el piñón blanco genera más beneficios económicos que la madera, el rendimiento del aprovechamiento de las piñas para la producción de piñón blanco es bajo. Para producir un solo kilo de piñón blanco se necesitan entre 20 y 30 kg de piñas (Mutke et al., 2017). En las masas semiáridas mediterráneas, la producción media anual de piñas oscila de 100 a 1.000 kg/ha, de la que se obtiene solamente entre 4 y 40 kg de piñón blanco (Mutke et al., 2013), influyendo el bajo rendimiento del producto inicial en el elevado precio del producto final. Por otro lado, la disponibilidad de piñas, debido al carácter vecero del pino piñonero, hace que los precios varíen anualmente (2006 - 2014: 15 - 40 €/kg) (Calama et al., 2011, 2012, 2016a; Guadaño y Mutke, 2016; Mutke et al., 2005b, 2012, 2015b).

La fructificación del pino piñonero depende tanto de las condiciones climáticas en determinados momentos del desarrollo de las piñas como de la disponibilidad de recursos para la producción de yemas o flores femeninas tras años veceros (Calama et al., 2012, 2016a; Mutke et al., 2003, 2005b, 2012). La producción de piñas y piñones es favorecida por las siguientes situaciones climáticas: (I) alta disponibilidad de agua durante el otoño y la primavera del año 0, cuando se produce la inducción y diferenciación de las yemas florales; (II) disponibilidad de agua durante la polinización de las piñas y temperaturas suaves durante ese verano (año 1); (III) disponibilidad de agua durante todo el periodo de crecimiento y engorde de las piñas durante su segundo y tercer año de desarrollo (Calama et al., 2007, 2011, 2012; Mutke et al., 2003, 2005b). Por otro lado, los eventos climáticos que pueden causar daños a las piñas en la meseta Norte son: (I) primaveras calurosas que adelantan la formación de estróbilos femeninos y aumentan la probabilidad de sufrir daños por heladas tardías durante su primer y

segundo año de desarrollo; (II) falta de lignificación de los estróbilos femeninos o deshidratación tras la polinización por altas temperaturas durante el mes de junio del año 1; (III) aborto de las piñas de primer y segundo año por inviernos severos, veranos muy secos y granizo; (IV) los eventos climáticos extraordinarios durante el tercer año de desarrollo de las piñas pueden afectar a su desarrollo, dando lugar a piñas pequeñas y con baja productividad (Calama et al., 2007, 2012, 2020; Calama y Montero, 2007; Mutke et al., 2003, 2005a).

El tipo de suelo también influye en la producción, siendo mayor en las masas establecidas sobre suelos con nivel freático elevado o con alta capacidad de retención de agua que en suelos excesivamente drenados (arenas - gravas) (Calama et al., 2008, 2012), arenosos y profundos, rocosos y poco profundos (Mutke et al., 2012), erosionados, formados por margas calcáreas con capas de yeso, o poco profundos sobre aguas subterráneas salinas (Mutke et al., 2005b).

La forma de aprovechamiento de las piñas, en masas naturales o naturalizadas, y su proceso de transformación influye en el elevado precio del piñón blanco (Mutke et al., 2000, 2012, 2013). Como se ha mencionado previamente, las piñas se cosechan, tras tres años de maduración, durante la “Campaña de aprovechamiento” (ORDEN FYM/905/2014) y se transportan a la industria procesadora donde se abren inmediatamente por ebullición o se almacenan y secan al sol hasta su apertura en mayo - junio del año siguiente. Las piñas abiertas se muelen y los piñones con cáscara se separan de las partes leñosas con tamices y ciclones. Los piñones se abren o desgranar mecánicamente para la extracción de la semilla o piñón blanco, aunque pueden almacenarse con cáscara durante años. El 95,0% del material procesado son desechos que se comercializan como biomasa en los mercados locales (Calama et al., 2020; Mutke et al., 2012).

La producción anual de piñón blanco y, probablemente su precio, podría estabilizarse utilizando un modelo de aprovechamiento agronómico y/o silvopastoral, aprovechando las piñas de plantaciones formados por pinos injertados con clones seleccionados (Afonso et al., 2020; Bono y Aletà, 2003; Guadaño y Mutke, 2016; Mutke et al., 2000, 2007; Prada et al., 1997) localizadas en lugares con características ambientales beneficiosas para la producción de piña (Tabla 5). Además, esta producción se podría

optimizar incorporando prácticas selvícolas (apertura de copas, claras tempranas, podas, raleos y alargamiento del turno), culturales (fertirrigación, eliminación de la competencia herbácea) y programas de manejo integrado de plagas forestales (MIP) (Afonso et al., 2020; Bono y Aletà, 2003; Calama et al., 2008, 2017; Guadaño y Mutke, 2016; Loewe-Muñoz y González, 2012; Loewe-Muñoz et al., 2020; Mutke et al., 2005a).

**Tabla 5. Umbrales de plantación recomendados para las masas productoras de piñón blanco.** Principales parámetros de plantación del pino piñonero enfocados a la producción de piñón blanco (Guadaño y Mutke, 2016).

Parámetro	Umbrales recomendados
Altitud	< 1.000 m
Precipitación media anual	> 400 - 500 mm
Precipitación media estival	No limitante
Duración del periodo seco	< 4 meses
Temperatura media anual	> 10 °C
Oscilación térmica	No limitante
Meses con heladas seguras	< 4 meses
Nevadas fuertes	Excluyente
% tierra fina	> 40
% arena	> 40
% limo	< 35
% arcilla	< 25
pH	6 - 8,5
% caliza activa	< 15

### 1.1.6. Producción de piñón

Los piñones comestibles proceden de aproximadamente 30 especies de pinos, aunque no todos tienen las mismas cualidades organolépticas, nutricionales ni la misma importancia comercial (Tabla 6) (Awan y Petenella, 2017; Evaristo, 2016; Evaristo et al, 2010; INC, 2019; Mutke et al., 2012; Wolff y Bayard, 1995).

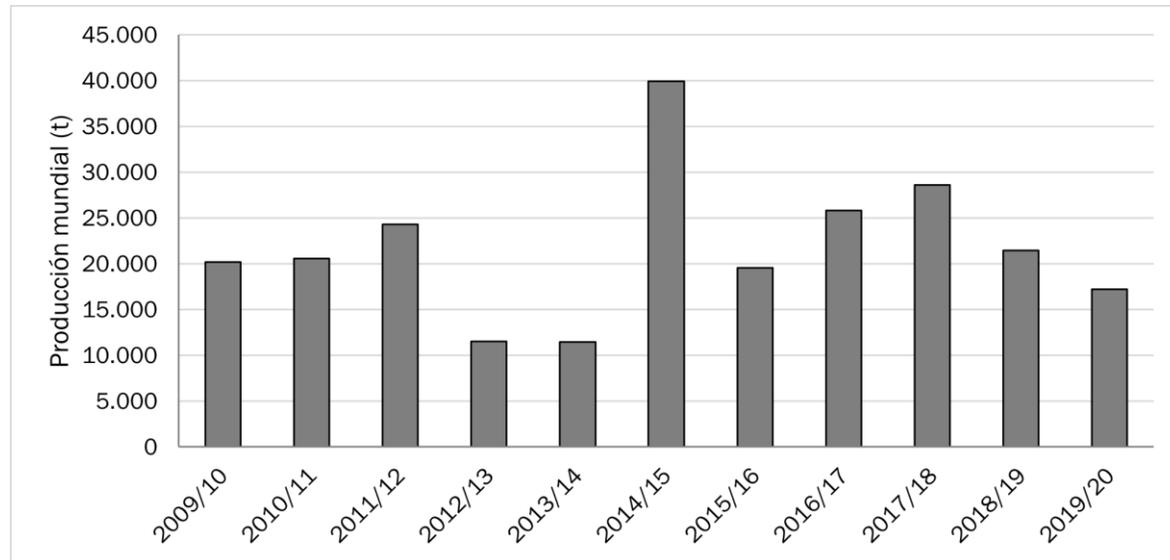
**Tabla 6. Especies de pinos productoras de piñones comestibles.** Área de distribución, importancia económica y uso de las principales especies de piñones comestibles a nivel mundial (Awan y Petenella, 2017; INC, 2019).

Especie	Área de distribución	Importancia económica	Uso	
<i>Pinus edulis</i> Engelm	Norteamérica	Alta	Alimento	
<i>Pinus monophylla</i> Torr. & Frém.				
<i>Pinus cembroides</i> Zucc.		Importancia local		
<i>Pinus quadrifolia</i> Parl. ex Sudw.				
<i>Pinus nelsonii</i> Shaw				
<i>Pinus pinceana</i> Gord.				
<i>Pinus albicaulis</i> Engelm				
<i>Pinus ayacahuite</i> Engelm. ex Schltfl.				
<i>Pinus flexilis</i> E. James				Importancia histórica como alimento de tribus indígenas
<i>Pinus monticola</i> Douglas ex D. Don				
<i>Pinus torreyana</i> Parry ex Carr.	Norteamérica	Importancia histórica como alimento de tribus indígenas		
<i>Pinus ponderosa</i> Douglas ex C. Lawson				
<i>Pinus sabiniana</i> Douglas ex D. Don				
<i>Pinus strobiformis</i> Engelm				
<i>Pinus coulteri</i> D. Don				
<i>Pinus lambertiana</i> Douglas				

**Tabla 6 (Cont.). Especies de pinos productoras de piñones comestibles.** Área de distribución, importancia económica y uso de las principales especies de piñones comestibles a nivel mundial (Awan y Petenella, 2017; INC, 2019).

Especie	Área de distribución	Importancia económica	Uso
<i>Pinus koraiensis</i> Siebold & Zucc	Este de China, Japón, Corea y Rusia	Muy alta a nivel internacional Especie cultivada	Alimento, aceite
<i>Pinus sibirica</i> Du Tour	Rusia, norte de Kazajistán y norte de Mongolia	Muy alta Especie cultivada	
<i>Pinus pinea</i> L.	Cuenca mediterránea y Oriente Próximo	Muy alta a nivel internacional Especie cultivada	Alimento
<i>Pinus gerardiana</i> Wall. ex D. Don	Este de Afganistán, Pakistán y norte de la India	Alta a nivel internacional	
<i>Pinus pumila</i> (Pall.) Regel	Este de Siberia, este de China, Corea, norte de Japón y norte de Mongolia	Media. Importancia local	
<i>Pinus wallichiana</i> A.B.Jacks.	Himalaya, Afganistán y Pakistán	Media	
<i>Pinus griffithii</i> McClelland	Nepal y Bután	Alta a nivel local	
<i>Pinus bungeana</i> Zucc. ex Endl.	Noroeste de China	Media. Importancia local	
<i>Pinus tabulaeformis</i> Carr.	Norte de China	Importancia internacional	
<i>Pinus cembra</i> L.	Alpes y Cárpatos	Baja, a nivel local	
<i>Pinus roxburghii</i> Sarg.	India y Pakistán	Alta a nivel local	
<i>Pinus yunnanensis</i> Franch.	Sur de China y Tibet	Alta a nivel local	

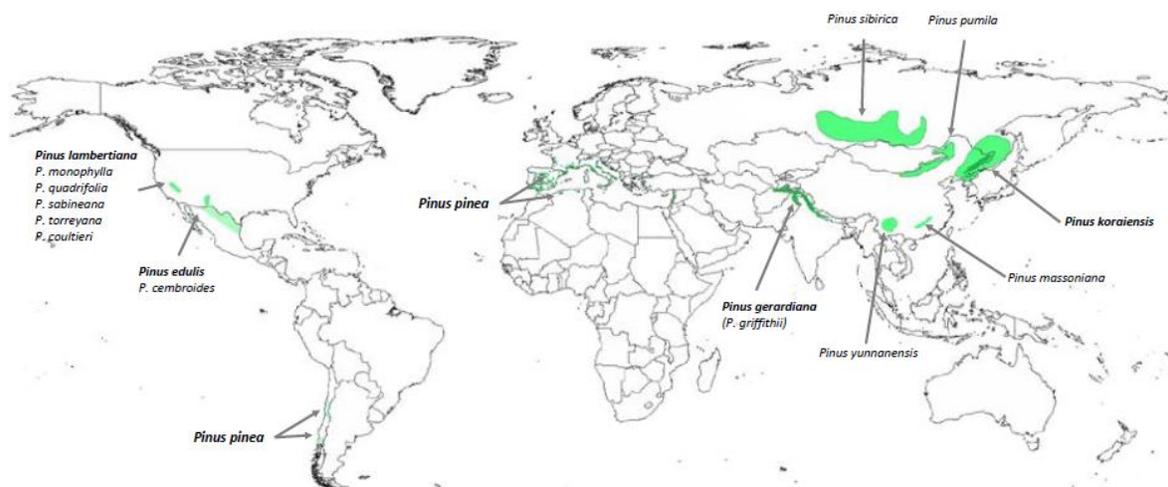
La producción estimada de piñones a nivel mundial varía anualmente, como se ha mencionado previamente, por el carácter vecero de los pinos (Figura 10). Durante la cosecha 2019 - 2020, se estimó una producción de 17.220 t. El 71,0% fue producida en Asia, principalmente en China (34,0%), Rusia (20,0%) y Corea del Norte (17,0%).



**Figura 10. Producción de piñón estimada a nivel mundial por año.** Toneladas (INC, 2020).

La producción en la cuenca mediterránea supuso el 11,0% del total, siendo los principales países productores Turquía (5,0%), Italia (4,0%), Portugal y España (2,0%) (Figura 11) (INC, 2019, 2020). Durante el año anterior (2018) se exportaron un total de

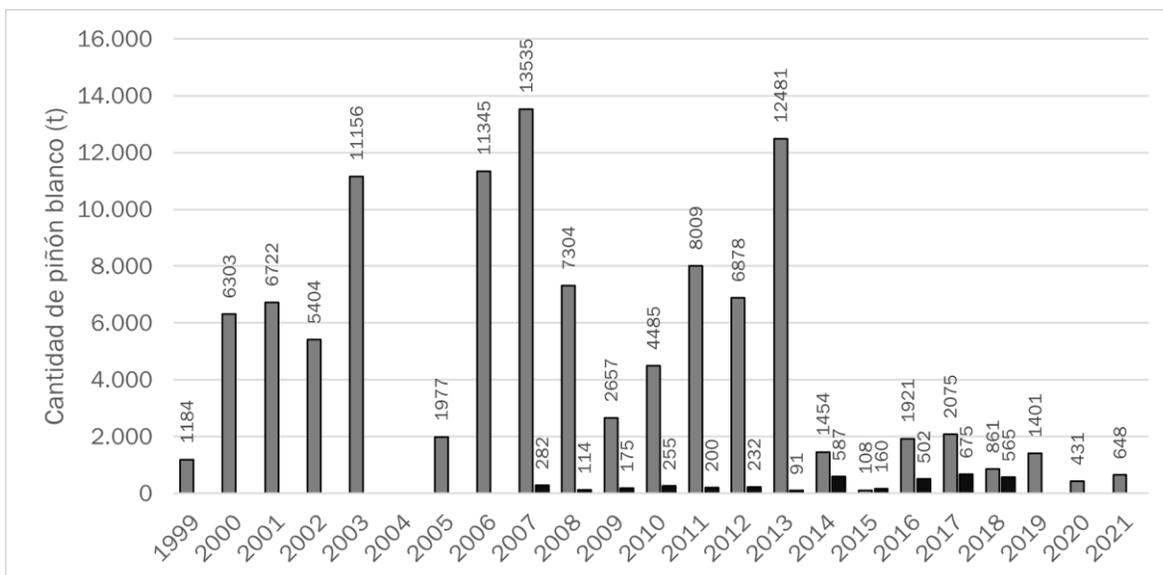
19.747 t, principalmente desde China a la Unión Europea, Reino Unido (58,0%) y Estados Unidos (27,0%). Los principales importadores fueron China (66,0%), Alemania (17,0%, industria procesadora), Países Bajos (3,0%), Turquía (3,0%), Italia (3,0%), España (3,0%), Pakistán (2,0%) y Rusia (1,0%) (INC, 2020).



**Figura 11. Principales países productores de piñones a nivel mundial.** Piñones comestibles por especie y país (INC, 2019).

El piñón blanco mediterráneo es uno de los más apreciados a nivel internacional (Guadaño y Mutke, 2016). Como indica su nombre, es nativo de la cuenca mediterránea, siendo los principales productores España, Portugal, Turquía e Italia (INC, 2019; Mutke 2022; Mutke et al., 2012, 2013), aunque se han establecido plantaciones productoras en otros lugares del mundo (ver Epígrafe 1.1.2). Solamente en la Península Ibérica se produce el 70,0% de la producción mundial (Mutke et al., 2005a). En España, la producción de piñón blanco es muy variable, como ya se ha mencionado, por el carácter vecero de la especie. Sin embargo, la producción estimada de piñón blanco se mantiene por debajo de las 2000 t/año desde el año 2013, registrándose la menor producción en el año 2020 (431 t) (Figura 12).

En el año 2021, las principales comunidades autónomas productoras de piñón con cáscara fueron Castilla y León (499,8 t), Extremadura (82,0 t), Andalucía (49,7 t) y Cataluña (16,0 t) (MITECO, 2021). En la meseta Norte, la producción media fue de 193 kg/ha (rango de 18 a 909 kg/ha) entre los años 1960 y 2010 (Calama et al., 2012).



**Figura 12. Producción e importaciones estimadas de piñón blanco en España.** Datos anuales de producción (gris) e importaciones (negro) de piñón blanco en toneladas. \*Producción en 2004, importaciones disponibles para la serie de datos 1999 - 2006 y 2019 - 2021 (INC, 2020; MITECO, 2020).

La industria del piñón se encuentra localmente concentrada (Mutke et al., 2013). Solamente en Castilla y León hay 370 operadores de piñas y piñones (Junta de Castilla y León, 2023), encontrándose el 54,9% en la provincia de Valladolid (Tabla 7). En esta provincia, el valor de las piñas en pie de los montes públicos (un tercio de la meseta Norte) se estima en más de 400.000 €, con una facturación para las empresas del sector de 12.000.000 €/año (Mutke et al., 2000).

**Tabla 7. Operadores de piñas y piñones en Castilla y León.** Datos por provincia (Junta de Castilla y León, 2023).

Provincia	Número de operadores
Valladolid	203
Zamora	106
Segovia	30
Ávila	28
Palencia	2
León	1

### 1.1.7. Plagas de las piñas

Las plagas nativas, tradicionalmente asociadas con la reducción de la cosecha del piñón blanco en las masas de pino piñonero de la cuenca mediterránea, son *Dioryctria mendacella* Stgr. (Lepidoptera: Pyralidae) y *Pissodes validirostris* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) (Bracalini et al., 2013; Calama et al., 2017; Mutke et al., 2012).

Las hembras de *D. mendacella* realizan la puesta sobre las piñas, en las que se introducen las larvas para alimentarse de sus tejidos (Figura 13) pudiendo llegar a abortar o no la piña (Prada et al., 1997). Esta plaga puede llegar a dañar una media del 17,1% (rango de 7,1% a 32,4%) de la producción anual de piñas (Calama et al., 2017).



**Figura 13.** Piñas de *Pinus pinea* L. dañadas por *Dioryctria mendacella* Stgr. (a) piña de primer año; (b) piña de segundo año; (c) piña de tercer y larva de *D. mendacella*. Autoría: Ponce-Herrero, L., Sacristán-Velasco, A. y Ponce Díaz, A.

Las larvas de *P. validirostris* dañan toda la piña haciendo que detenga su crecimiento y aborte (Figura 14a). Las ardillas y aves se alimentan de las piñas maduras reduciendo la cantidad de piñones (Figura 14b) (Prada et al., 1997).

Otras plagas destacables de *P. pinea* que pueden afectar al crecimiento del árbol, pero no a la producción de piñón blanco, son la procesionaria del pino (Figura 14c), *Thaumetopoea pityocampa* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera: Thaumetopoeidae), cuyas larvas se alimentan de las acículas causando defoliación; y las plagas destructoras de yemas y brotes en desarrollo: *Rhyacionia buoliana* Denis & Schiffmüller y *Rhyacionia duplana* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae) (Mutke et al., 2012; Prada et al., 1997).



**Figura 14.** Piñas de *Pinus pinea* L. dañadas. (a) Orificios de salida de imagos de *P. validirostris*; (b) daños de ardilla; (c) puesta de *T. pityocampa*. Autoría: Ponce-Herrero, L., y Ponce Díaz, A.

## 1.2. La chinche de las piñas: *Leptoglossus occidentalis* Heidemann

### 1.2.1. Taxonomía y morfología

El género *Leptoglossus* pertenece a la familia Coreidae y a la tribu Anisoscelini, caracterizada por la expansión en forma de hoja de las tibias posteriores (Panizzi y Grazia, 2015).

*Leptoglossus occidentalis* fue descrito por primera vez por Heidemann en 1910, considerándose inicialmente la misma especie que *Leptoglossus corculus* (Say) (Hemiptera: Coreidae), de la que se diferencia por la longitud de las dilataciones tibiales (Allen, 1969).

Las principales características morfológicas de los imagos de *L. occidentalis* se describen en la Tabla 8. Se trata de una especie con dimorfismo sexual, siendo las hembras más grandes y pesadas que los machos (Figura 15; Lee et al., 2023).

**Tabla 8. Características morfológicas de los imagos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (Allen, 1969; Heidemann, 1910; Koerber, 1963; Lee et al., 2023).

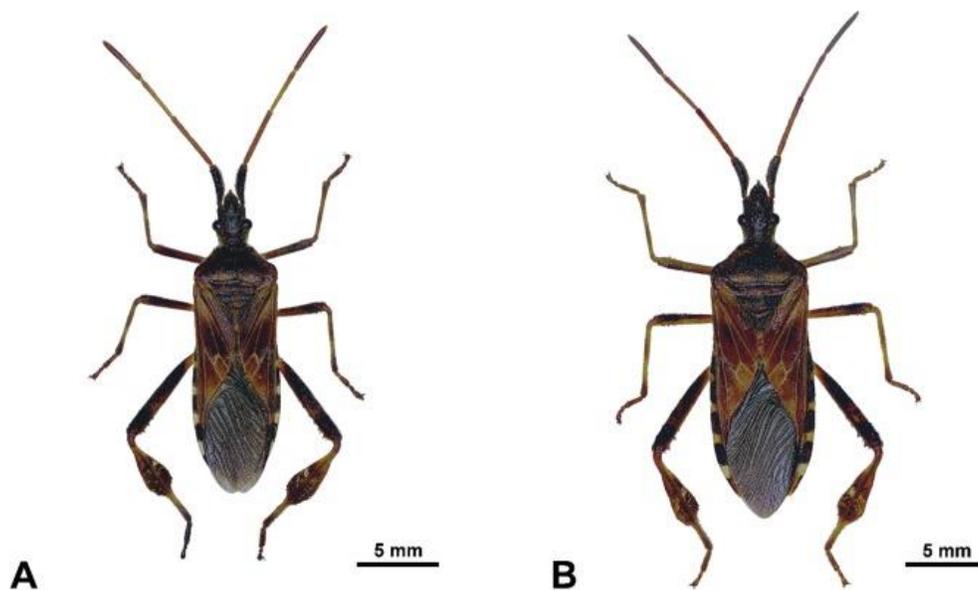
Característica morfológica	Descripción
Longitud del cuerpo	16 - 18 mm
Anchura del tórax	4 - 6 mm
Cutícula	Pubescente. Varía de marrón-rojizo a marrón-grisáceo oscuro
Cuerpo	Oblongo, marrón-rojizo y pubescente. Parte inferior marrón-rojizo pálido con manchas negras
Cabeza	Casi tan larga como el tórax con dos rayas longitudinales negras. Dos ocelos entre los ojos compuestos
Rostro	Alargado y formado por cuatro segmentos. Proboscide extendida hasta el tercer o cuarto segmento abdominal
Antenas	Formadas por cuatro antenómeros en forma de varilla siendo el terminal más oscuro y robusto. Color marrón pálido
Pronoto	Trapezoidal, con ángulos humerales anchamente redondeados. Manchas de color píceo y márgenes enteros.
Escutelo	Triangular, negruzco en la base con la punta pálida y una depresión transversal en el centro
Tórax	Menos deprimido hacia delante, profundamente punteado y arrugado irregularmente
Hemélitros	Fascia blanca en forma de zig-zag formada por los nervios. A veces es indistinta. Superficie marrón oscuro antes y después de la línea. Membrana de color bronce oscuro
Conexivum	A veces estrechamente bordeado de negro. Base de las incisuras amarillenta
Abdomen	Dorsal amarillo o naranja claro con cinco parches negros transversales. Visible durante el vuelo
Patas	Pilosas y de color marrón-rojizo. Tibias y fémures bien desarrollados con tres segmentos. Patas traseras más gruesas y largas con el fémur armado con unas pocas espinas dobles y pequeñas en el lado interno y con dos espinas dobles en el externo. Espinas negras en la punta. Expansión membranosa de las tibias posteriores con forma de espátula ocupando menos del 70,0% de la longitud de la tibia. Dilataciones externas e internas de longitud similar
Genitalia	Cápsula genital redonda en los machos y triangular con una incisión en las hembras

Las puestas están formadas por huevos depositados en fila con el lado ventral firmemente pegado a una acícula u otra superficie (Koerber, 1963). El tiempo de desarrollo de los huevos depende de la temperatura, siendo de 8,6 días en condiciones de laboratorio de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  a 16:8 (L:O) (Lee et al., 2023). La morfología de los huevos

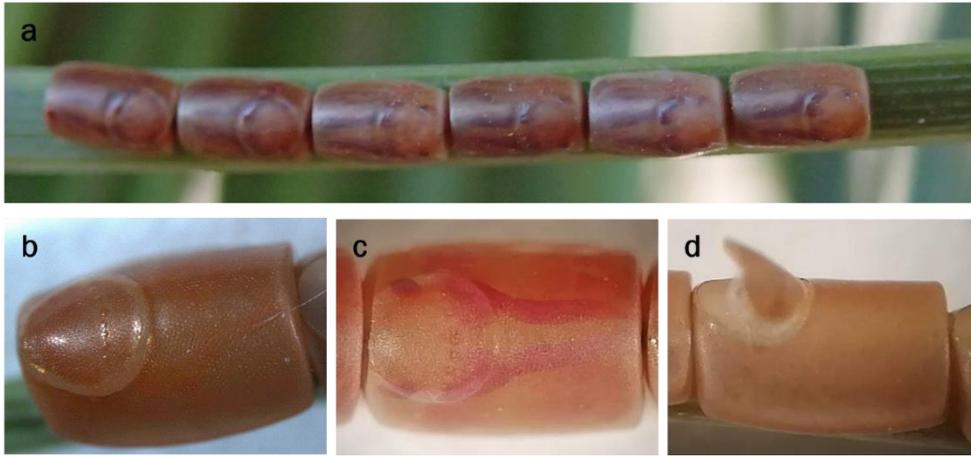
(Figura 16) y de los cinco estadios inmaduros de *L. occidentalis* (Figura 17) se describe en la Tabla 9.

**Tabla 9. Características morfológicas de los estadios inmaduros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. (Koeber, 1963; Lee et al., 2023).**

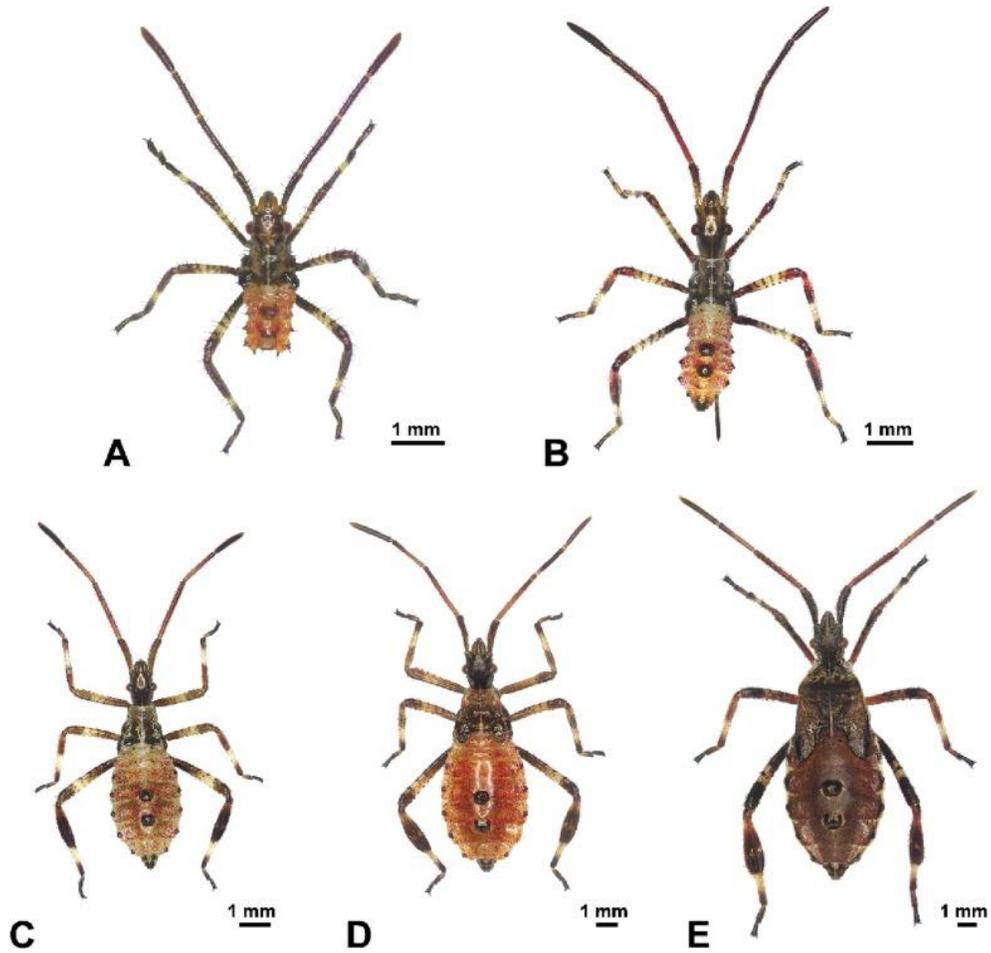
Estadio inmaduro	Descripción
Huevos	Semicilíndricos con la cara interior y posterior más bien planas. Pseudopérculo circular prominente menor a 1 mm de diámetro con varios microporos. Corion con patrón hexagonal y de color marrón claro que se torna marrón-rojizo con el desarrollo de la ninfa, que llega a ser visible a través de él. Tamaño medio: 2,1 x 1,2 x 1 mm
Primer estadio (N1)	Cabeza y tórax marrones. Abdomen naranja con manchas rojizas que rodean las dos glándulas abdominales dorsales y los últimos tres segmentos. Las antenas son más largas que el cuerpo, mientras que la probóscide es más corta que este. Antenas marrones. Patas marrones excepto una banda amarilla alrededor del fémur. Cabeza, tórax y apéndices cubiertos por cerdas negras. Longitud media: 3,1 mm
Segundo estadio (N2)	Cuerpo considerablemente alargado con el dorso abdominal de color naranja-amarillento, manchas rojizas y glándulas profundas. Antenas, patas y probóscide más largas que el cuerpo, el rostro sobresale sobre el ápice abdominal. Patas similares al primer estadio, pero con banda amarilla en la tibia. Inicio de la dilatación de las tibias traseras. Longitud media: 4,8 mm
Tercer estadio (N3)	Cuerpo piriforme de color naranja amarillento a marrón-rojizo oscuro. Abdomen ancho con terguitos relativamente romos. Rostro no sobresaliente sobre el ápice abdominal. Diferenciación del pronoto, el escutelo y las yemas alares. La banda amarilla de la tibia es más prominente. Dilatación de las tibias posteriores más prominente. Longitud media: 8,8 mm
Cuarto estadio (N4)	Cuerpo piriforme con cabeza y tórax marrón-rojizo y abdomen naranja-rojizo. Desarrollo de las yemas alares superpuestas sobre el primer segmento abdominal. Margen del protórax crestado longitudinalmente. Tibia posterior aplanada y expandida, con una raya amarilla. Longitud media: 13,6 mm
Quinto estadio (N5)	Cuerpo piriforme y pubescente. Manchas marrones en el tórax y yemas alares, que se extienden hasta el segundo o tercer segmento abdominal. Engrosamiento de las extremidades de color negro-rojizo. Desarrollo de la dilatación tibial con puntos brillantes como en los adultos. Cresta con seis espinas prominentes en el borde posterior del fémur posterior. Longitud media: 15,5 mm



**Figura 15. Morfología de los imagos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. (A) macho; (B) hembra. Modificación de Lee et al. (2023).**



**Figura 16. Puesta y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Puesta sobre acícula de *P. pinea* con ninfas en avanzado estado de desarrollo; (b) huevo recién ovipositado; (c) huevo con ninfa en avanzado estado de desarrollo; (d) huevo eclosionado. Autoría: Ponce-Herrero, L.



**Figura 17. Morfología de los estadios inmaduros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (A) primer estadio (N1); (B) segundo estadio (N2); (C) tercer estadio (N3); (D) cuarto estadio (N4); (E): quinto estadio (N5) (Lee et al., 2023).

### 1.2.2. Biología y fenología

*Leptoglossus occidentalis* es un insecto hemimetábolo que pasa por cinco estadios ninfales (Figura 17) antes de transformarse en adulto (Figura 15). Es una especie gregaria cuyos individuos se congregan en ramas y piñas, principalmente de coníferas, expuestas al sol (Koerber, 1963). Si se ven amenazados, tanto ninfas como adultos, emiten una feromona de alarma para alertar a sus congéneres (Blatt, 1997; Blatt et al., 1998).

A finales del verano y principios de otoño, cuando se alcanza el umbral térmico de 12 °C, los adultos y ninfas del último estadio se agrupan en lugares protegidos (cortezas de pino, árboles secos, nidos de aves y roedores o estructuras humanas), posiblemente inducidos por la emisión de una feromona de agregación por los machos, para pasar por un estado de oligopausa (Barta, 2016; Bates, 2005; Blatt, 1994, 1997; Blatt y Borden, 1996b; Gall, 1992; Koerber, 1963; Naya y Aguado, 2012). En condiciones naturales, la tasa de supervivencia de adultos y ninfas tras la oligopausa es de 48,3 - 55,0% y 6,0 - 8,3%, respectivamente (Barta, 2016).

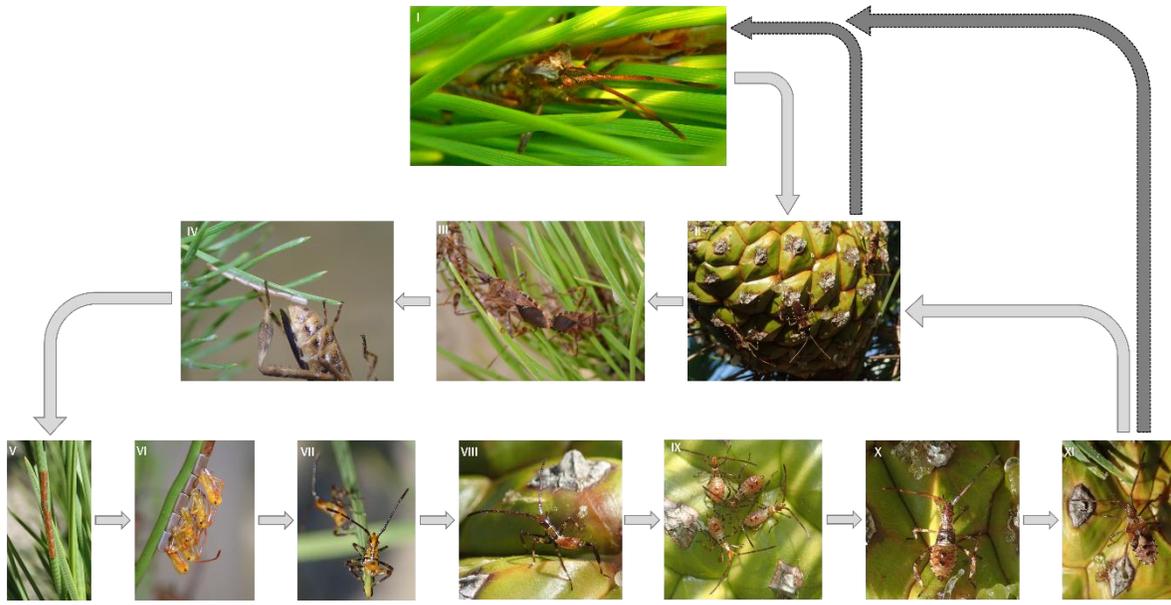
La oligopausa finaliza en primavera al alcanzar el umbral térmico de 14 °C (Naya y Aguado, 2012). En esta época las hembras fecundadas, antes de la oligopausa, realizan la puesta (Barta, 2016; Blatt, 1997) y los adultos comienzan a aparearse, posiblemente por la mediación de una feromona sexual no volátil emitida por las hembras (Blatt, 1997).

La fecundidad de una hembra, en su área nativa y en condiciones naturales, es de unos 80 huevos (Bates y Borden, 2005). En Europa central, donde es una especie exótica, la fecundidad de una hembra varía de 31 a 78 huevos en condiciones seminaturales de embolsamiento junto con ramas de coníferas (Barta, 2016). En condiciones de laboratorio (25 ± 1°C; 16:8 (L:O)), la fecundidad media y máxima de las hembras es de 68,6 y 85,5 huevos, respectivamente, pudiendo llegar a los 148 huevos (22 ± 1°C) (Lee et al., 2023; Maltese et al., 2009). Sin embargo, la fecundidad de las hembras no es igual a la progenie o individuos que componen la nueva generación por la infertilidad, aborto, depredación o parasitismo de los huevos. Por otro lado, no todas las ninfas alcanzan la madurez (9,0%) debido a la presión ejercida por la depredación y otros

factores ambientales (Bates y Borden, 2005). Incluso en condiciones de laboratorio la mortalidad desde huevo a estado adulto varía entre el 47,5% y el 75,2%, concentrándose principalmente en el segundo estadio (Barta, 2016; Lee et al., 2023; Mas et al., 2013; Ponce-Herrero et al., 2017).

El periodo medio de pre-oviposición de las hembras es de 23,4 días, mientras que la esperanza media de vida de hembras y machos es de 63,9 y 58,0 días, respectivamente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16:8 (L:0)) (Lee et al., 2023).

El ciclo de vida de *L. occidentalis* (Figura 18) es considerablemente plástico y depende de las condiciones climáticas locales (Barta, 2016; Bernardinelli et al., 2006; Maltese et al., 2009; Mas et al., 2013; Tamburini et al., 2012). El tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros y la maduración sexual de los adultos disminuye con el aumento de la temperatura ( $20^\circ\text{C}$ : 77,8 días;  $25^\circ\text{C}$ : 40,5 días y  $30^\circ\text{C}$ : 28,4 días) (Barta, 2016). Por otro lado, la alimentación influye en la duración de los estadios ninfales (Lee et al., 2023; Ponce-Herrero et al., 2017). En su área nativa, *L. occidentalis* puede desarrollar de una a tres generaciones anuales, mientras que en el norte de California se considera una especie univoltina. La época de reproducción comienza a mediados de mayo y se extiende hasta principios de julio (Koerber, 1963), cuando aparece la primera generación de adultos (Blatt, 1997). En el sur de la Columbia Británica puede llegar a desarrollar una segunda generación parcial (Bates et al., 2002b), y en México hasta tres, detectándose la actividad de todos los estadios de desarrollo durante el invierno (Cibrián-Tovar et al., 1986). Fuera de América se han definido de una a tres generaciones anuales: una generación en el sur de Eslovaquia; de una a tres en Italia (Barta, 2016; Bernardinelli et al., 2006; Maltese et al., 2009; Tamburini et al., 2012); dos en el centro de España (Sánchez et al., 2013) y de dos a tres en el suroeste. En esta última localización la oligopausa finaliza en febrero, los primeros eventos de reproducción comienzan a mediados de marzo y la primera y tercera generación de adultos aparece en julio y finales de octubre, respectivamente, solapándose esta última con el inicio de la oligopausa en septiembre (Mas et al., 2013; Naya y Aguado, 2012).



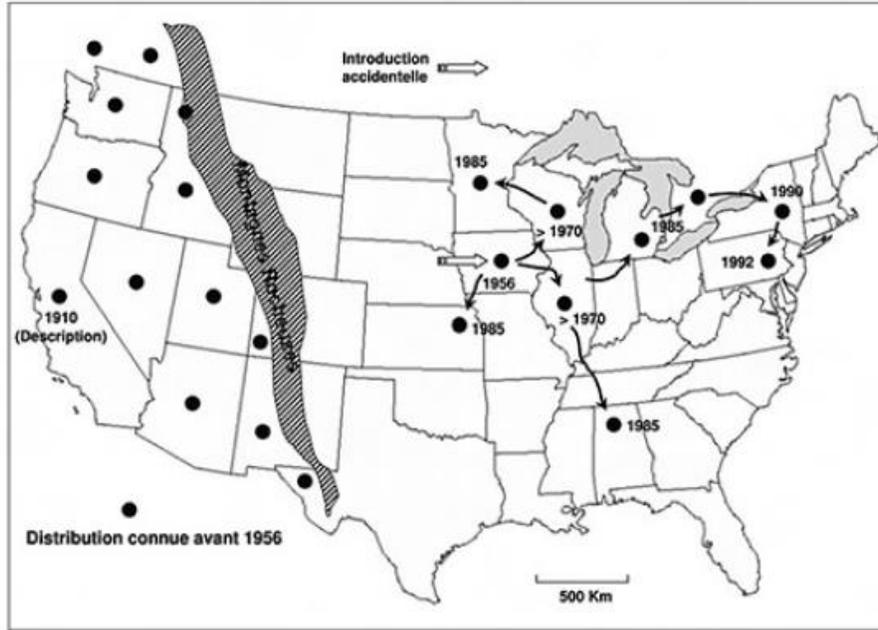
**Figura 18. Ciclo de vida de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (I) Comienzo de la actividad tras oligopausa (gris claro); (II) alimentación de los adultos; (III) cópula; (IV y V) puesta; (VI) emergencia de las ninfas; (VII) ninfas de primer estadio (N1); (VIII) ninfas de segundo estadio (N2); (IX) ninfas de tercer estadio (N3); (X) ninfas de cuarto estadio (N4); (XI) ninfas de quinto estadio (N5); (XI) los adultos pueden volver a copular para dar lugar a más de una generación anual o agregarse, al igual que las ninfas de último estadio, para iniciar la oligopausa (gris oscuro). Autoría de las fotografías: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

### 1.2.3. Distribución y especies hospedantes

El género *Leptoglossus* se distribuye principalmente en las regiones Neotropical y Neártica (Panizzi y Grazia, 2015).

La especie *L. occidentalis* fue descrita por primera vez por Heidemann en 1910 en California y Utah (US), y fue definida como nativa del cuadrante norteamericano comprendido desde México, limitado por las condiciones desérticas, hasta la Columbia Británica (Canadá), limitado por el frío, y desde Colorado hasta la costa de California, limitando al este con las Montañas Rocosas (Figura 19) (Dusoulier et al., 2007; Koerber, 1963).

Desde la segunda mitad del siglo pasado, Gall (1992) registró una progresiva expansión de esta especie hacia el este de Norteamérica (Figura 19) asociada con la dispersión natural del insecto y/o con las actividades humanas, como es el comercio de árboles de Navidad.



**Figura 19.** Distribución de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en Norteamérica. Distribución nativa de la especie al oeste de las Montañas Rocosas (sombreado en gris), y expansión y primeros registros al este de Norteamérica (Dusoulie et al., 2007).

*Leptoglossus occidentalis* ha colonizado con éxito gran parte del Paleártico (Barclay y Nikolaeva, 2018) y varios países del Hemisferio Sur (Figura 20), latitud en la que no se esperaba su expansión (Zhu et al., 2014). En Europa, *L. occidentalis* se detectó por primera vez en Italia en 1999 (Taylor et al., 2001; Tescari, 2001) aunque, probablemente se han producido varias introducciones en diferentes puntos geográficos. En el interior de Europa se han producido translocaciones por la dispersión natural del insecto y/o por la acción humana, como es el comercio internacional de piñas de pino piñonero (Farinha et al., 2023; Lesieur et al., 2018). Aunque *L. occidentalis* es una especie exótico-invasora en este continente (Rabitsch, 2008, 2010), se ha llegado a considerar parte de la fauna europea por su capacidad de adaptación a las diferentes condiciones climáticas, desde las zonas más frías del norte hasta las regiones más cálidas del sur (Tabla 10; Figura 21) (Dusoulie et al., 2007; Pagola-Carte, 2009). Sin embargo, se trata de una especie, que, según el Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras, está incluida en el “Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras - Artrópodos no crustáceos” (MITECO, 2023a).

**Tabla 10. Primeros registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en Europa.** Año en el que se detectó por primera vez *L. occidentalis* por país y fuente.

Año	País	Fuente
1999	Italia	Tescari (2001); Taylor et al. (2001)
2002	Suiza	Colombi y Brunetti (2002)
2003	Eslovenia	Gogala (2003)
	España	Ribes et al. (2004); Ribes y Escolá (2005)
2004	Alemania	Werner (2011)
	Croacia	Tescari (2004)
	Hungría	Harmat et al. (2006)
	Malta	Sciberras y Sciberras (2010)
2005	Austria	Rabitsch y Heiss (2005)
	Francia	Moulet (2006)
2006	República Checa	Beránek (2007)
	Serbia	Protić (2008)
2007	Bélgica	Aukema y Libeer (2007)
	Eslovaquia	Majzlan y Roháčová (2007)
	Países Bajos	Aukema (2008)
	Polonia	Lis et al. (2008)
	Reino Unido	Malumphy et al. (2008)
	Bulgaria	Simov (2008)
2008	Grecia	Petrakis (2011)
	Montenegro	Hradil (2008)
	Rumanía	Ruicănescu (2009)
2009	Dinamarca	Buhl y Stephensen (2009)
	Luxemburgo	Schneider (2010)
	Noruega	Mjøs et al. (2010)
	Turquía	Fent y Kment (2011)
2010	Irlanda	Foley y McCormack (2013)
	Moldavia	Derjanschi (2010)
	Portugal	Grosso-Silva (2010)
	Rusia	Gapon (2013)
	Ucrania	
2011	Suecia	Lindelöw y Bergsten (2012)
2014	Bosnia-Herzegovina	Protic y Stanković (2015)
2015	Kosovo	Kulijer y Ibrahim (2017)
	Macedonia	Kulijer (2016)
2018	Albania	Van der Heyden (2018a)
	Finlandia	Van der Heyden (2020b)
	Georgia	Van der Heyden (2018c)
2019	Chipre	Van der Heyden y Zettel (2019)
	Lituania	Karalius y Karaliūtė (2019)
	Mónaco	Van der Heyden (2019c)
2020	Andorra	Van der Heyden (2020a)
	Bielorrusia	Van der Heyden (2021)
	Estonia	
	Letonia	Van der Heyden y Piterans (2021)

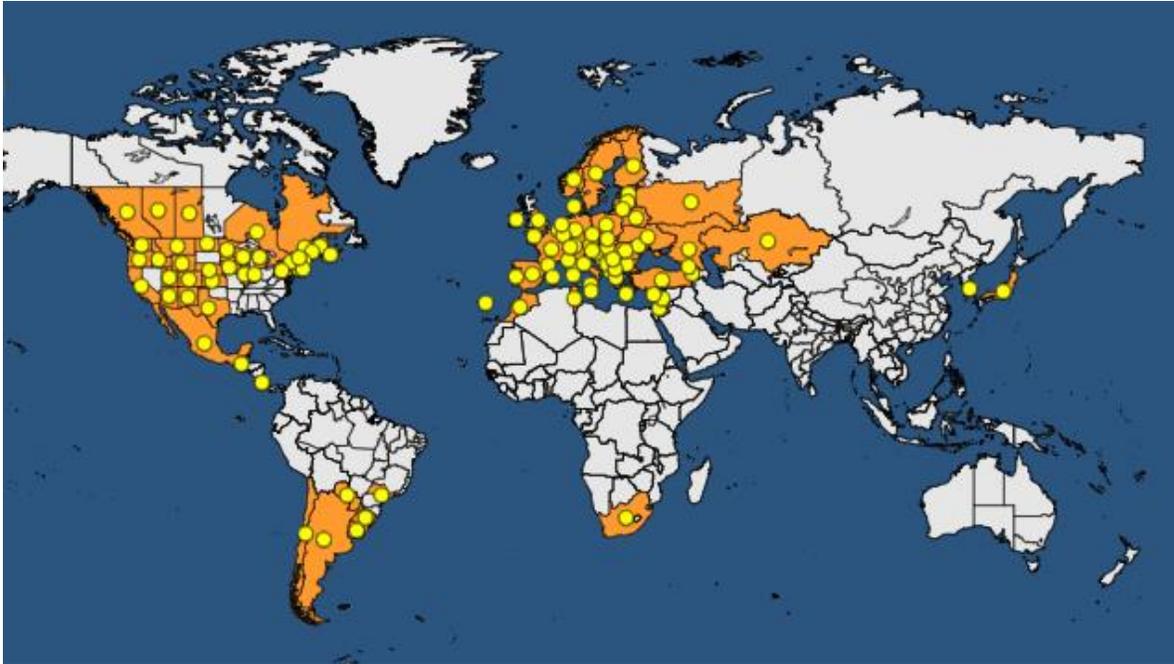


Figura 20. Distribución mundial de *L. occidentalis* Heidemann. Puntos amarillos: avistamientos (EPPO, 2023).

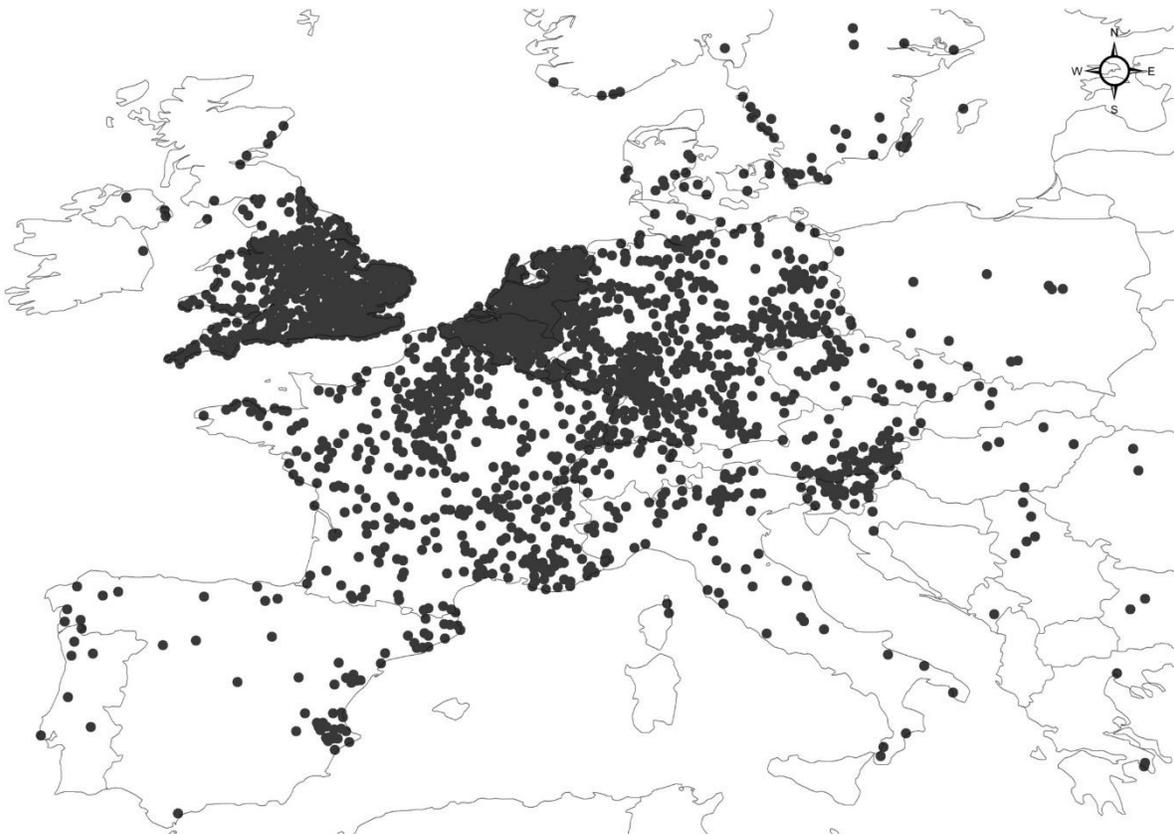


Figura 21. Registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en Europa. Puntos: registros de *L. occidentalis* (Jung et al., 2023).

En el continente africano, *L. occidentalis* se ha citado en Túnez en 2011 (Ben Jamâa et al., 2013), en Marruecos (Gapon, 2015) y Sudáfrica en 2015 (Van der Heyden y Faúndez, 2020), y en Mali en 2020 (Keita et al., 2023).

Al este de Europa, se ha citado en el Líbano en 2015 (Nemer et al., 2019), en Israel en 2016 (Van der Heyden, 2018b), en Kazajistán en 2017 (Barclay y Nikolaeva, 2018), en Argelia (Van der Heyden, 2019a) y Palestina en 2019 (Handal y Qumsiyeh, 2019), y en Armenia en 2020 (Kalashian et al., 2021). En la parte más oriental de Asia se ha detectado en China en 2009 (Zhu, 2010), en Japón en 2008 (Ishikawa y Kikuhara 2009), y en Corea en 2010 (Ahn et al., 2013).

En Sudamérica se registró por primera vez en 2017 en Chile (Faúndez et al., 2017), Uruguay (Faúndez y Silvera, 2019), Argentina (Kun y Masciocchi, 2019), y Brasil (Van der Heyden y Faúndez, 2020), mientras que en Centroamérica se citó en 2019 en Costa Rica (Van der Heyden, 2019b) y Guatemala (Van der Heyden, 2020c).

En España (Tabla 11) se han registrado al menos cuatro grandes eventos de introducción de *L. occidentalis* a través de Barcelona (2003), el País Vasco (2007), Valencia y la costa sureste del país, además de translocaciones internas (Farinha et al., 2023; Gallego et al., 2013).

**Tabla 11. Registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en España.** Año en el que se citó por primera vez *L. occidentalis* por Comunidad Autónoma y fuente.

Año	Comunidad Autónoma	Cita
2003	Cataluña	Ribes et al. (2004); Ribes y Escolá (2005)
	Andalucía	Ribes et al. (2008)
2008	Madrid	Vázquez et al. (2009)
	Región de Murcia	Valcárcel y Portillo (2009)
2009	Aragón	Antor (2010)
	Comunidad Valenciana	Valcárcel y Prieto (2010a)
	País Vasco	Pagola-Carte (2009)
2010	Castilla-La Mancha	Valcárcel y Prieto (2010a)
	Galicia	Valcárcel y Prieto (2010b)
	Islas Baleares	Valcárcel y Prieto (2010a)
2012	Castilla y León	Pérez Hidalgo (2012)

El carácter invasivo de *L. occidentalis* (Barta, 2016) se debe tanto a condiciones extrínsecas, como son el comercio, el turismo o el transporte (Farinha et al., 2023; Gall, 1992; Gapon, 2005; Kim et al., 2020; Lee et al., 2023; Oliveira et al., 2021; Zhu et al., 2014), como a condiciones intrínsecas de la especie, como su polivoltismo, capacidad de vuelo y capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, además de

su carácter polífago, llegando a asociarse con más de 80 hospedantes (Tabla 12), (Farinha et al., 2023; Gall, 1992; Koerber, 1963; Tamburini et al., 2012).

**Tabla 12. Especies hospedantes de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Modificación de Werner (2011).**

Género	Especie	Cita
<i>Abies</i>	<i>Abies amabilis</i> Douglas ex J. Forbes	Lait et al. (2003)
	<i>Abies bornmuelleriana</i> Mattf.	Kim et al. (2020)
	<i>Abies concolor</i> (Gord. et Glend) Lindl	Koerber (1963)
	<i>Abies koreana</i> E.H. Wilson	Werner (2011)
	<i>Abies magnifica</i> A. Murr.	Koerber (1963)
	<i>Abies nordmanniana</i> subsp. <i>bornmuelleriana</i> (Mattf.) Coode & Cullen	Lesieur et al. (2014)
<i>Amygdalus</i>	<i>Amygdalus communis</i> Batsch	Uyemoto et al. (1986)
<i>Calocedrus</i>	<i>Calocedrus decurrens</i> (Torr.) Florin (Libocedrus)	Koerber (1963)
	<i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Menetti	
<i>Cedrus</i>	<i>Cedrus deodora</i> Loud.	Villa et al. (2001)
	<i>Cedrus libani</i> A. Rich.	Nemer et al. (2019)
<i>Cupressus</i>	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Tamburini et al. (2012)
<i>Euonymus</i>	<i>Euonymus japonicus</i> Thunb.	Kim et al. (2020)
<i>Juniperus</i>	<i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb.	Nemer et al. (2019)
<i>Quercus</i>	<i>Quercus coccifera</i> L.	Sciberras y Sciberras (2010)
<i>Larix</i>	<i>Larix decidua</i> Mill	Tamburini et al. (2012)
	<i>Larix occidentalis</i> Nutt.	Manastyrski (2010)
<i>Picea</i>	<i>Picea abies</i> (L.) H. Karsten (= <i>P. excelsa</i> )	Gall (1992)
	<i>Picea asperata</i> Mast.	
	<i>Picea engelmannii</i> (Parry) Engelm	Barta (2009)
	<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	McPherson et al. (1990)
	<i>Picea orientalis</i> (L.) Link	Barta (2009)
	<i>Picea sitchensis</i> (Bong.) Carrière	Bates (1999)
	<i>Picea wilsonii</i> Mast.	Barta (2009)
	<i>Pinus albicus</i> Engelm	Anderton y Jenkins (2001)
	<i>Pinus arizonica</i> Engelm	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus armandii</i> Franch.	Barta (2009)
<i>Pinus</i>	<i>Pinus attenuata</i> Lemmon	Krugman y Koerber (1696)
	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>brachyptera</i> Ehrenb. ex Schltdl.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus banksiana</i> Lamberte	Villa et al. (2001)
	<i>Pinus brutia</i> Ten.	Nemer et al. (2019)
	<i>Pinus cembra</i> L.	Werner (2011)
	<i>Pinus cembroides</i> Zucc.	
	<i>Pinus chihuahuana</i> Engelm	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus contorta</i> Douglas var. <i>latifolia</i> Engelm	Koerber (1963)
	<i>Pinus cooperi</i> Blanco	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus coulteri</i> D. Don	Koerber (1963)
	<i>Pinus culminicola</i> Andresen & Beaman	Flores et al. (2014)
	<i>Pinus densiflora</i> Siebold et Zucc.	Barta (2009)
	<i>Pinus durangensis</i> Mart.	Bustamante et al. (2014)
	<i>Pinus edulis</i> Engelm	Negron (1995)
	<i>Pinus engelmannii</i> Carr.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus flexilis</i> E. James	Schoettle y Negron (2001)
	<i>Pinus greggii</i> Engelm. ex Parl.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus griffithii</i> McClelland	Barta (2009)
	<i>Pinus halepensis</i> Miller	Kment y Baňář (2008)
	<i>Pinus heldreichii</i> H. Christ	Kulijer et al. (2017)
	<i>Pinus jeffreyi</i> Grev. et Balf	Koerber (1963)
	<i>Pinus johannis</i> M.-F. Robert	Flores et al. (2014)
	<i>Pinus lambertiana</i> Douglas	Koerber (1963)
	<i>Pinus laricio</i> Poiret	Maltese et al. (2009)
	<i>Pinus leiophylla</i> Schiede ex Schltdl. & Cham.	
	<i>Pinus lumholtzii</i> B.L. Rob. & Fernald	
	<i>Pinus michoacana</i> Lindl.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus montezumae</i> Lamb.	
	<i>Pinus monticola</i> Douglas ex D. Don	Connelly y Schowalter (1991)

Tabla 12 (Cont.). Especies hospedantes de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Modificación de Werner (2011).

Género	Especie	Cita
<i>Pinus</i>	<i>Pinus mugo</i> Turra (= <i>P. monticola</i> Miller)	Gall (1992)
	<i>Pinus nigra</i> Arnold	McPherson et al. (1990)
	<i>Pinus pinaster</i> Aiton (= <i>P. maritima</i> Lam.)	Niccoli et al. (2009)
	<i>Pinus pinceana</i> Gord.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus pinea</i> L.	Werner (2011)
	<i>Pinus ponderosa</i> Douglas ex Lawson	Koerber (1963)
	<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus radiata</i> D. Don	Koerber (1963)
	<i>Pinus remota</i> (Little) D.K.Bailey & Hawksw.	Flores et al. (2014)
	<i>Pinus resinosa</i> Aiton	Katovich y Kulman (1987)
	<i>Pinus rigida</i> Miller	Barta (2009)
	<i>Pinus rudis</i> Lindl.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus sabiniana</i> Douglas	Koerber (1963)
	<i>Pinus x schwerinii</i> Fitschen	Barta (2009)
	<i>Pinus strobus</i> L.	McPherson et al. (1990)
	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Schaffner (1967)
	<i>Pinus taeda</i> L.	Lait et al. (2003)
	<i>Pinus teocote</i> Schiede ex Schltdl. & Cham.	Cibrián-Tovar et al. (1986)
	<i>Pinus thunbergii</i> Parl.	Kim et al. (2020)
	<i>Pistacea</i>	<i>Pistacea lentiscus</i> L.
<i>Pistacea vera</i> L.		Rice et al. (1985)
<i>Platycladus</i>	<i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	Kim et al. (2020)
<i>Pseudotsuga</i>	<i>Pseudotsuga macrocarpa</i> (Vasey) Mayr	Koerber (1963)
	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirbel) Franco	
<i>Punica</i>	<i>Punica granatum</i> L., Sp. Pl.	Sciberras y Sciberras (2010)
<i>Thuja</i>	<i>Thuja orientalis</i> (L.) Franco	Kim et al. (2020)
	<i>Tsuga canadensis</i> (L.) Carrière	Gall (1992)
<i>Tsuga</i>	<i>Tsuga hererophylla</i> (Raf.) Sarg.	Bates (1999)
	<i>Tsuga mertensiana</i> (Bong.) Carrière	Koerber (1963)

Aunque la dispersión de esta especie por nuevos territorios está limitada por las barreras naturales y la ausencia de especies hospedantes (Gall, 1992; Gapon, 2013), se considera que su principal factor limitante es el clima a nivel local o microclima, específicamente el valor de la integral térmica necesario para que la población pueda completar una o varias generaciones (287 y 538 grados-día) (Barta, 2016; Bernardinelli et al., 2006; Jung et al., 2023; Mas et al., 2013; Naya y Aguado, 2012; Tamburini et al., 2012; Zhu et al., 2014). En este sentido, el aumento local de las temperaturas por el cambio climático podría favorecer la dispersión de *L. occidentalis* por nuevos territorios (Musolin, 2007), como son los bosques de coníferas de zonas montañosas, o su desaparición en zonas en las que se encuentra actualmente (Byeon et al., 2021).

Es probable que *L. occidentalis* se extienda por territorios en los que aún no ha sido citado por su propagación desde lugares ya colonizados (Lesieur et al., 2018), o que se extienda próximamente desde estos territorios. Varios autores han elaborado modelos de dispersión de *L. occidentalis* a diferentes escalas territoriales (Byeon et al., 2021; Gapon, 2013; Kim et al., 2020; Zhu et al., 2014). Según Olivera et al. (2021) esta

especie podría llegar a extenderse prácticamente por todo el mundo en el año 2050, exceptuando las zonas más frías del norte y los trópicos (Figura 22). Este escenario podría empeorar teniendo en cuenta que el modelo no incluye la posible capacidad de adaptación de este insecto a las altas temperaturas y humedades, características de las áreas tropicales (Farinha et al., 2023), o a las bajas temperaturas del norte por establecimiento en entornos urbanos con microclimas adecuados para completar su ciclo biológico (Jung et al., 2023).

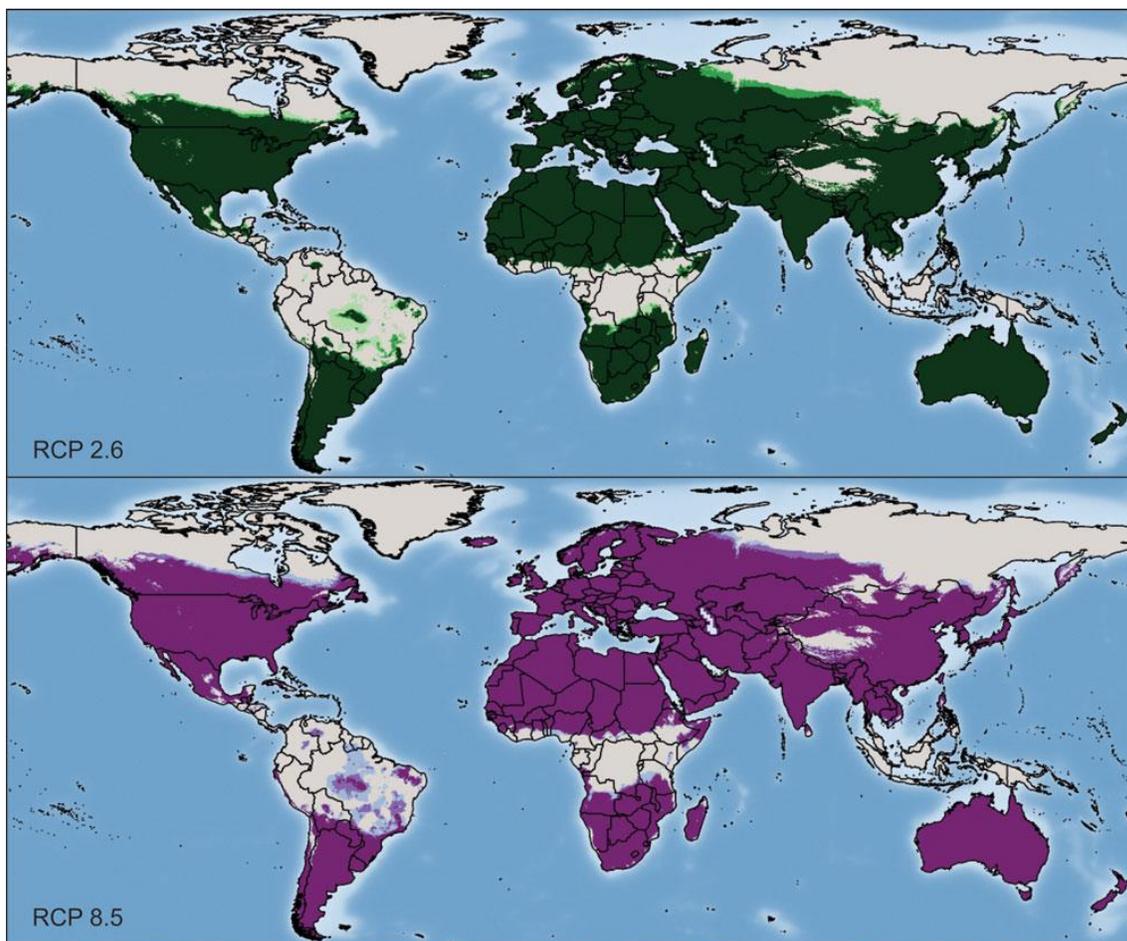


Figura 22. Modelo de dispersión global de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en 2050. Escenarios de emisión moderada (RCP 2.5) y elevadas (RCP 8.5) de gases de efecto invernadero (GEI) (Oliveira et al., 2021).

#### 1.2.4. Daños causados por *Leptoglossus occidentalis*

Los daños causados por *L. occidentalis* se consideran tanto económicos como ecológicos. Los daños económicos se asocian con la reducción del rendimiento de las cosechas de los huertos semilleros productores de semilla de calidad destinada a repoblaciones forestales en Norteamérica (Bates et al., 2000a, 2001, 2002a, 2002b; Blatt y Borden, 1996a; Connelly y Schowalter, 1991; Pasek y Dix, 1988; Schowalter, 1994; Schowalter y Sexton, 1990; Strong, 2006, 2015; Strong et al., 2001; Woods et al., 2015), y de las plantaciones de frutos secos comerciales como pistachos, almendras o avellanas (Rice et al., 1985; Rijal et al., 2021; Uyemoto et al., 1986; Vaccino et al., 2008). Los daños ecológicos consisten en la reducción de la regeneración natural de las masas forestales (Bates, 1999; Bates et al., 2021; Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1998; Lesieur et al., 2014).

Koerber (1963) fue el primero en calificar a *L. occidentalis* como una plaga forestal tras observar la reducción del endospermo de prácticamente todas las semillas de las piñas de *P. menziesii* de las que se alimentaron una hembra y su progenie (98,8%). La preocupación por el impacto de esta plaga, en el rendimiento de las cosechas de los huertos semilleros y de las masas forestales, impulsó el desarrollo de numerosos estudios basados en la exposición de piñas o semillas a la alimentación del insecto en laboratorio (Bates et al., 2000b; Blatt y Borden, 1998; Campbell y Shea, 1990; Koerber, 1963; Lesieur et al., 2014), en el embolsado de insectos junto con piñas en campo (Bates et al., 2000a, 2001, 2002a, 2002b; Connelly y Schowalter, 1991; Dale y Schenk, 1978; Lesieur et al., 2014; Schowalter y Sexton, 1990; Strong, 2006, 2015; Strong et al., 2001), en la exclusión de la alimentación de la población mediante el embolsamiento de las piñas en campo (Blatt y Borden, 1996a; Pasek y Dix, 1988; Schowalter, 1994; Strong, 2006, 2015; Strong et al., 2001) o la aplicación de insecticidas (Strong et al., 2001; Woods et al., 2015) y en la estimación de los daños causados por la población de *L. occidentalis* (Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1996a; Bustamante et al., 2012a, 2012b, 2014; Dale y Schenk, 1978; Flores et al., 2014; Katovich y Kulman, 1987; Kegley et al., 2001; Koerber, 1963; Lesieur et al., 2014; Pasek y Dix, 1988; Schowalter, 1994).

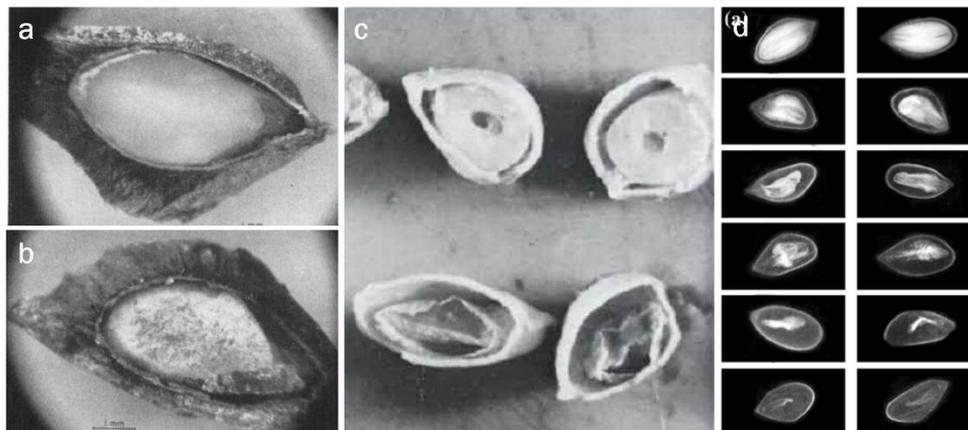
Estos ensayos han estado condicionados por la ausencia de señales, visibles al ojo humano, en la superficie de las piñas de las que se alimenta *L. occidentalis* (Bracalini et al., 2013; Strong, 2001), por lo que los daños causados por esta plaga en las semillas no se pueden detectar antes de su extracción (Pasek y Dix, 1988).

A continuación se describen los daños asociados con la alimentación de *L. occidentalis* en función del tipo de ensayo planteado.

**(I) Exposición de piñas o semillas a la alimentación de *L. occidentalis* en laboratorio.**

*Leptoglossus occidentalis* es una especie polífaga cuyas ninfas son capaces de desarrollarse hasta la madurez cuando se alimentan de semillas de diferentes coníferas forestales presentes tanto en su área nativa (*A. magnifica*, *A. concolor*, *C. lawsoniana*, *L. decurrens*, *P. menziesii*, *P. macrocarpa*, *P. ponderosa*, *P. jeffreyi*, *P. coulteri*, *P. sabiniana*, *P. lambertiana*, *P. radiata* y *T. mertensiana*) (Koerber, 1963) como fuera de ella (*P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. mugo*, *P. abies*, *L. decidua*, *P. abies*, *C. sempervirens* y *A. nordmanniana* subsp. *bornmuelleriana*) (Lesieur et al., 2014; Tamburini et al., 2012).

Las semillas de *P. menziesii* y *P. ponderosa*, coníferas presentes en su área de distribución nativa, de las que se alimentaron ninfas y adultos de esta especie presentaron diferentes intensidades de daño en el endospermo: desde tejidos encogidos y degenerados (Figura 23a) hasta tejidos completamente destruidos o reducidos a un remanente amarillo y marchito (Figura 23b) (Dale y Schenk, 1978; Koerber, 1963). Según Dale y Schenk (1978), el 20,0% de las semillas de las piñas de *P. ponderosa*, de las que se alimentó un solo adulto de *L. occidentalis* en laboratorio durante dos semanas, presentaron daños en el endospermo. Bates et al. (2000b) asociaron los daños leves y moderados del endospermo de semillas de *P. menziesii*, de las que se alimentaron ninfas, hembras o adultos de *L. occidentalis*, con una reducción de la proporción de lípidos superior al 55,0%. En Europa, Lesieur et al. (2014) también observaron diferente intensidad de daños en el endospermo en semillas de varias especies de coníferas europeas (*P. sylvestris*, *P. nigra*, *L. decidua*, *P. abies* y *A. bornmulleriana*) de las que se alimentó un solo adulto durante dos semanas, además de un elevado número de semillas vanas de *P. nigra* (30,0%) y *P. sylvestris* (40,0%).



**Figura 23. Semillas sanas y expuestas a la alimentación *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Semilla de *P. menziesii* sana; (b) semilla de *P. menziesii* dañada; (c) semillas de *P. ponderosa* sanas (arriba) y dañadas (abajo); (d) semillas de *P. sylvestris* sanas (arriba), abortadas de forma natural (abajo) y diferente intensidad de daño en el endospermo (medio). Modificación de Dale y Schenk (1978); Koerber (1963) y Lesieur et al. (2014).

## (II) Embolsamiento de ninfas o adultos con piñas en campo.

Los ensayos de embolsamiento de ninfas o adultos de *L. occidentalis* junto con piñas en desarrollo han generado un gran conocimiento sobre el impacto de esta plaga. La intensidad de daños en las piñas y piñones depende del momento de su desarrollo en el que *L. occidentalis* se alimenta, variando desde el aborto de las piñas inmaduras hasta el daño parcial del endospermo de las semillas.

Según Bates et al. (2002b), los principales daños causados por *L. occidentalis* en las piñas inmaduras son el aborto y la reducción del número de semillas viables, sin afectar a la morfología de los piñones. La mortalidad de las piñas inmaduras de *P. monticola*, embolsadas con dos ninfas de cuarto y quinto estadio durante un periodo de exposición de tres a cinco semanas, fue aproximadamente del 75,0%. El número de las semillas de las piñas que sobrevivieron se redujo en un 46,0% respecto a los controles. Este tipo de daño también fue observado en piñas de *P. contorta* var. *latifolia* expuestas a la alimentación de tres adultos o 10 ninfas de diferentes estadios durante dos semanas, ya que el número de semillas se redujo en un 75,0% respecto a los controles. Sin embargo, la mortalidad de las piñas fue bastante menor (10,3%) en comparación con *P. monticola*. Para ambas especies la proporción de semillas sanas fue similar a la de los controles. En Europa, Lesieur et al. (2014) no pudieron relacionar la mortalidad de las

piñas de *P. sylvestris* de primer año con la alimentación de *L. occidentalis*, ya que tras su embolsamiento durante dos semanas con un adulto (25,0%) o tres ninfas de segundo estadio (3,0%), no fue significativamente mayor que en los controles (8,3%).

Los daños observados en las piñas de las que se alimenta *L. occidentalis* durante su último año de desarrollo dependen de la madurez de la piña y de las semillas, del sexo de los adultos y del estadio de las ninfas (Bates et al., 2001). La mortalidad se ha asociado con la alimentación de *L. occidentalis* al inicio de esta etapa de desarrollo. Connelly y Schowalter (1991) registraron una mortalidad del 40,0% en piñas de *P. monticola* expuestas a la alimentación de un adulto de *L. occidentalis* durante el mes de mayo.

El tipo de daño de las semillas depende del endurecimiento de la cubierta, variando desde la fusión de la semilla a la bráctea hasta los daños parciales en el endospermo. La fusión de la semilla con la bráctea puede producirse antes (Koerber, 1963; Strong, 2006) o después de la fertilización del óvulo, por el derrame del contenido de la semilla a través de la cubierta rota por el orificio de entrada de la probóscide, o por la alteración del desarrollo fisiológico de la semilla que evita que el óvulo se separe de la bráctea para endurecerse (Bates et al., 2000a; Lesieur et al., 2014). Este tipo de daño se ha asociado con la alimentación de *L. occidentalis* al inicio de la temporada de desarrollo de las piñas disminuyendo con su avance (Lesieur et al., 2014; Strong, 2006). La proporción de semillas fusionadas a la bráctea en piñas de *P. menziesii*, expuestas a la alimentación de dos ninfas al inicio de su último año de desarrollo, fue tres veces mayor (35,0%) que en las piñas expuestas al final de dicho año y que en los controles. En piñas de *P. contorta* var. *latifolia*, este tipo de daño fue significativamente mayor al de los controles cuando se expusieron a la alimentación de machos y ninfas al inicio de su último año de desarrollo, mientras que cuando se expusieron a la alimentación de hembras este tipo de daño fue significativamente mayor durante todo su desarrollo (Bates et al., 2000a; Strong et al., 2001). Sin embargo, en piñas de *P. sylvestris* y *P. nigra*, expuestas a la alimentación de adultos o ninfas durante dos semanas, el porcentaje de semillas fusionadas a la bráctea fue menor en junio (1,0% - 31,0%) que a principios de julio (50,0%), siendo en ambos casos significativamente superior respecto a la proporción registrada en los controles (Lesieur et al., 2014).

Tras el endurecimiento de la cubierta de las semillas, los daños causados por *L. occidentalis* afectan al endospermo (Koerber, 1963; Strong, 2006). Este tipo de daño se ha asociado con la alimentación a mediados y finales del desarrollo fenológico de las piñas durante su último año de maduración y su intensidad depende del estado de desarrollo de la semilla, ya que al inicio de la temporada son capaces de sintetizar lípidos aunque hayan sido dañadas, mientras que al final de la temporada esta capacidad se pierde (Bates et al., 2001).

Las semillas vanas son un tipo de daño asociado a la alimentación de *L. occidentalis* (Bates et al., 2002a; Lait et al., 2001a, 2001b) a lo largo de todo su último año de desarrollo. En piñas de *P. menziesii* se registraron porcentajes de semillas vanas del 35,0% (Bates et al., 2000a) y del 50,0% (Schowalter y Sexton, 1990) cuando fueron expuestas a la alimentación de ninfas durante todo su periodo de desarrollo. Sin embargo, este tipo de daño también puede asociarse con otros factores bióticos, abióticos o genéticos (Bates et al., 2000a, 2000b; Bates et al., 2001; Schowalter y Sexton, 1990).

Como se ha mencionado previamente, los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* varían en función de su estadio y sexo. Las hembras necesitan extraer una mayor proporción de lípidos del endospermo de las semillas para cubrir las necesidades de nitrógeno para la producción de huevos (Bates et al., 2001; 2002a; Strong, 2006), por lo que generalmente, causan más daños que los machos y las ninfas. Según Bates et al. (2000), en piñas de *P. menziesii* embolsadas con una hembra, un macho o dos ninfas de tercer y cuarto estadio durante dos semanas al final del último año de desarrollo de las piñas, la proporción de semillas solamente disminuyó en las piñas tratadas con hembras (70,0%). Por otro lado, la proporción de daños en piñas de *P. contorta* var. *latifolia* expuestas a la alimentación de cuatro hembras (45,0%) fue superior que en aquellas expuestas a cuatro machos independientemente del momento del desarrollo fenológico de las piñas. En todo caso, las ninfas causaron la menor proporción de daños en esta especie (Bates et al., 2002a). En Europa, los daños observados en piñas de *P. sylvestris* y *P. nigra*, expuestas a la alimentación de una hembra o un macho durante las dos primeras semanas de junio, no fueron significativamente diferentes en función del sexo. Sin embargo, los machos

consumieron menos de un tercio del endospermo y las hembras más de dos tercios (Lesieur et al., 2014).

### **(III) Daños causados por la población de *L. occidentalis*: piñas protegidas vs. no protegidas (ensayos de exclusión).**

La comparación de los daños de las piñas protegidas y no protegidas a la alimentación de la población de *L. occidentalis* permite estimar su impacto.

Según Pasek y Dix (1988), el rendimiento de las piñas *P. ponderosa* protegidas (3,4% - 25,9%) fue mayor que en las piñas no protegidas (0,0% - 10,9%). El número de semillas sanas de las piñas de *P. contorta* var. *latifolia* expuestas también se redujo en hasta un 75,0% (58,0% - 75,0%) respecto a las protegidas (13,0%- 47,0%) (Strong, 2015; Strong et al., 2001; Woods et al., 2015). Sin embargo, Blatt y Borden (1996a) no encontraron diferencias significativas entre la proporción de semillas dañadas en las piñas protegidas de *P. menziesii* (19,9% - 37,6%) y *P. contorta* var. *latifolia* (12,1%) respecto a las expuestas (*P. menziesii*: 18,4% - 24,2%; *P. contorta* var. *latifolia*: 13,0%).

La adición de los diferentes daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en las semillas de las piñas expuestas a lo largo de todo su desarrollo fenológico, reduce la proporción de semillas sanas o comercializables en comparación con las piñas protegidas. La proporción de semillas sanas en piñas de *P. ponderosa* no protegidas fue del 72,0% (Dale y Schenk, 1978), mientras que en piñas de *P. nigra*, la proporción de semillas sanas en las piñas protegidas fue del 60,0%, reduciéndose al 1,3% - 8,2% en las no protegidas (Lesieur et al., 2014). En piñas de *P. contorta* var. *latifolia*, *P. monticola* y *P. menziesii* no protegidas se registró una reducción de las semillas sanas del 91,7% - 95,0% (Strong, 2006; Strong et al., 2001), 70,0% - 80,0% (Connelly y Schowalter, 1991) y 50,0% - 70,0% (Bates et al., 2000a), respectivamente.

La aplicación de insecticidas en huertos semilleros puede excluir la alimentación de la población de *L. occidentalis* presente, pero no asegura que poblaciones establecidas en las masas circundantes los recolonizen. Según Strong et al. (2001), el número de semillas sanas (> 11 semillas/piña) de las piñas de *P. contorta* protegidas con fenvalerato (0,05%) fue mayor que en las piñas sin insecticida (< 1,7 semillas/piña). En el caso del insecticida Matador® 120EC (104 ml/ha), la proporción de semillas y de

semillas sanas de las piñas de *P. contorta* tratadas aumentó en un 41,0% y 61,0%, respectivamente, en comparación con las piñas no tratadas. Sin embargo, la eficacia de este insecticida depende del momento de su aplicación, siendo mayor al inicio de la temporada (40,0% semillas sanas) que al final (29,0% semillas sanas) (Woods et al., 2015). En piñas de *P. monticola*, la aplicación de una, dos o tres dosis de esfenvalerato (0,006%) redujo el porcentaje de piñones dañados (rango de 4,9% a 6,6%) respecto a los controles (12,0%), mientras que la tercera dosis también redujo la proporción de piñas dañadas (Rappaport et al., 1994).

Por otro lado, el uso de bolsas como barrera de alimentación es un método eficaz que evita la aplicación de insecticidas. En piñas de *P. contorta*, la exclusión de la alimentación de *L. occidentalis* fue más eficaz en las piñas protegidas con bolsas que con insecticida (fenvalerato al 0,05%), siendo la proporción de semillas sanas 1,5 veces superior en las piñas protegidas con bolsas que con insecticida (Woods et al., 2015).

#### **(IV) Estimación de daños causados por *L. occidentalis* en masas forestales.**

La presencia de *L. occidentalis* en las masas forestales se puede determinar mediante el muestreo de piñas y semillas para la identificación de síntomas similares a los observados en las piñas expuestas a la alimentación de *L. occidentalis*.

Hasta el momento, Koerber (1963) es el único autor que asocia la deformación y reducción de la producción de polen de las flores de coníferas con la alimentación de *L. occidentalis*.

La población de *L. occidentalis* se ha asociado con la mortalidad de las piñas (5,0% - 14,0%) de varias especies de pinos productores de semillas comestibles en México (*P. cembroides*, *P. culminicola*, *P. remota*, *P. johannis*, *P. pinceana* y *P. ayacahuilte*) (Flores et al., 2014), con el alto porcentaje de semillas vanas en piñas de *P. resinosa* (67,0%) (Katovich y Kulman, 1987) y con daños en semillas de *P. ponderosa* (8,6% - 27,9%) (Dale y Schenk, 1978; Pasek y Dix, 1988), *P. albicus* (39,3%) (Kegley et al., 2001), *P. menziesii* (< 5,0%), *P. contorta* var. *latifolia* (14,0%) (Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1996a), *P. engelmannii* (0,5% - 1,3%) y *P. durangensis* (0,8% - 1,9%) (Bustamante et al., 2012a, 2012b, 2014). Sin embargo, estos estudios no descartan el aborto de las semillas por otras causas como falta de polinización (Bustamante et al., 2012a, 2012b, 2014;

Katovich y Kulman, 1987), infertilidad, incompatibilidad de los gametos u otro tipo de disfunción fisiológica (Pasek y Dix, 1988), o que parte de la proporción de semillas dañadas fuese causada por otros factores, tanto abióticos como bióticos (Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1996a).

En Europa, Lesieur et al. (2014) analizaron el estado de salud de las semillas de diferentes especies de coníferas en varios huertos semilleros y rodales alpinos de Francia, asociando aproximadamente el 25,0% de las semillas dañadas con la alimentación *L. occidentalis*. En los huertos semilleros se estimaron los siguientes proporciones de semillas dañadas por especie: *P. menziesii* (rango de 2,4% a 25,7%), *P. sylvestris* (rango de 6,1% a 15,6%), *P. nigra* (rango de 3,1% a 15,7%), *L. decidua* (rango de 0,0% a 6,3%), *P. abies* (rango de 1,0% a 1,1%) y *A. nordmanniana* subsp. *bornmuelleriana* (rango de 1,1% a 2,6%). En los rodales alpinos, el porcentaje de semillas dañadas asociadas con la alimentación de *L. occidentalis* se estimó entre el 4,8% y el 70,1% en *P. sylvestris* y entre el 2,0% y el 77,3% en *P. nigra*.

En Asia, la presencia de esta plaga supone una amenaza para la regeneración de coníferas como *C. libani* (Nemer et al., 2019) o para la producción de frutos secos comestibles como los piñones de *P. koraiensis* (Lee et al., 2023).

#### **(V) Daños indirectos causados por *L. occidentalis*.**

*Leptoglossus occidentalis* se ha asociado con la infección de coníferas y pistachos por hongos del género *Botryosphaeria* y la especie *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel (syn. *D. pinea* (Desm.) Kickx. *Sphaeropsis sapinea* / Fr.: Fr./ Dyko & Sutton) (Ascomycota: Botryosphaeriaceae). Estos hongos se introducen en los organismos a través de los orificios realizados por la probóscide de *L. occidentalis* durante la alimentación en acículas (Gall, 1992; Tamburini et al., 2012), piñas o frutos (Rice et al., 1985). *Leptoglossus occidentalis* se considera un vector de *D. sapinea* tras detectar su ADN en adultos recolectados en campo. Este patógeno causa la enfermedad definida como “tizón de la punta por *Diplodia*” en varias coníferas forestales (Luchi et al., 2011; Tamburini et al., 2012).

### 1.3. *Leptoglossus occidentalis* y *Pinus pinea*

El piñón blanco es la principal fuente de ingresos de las masas de pino piñonero en la cuenca mediterránea (Mutke et al., 2013). Entre los años 2000 y 2010, la producción entre Portugal, España, Italia, Turquía y el Líbano se estimó en 4.000 t, pero a partir del año 2011, se ha observado un decaimiento del rendimiento de las cosechas que ha llegado a desabastecer el mercado del piñón blanco. Durante el periodo 2015 - 2020 la producción decreció hasta las 2.600 t (Mutke, 2022; Mutke et al., 2015a).

La reducción del rendimiento de las cosechas se asocia tanto al aumento de la proporción de piñas inmaduras abortadas, durante su primer y segundo año de desarrollo, como al aumento de la proporción de piñones vanos o con el endospermo dañado (> 50,0%) en piñas aparentemente sanas. Este conjunto de daños es definido como el “síndrome de la piña seca” (Bracalini et al., 2013; Calama et al., 2015, 2020; Mutke et al., 2014, 2015a, 2015b, 2017). El aumento de la proporción de este tipo de daños coincide con la introducción de *L. occidentalis* en la cuenca mediterránea (Tabla 10), dónde es considerada como la especie más dañina para la producción de piñón blanco (Taylor et al., 2001; Tescari, 2001; Tiberi, 2007a).

En Italia, la cosecha de piñón blanco se ha reducido en más de un 80,0% a lo largo de una sola década, asociándose con el aumento de la proporción de piñas de primer y segundo año abortadas, y de la proporción de piñones con el endospermo total o parcialmente dañado (94,2%) por la alimentación de *L. occidentalis* (Bracalini et al., 2013; Roversi, 2009; Roversi et al., 2011b; Tiberi, 2007a). En Kozak, principal zona productora de Turquía, también se ha registrado una reducción de las cosechas desde el año 2005, antes del primer registro de esta plaga en el país (Tabla 10), asociada con el aumento de la proporción de piñones vanos (59,0%; rango de 14,0% a 98,0%) respecto a los valores históricos (15,0% - 24,0%) registrados en plantaciones y masas naturales (Parlak, 2017). En la Península Ibérica, la proporción histórica de piñones dañados se situaba por debajo del 10,0%, sin embargo, a partir del año 2011 ha aumentado hasta alcanzar valores del 30,0% - 50,0%, derivando en la reducción del rendimiento medio de piñón con cáscara desde valores históricos del 16,9% - 17,5% a valores del 5,0% - 12,0%, y del rendimiento medio de piñón blanco del 3,6% - 4,1% al 2,2% - 2,8% (Mutke et al., 2017).

En España, el rendimiento de piñón blanco por kilo de piñón con cáscara (Figura 24) se ha reducido de forma significativa en las principales zonas productoras (meseta Norte, meseta Central, suroeste de Andalucía y Cataluña) tras la invasión de *L. occidentalis* (Tabla 11), asociándose con el aumento significativo de la proporción de piñones dañados (Figura 27). Sin embargo, la proporción de piñón con cáscara por kilo de piña fresca (Figura 25) y piñón blanco por kilo de piña fresca (Figura 26) no se ha reducido significativamente en el suroeste de Andalucía.

En la meseta Norte, el rendimiento de piñón blanco por kilo de piña fresca (Figura 26) se reduce en más del 50,0% cuando se comparan los valores de la serie 2012 - 2016 (0,0177) y de la serie histórica (1992 - 2000), previa a la introducción de la plaga (0,0352). La reducción del número de piñones con cáscara por kilo de piña fresca, entre 2012 y 2016 (55,5) respecto a la serie histórica (76,1), sugiere la influencia de una causa ajena al clima, factor limitante tradicionalmente asociado con la reducción del rendimiento del pino piñonero (Calama et al., 2020). La relación establecida entre la alimentación de *L. occidentalis* y la reducción del número de semillas en otras especies de coníferas (Bates et al., 2002b, 2002b) sugiere que esta especie podría estar relacionada con la reducción del número de piñones con cáscara de *P. pinea*. Por otro lado, el rendimiento también es función de la proporción de piñón blanco por kilo de piñón con cáscara, variable dependiente de la salud de los piñones (Figura 27). Desde la detección de *L. occidentalis*, la proporción de piñones vanos o con el endospermo dañado ha aumentado del 13,4% a más del 50,0% (Calama et al., 2020). La relación entre la alimentación de *L. occidentalis* y el aumento de la proporción de piñones vanos y con el endospermo dañado ha sido demostrada previamente en otras especies de coníferas (Bates et al., 2000a, 2001, 2002a; Lait et al., 2001a, 2001b; Lesieur et al., 2014; Schowalter y Sexton, 1990; Strong, 2006).

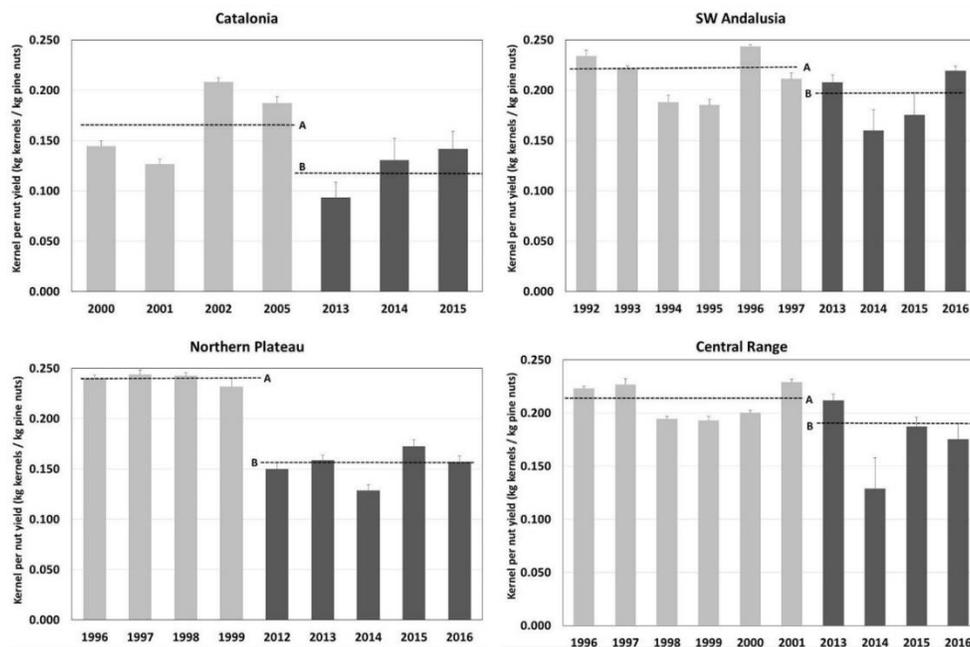


Figura 24. Rendimiento del piñón blanco por kilo de piñón con cáscara de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016. Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020).

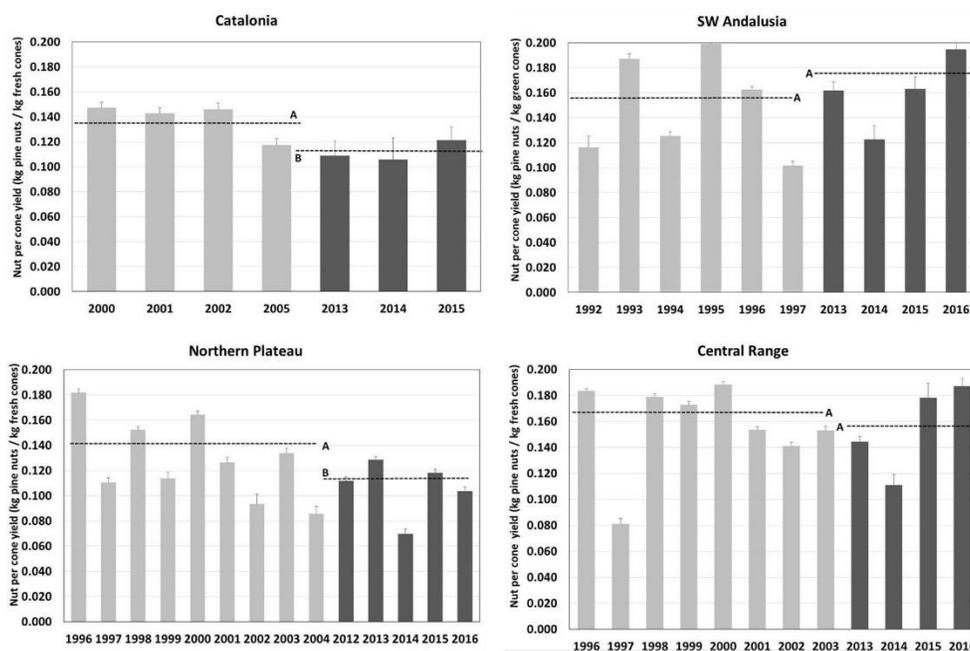


Figura 25. Rendimiento de piñón con cáscara por kilo de piña fresca de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016. Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020).

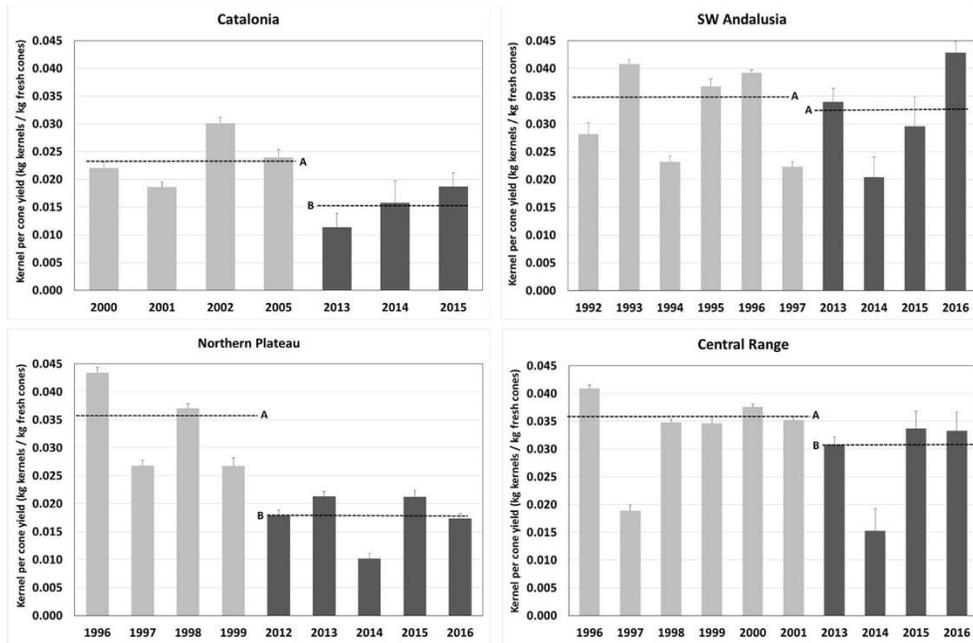


Figura 26. Rendimiento de piñón blanco por kilo de piña fresca de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016. Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020).

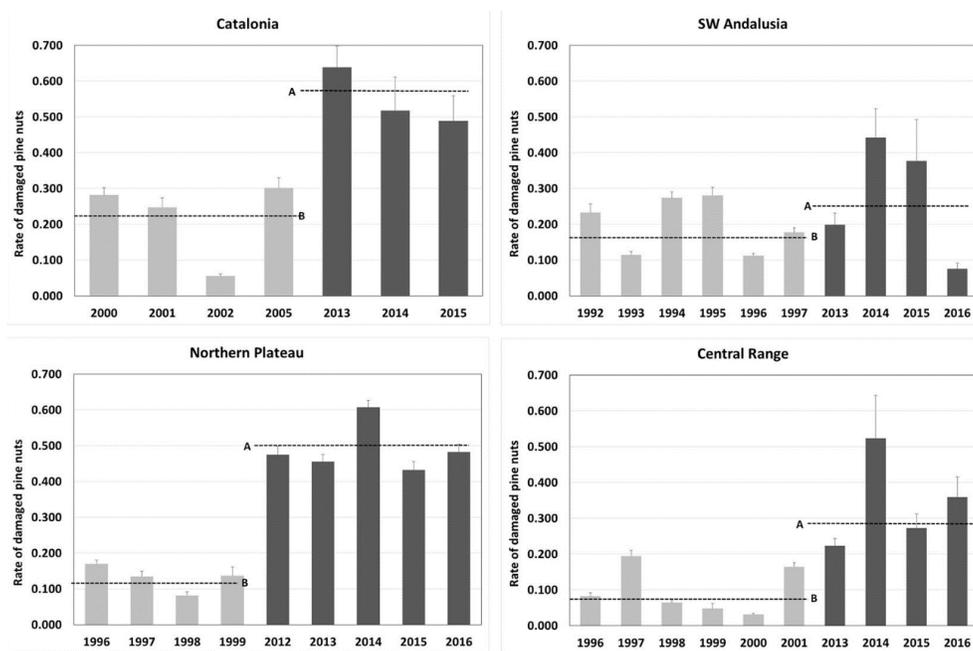


Figura 27. Proporción de piñones dañados de las principales zonas productoras de España entre 1996 y 2015 - 2016. Valores anteriores (gris claro) y posteriores (gris oscuro) a la invasión de *L. occidentalis*. Se incluyen piñones vanos y piñones con daños en el endospermo (Calama et al., 2020).

La reducción del número de piñones sanos por piña supone que, para obtener un solo kilo de piñón blanco se necesitan aproximadamente 40 kg de piña verde cuando históricamente se requerían unos 25 kg (Mutke et al., 2017). Esta reducción del rendimiento conlleva el aumento del precio final del producto (Mutke et al., 2015a; 2015b; Sousa et al., 2012), llegando a superar los 100 €/kg en el mercado (Mutke, 2022), y a la sustitución del consumo o comercialización de este fruto seco por otros con diferentes cualidades organolépticas y nutricionales, como son los anacardos u otros piñones comestibles como el pakistaní (*P. gerardiana*), el chino (*P. koraiensis*) o el ruso (*P. sibirica*), entre otros (Awan y Petenella, 2017; Evaristo, 2016; Evaristo et al., 2010; Guadaño y Mutke, 2016; INC, 2019; Mutke, 2022; Mutke et al., 2012, 2013; Wolff y Bayard, 1995).

Como en el caso de otras especies de coníferas, se han realizado numerosos estudios para asociar la alimentación *L. occidentalis* en piñas de pino piñonero con la reducción del rendimiento de las cosechas de piñón blanco.

#### (I) Exposición de semillas a la alimentación de *L. occidentalis* en laboratorio.

Los trabajos de Farinha et al. (2017, 2018a) indican que los adultos de *L. occidentalis* son capaces de alimentarse de las semillas de pino piñonero a través de su testa, de unos 1,5 mm de grosor. Los daños causados sobre el endospermo, tanto en piñones con testa como sin ella, son la deformación y reducción de la masa del endospermo (Figura 28) entre un 39,67% y un 78,76%. Este tipo de daño fue denominado tipo I y fue asignado a la alimentación de *L. occidentalis* en piñas de pino piñonero en campo (Farinha et al., 2018b).



**Figura 28.** Piñones de *Pinus pinea* L. con el endospermo dañado por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Piñones blancos expuestos a la alimentación de tres adultos de *L. occidentalis* durante dos meses en condiciones de laboratorio. Modificación de Farinha et al. (2018a).

## (II) Embolsamiento de ninfas o adultos con piñas en campo.

Según Farinha et al. (2018b), *L. occidentalis* es capaz de abortar el 18,4% y el 31,6% de las piñas de segundo año cuando son embolsadas con dos adultos o dos ninfas, respectivamente, durante todo el mes de agosto. Sin embargo, el número piñones de estas piñas (ninfas:  $88,9 \pm 2,1$ ; adultos:  $88,5 \pm 2,1$ ) no fue significativamente diferente respecto al de los controles ( $88,8 \pm 2,3$ ).

La proporción de piñones dañados de las piñas control (5,7%) fue significativamente menor que en las piñas embolsadas con adultos (11,9%), pero no lo fue respecto a las embolsadas con ninfas (10,8%). El daño tipo I (endospermo dañado; Figura 29) se asoció con la alimentación de *L. occidentalis* durante el mes de agosto (adultos: 6,9%; ninfas: 4,1%; controles: 0,7%), mientras que la proporción de piñones abortados (aprox. 1,5%) y de tipo II (embrión seco y reducido; Figura 29) (adultos: 5,2%; ninfas: 5,7%; controles: 4,3%) no fueron significativamente diferentes entre tratamientos.

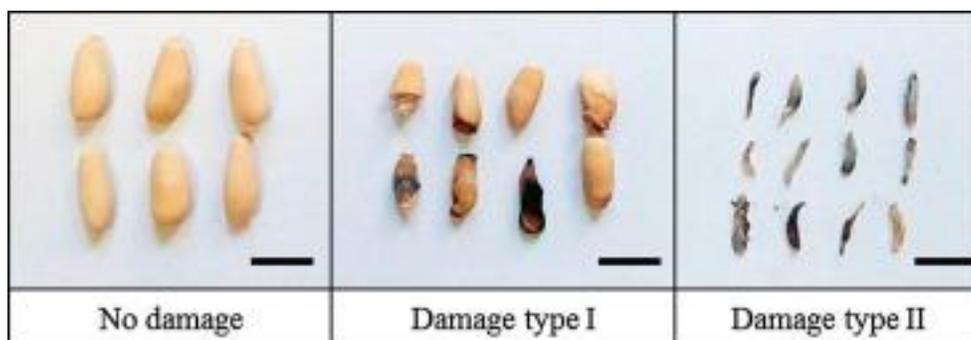


Figura 29. Categorización de los piñones de *Pinus pinea* L. según Farinha et al. (2018b).

## (III) Daños causados por la población de *L. occidentalis*: piñas protegidas vs. no protegidas (ensayos de exclusión).

Los daños causados por la alimentación de la población de *L. occidentalis* en piñas de pino piñonero son similares a los asociados con el “síndrome de la piña seca”, desde la mortalidad de piñas de primer y segundo año (60,0%) hasta el aumento de la proporción de piñones dañados (30,0% - 65,0%) (de la Mata et al., 2019; Elvira-Recuenco et al., 2016).

Según Farinha et al. (2018b), la mortalidad de las piñas de segundo año (30,0%) no protegidas de la alimentación de *L. occidentalis* en una plantación injertada de Portugal

fue seis veces mayor que en las no protegidas, mientras que la mortalidad en las piñas de tercer año no protegidas fue menor (4,3%). El número de semillas también fue significativamente menor en las piñas protegidas ( $88,8 \pm 2,3$ ) que en las no protegidas ( $80,4 \pm 1,3$ ) y la proporción total de semillas dañadas y de tipo I y II (Figura 29) fue significativamente mayor en las piñas no protegidas (total: 30,0%; tipo I: 7,1%; tipo II: 20,6%) que en las protegidas (total: 6,0%; tipo I: 0,8%; tipo II: 4,6%). Sin embargo, la proporción de semillas vanas fue similar ( $< 2,0\%$ ). Los daños tipo I y II se asignaron a daños bióticos, sin descartar la influencia climática, fisiológica, o la alimentación de *L. occidentalis* antes de colocar las bolsas, ya que este tipo de daños también fue encontrado en las piñas protegidas.

#### **(IV) Estimación de daños causados por *L. occidentalis* en plantaciones.**

En Portugal, Sousa et al. (2012) registraron un aumento de los piñones dañados en las cosechas de 2010 - 2011 (8,6% - 12,1%) y 2011 - 2012 (20,7% - 90,3%), tras la detección de *L. occidentalis* (Tabla 10).

Según Loewe-Muñoz et al. (2021), el rendimiento medio del piñón blanco antes (2010 - 2015) y después (2018 - 2019) de la invasión de *L. occidentalis* en Chile no fue significativamente diferente, siendo del 4,2% (rango de 3,6% a 5,0%) y 3,7% (rango de 2,8% a 4,3%), respectivamente. Sin embargo, tras la introducción de la plaga observaron un aumento de la proporción de semillas dañadas (8,4% - 27,8%) y detectaron piñones con el endospermo parcial (tipo I: 58,6%) o totalmente dañado (tipo II: 51,4%) (Figura 29), daños no observados previamente. El porcentaje de piñones vacíos no aumentó tras la introducción de la plaga (1,0%) hasta el periodo 2020 - 2021 (11,1% - 39,3%). Sin embargo, la proporción de piñones con el endospermo dañado (tipo II: 18,9 - 45,4%) no se incrementó respecto al periodo 2018 - 2019 (Loewe-Muñoz et al., 2021, 2023).

Los daños en los piñones también pueden estar relacionados con los tratamientos culturales aplicados en las plantaciones, como es el caso de la fertirrigación. En plantaciones fertirrigadas se ha registrado una menor proporción de piñones abortados en comparación con parcelas no fertirrigadas. Sin embargo, la proporción de piñones con el endospermo dañado (tipo II) es mayor en las plantaciones fertirrigadas (Farinha et al., 2018b; Loewe-Muñoz et al., 2023).

Como se ha comprobado en otras especies de coníferas, los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* varían en función del momento de desarrollo fenológico de la piña en la que se produce (Bates et al., 2000a; Bates et al., 2001; Bates et al., 2002b; Connelly y Schowalter, 1991; Lesieur et al., 2014; Schowalter y Sexton, 1990; Strong, 2006; Strong et al., 2001). La proporción de piñones dañados por la alimentación de *L. occidentalis* en la provincia de Valladolid se incrementó con el desarrollo de los piñones. En las piñas cosechadas en mayo y junio la proporción de piñones dañados fue menor al 5,0%, aumentando al 20,0% - 30,0% en las piñas cosechadas a partir de la segunda quincena de julio, y al 70,0% - 80,0% en las piñas cosechadas entre la segunda quincena de agosto y octubre (Calama et al., 2016a, 2016b).

#### 1.4. *Leptoglossus occidentalis*, la Gestión Integrada de Plagas (GIP) y el Manejo Integrado de Plagas (MIP)

La gestión integrada de plagas (GIP) se define como “el examen cuidadoso de todos los métodos de protección vegetal disponibles y posterior integración de medidas adecuadas para evitar el desarrollo de poblaciones de organismos nocivos y mantener el uso de productos fitosanitarios y otras formas de intervención en niveles que estén económica y ecológicamente justificados y que reduzcan o minimicen los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. La gestión integrada de plagas pone énfasis en conseguir el desarrollo de cultivos sanos con la mínima alteración posible de los agroecosistemas y en la promoción de los mecanismos naturales de control de plagas” (RD 1311/2012, de 14 de septiembre). Según la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, y el Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo “la aplicación de los principios de la gestión integrada de plagas es obligatoria y el principio de subsidiariedad se aplica a la manera en que se implementan los principios de la gestión integrada de plagas, concediéndose prioridad, cuando sea posible, a los

métodos no químicos de protección fitosanitaria y de gestión de las plagas y los cultivos, los Estados miembros deben describir en sus planes de acción nacionales la forma en que garantizan la aplicación de los citados principios”. España transpone el marco de la actuación comunitaria en el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, y elabora una serie de guías de GIP para conseguir implantar los principios de gestión integrada de plagas en cultivos agrícolas, en masas forestales de coníferas, frondosas, eucaliptos y *Quercus*, en pastos, en parques y jardines y redes de servicios (MAPA, 2023a). Entre los principios para la GIP de coníferas se destaca el siguiente: “los métodos biológicos, físicos y otros no químicos deberán preferirse a los métodos químicos. En todo caso, se emplearán de forma integrada con los productos fitosanitarios cuando no permitan un control satisfactorio de las plagas” (MAPA, 2021).

El MIP es definido por la FAO como “la cuidadosa consideración de todas las técnicas disponibles para combatir las plagas y la posterior integración de medidas apropiadas que reducen el desarrollo de poblaciones de plagas. El MIP combina estrategias y prácticas (culturales) específicas de gestión biológica, química, física y agrícola para producir cultivos sanos y minimizar la utilización de plaguicidas, mitigando o reduciendo al mínimo los riesgos que plantean estos productos para la salud humana y el medio ambiente” (FAO, 2023). La selección de las estrategias de un MIP tiene como objetivo la reducción de la densidad de población plaga por debajo del umbral de daño económico, es decir, por debajo de la menor densidad que es capaz de causar daños económicos. La definición del umbral económico se basa en el conocimiento de la biología y ecología de la plaga (Eilenberg et al., 2001; Peshin y Dhawan, 2009; Prokopy y Kogan, 2009).

La situación actual de declive del sector del piñón blanco, asociada con la introducción de *L. occidentalis*, pone de manifiesto la necesidad de definir una serie de estrategias que permitan reducir la densidad de población de esta plaga (Bates y Borden, 2005) por debajo del umbral de daños económicos para este sector. Sin embargo, este umbral no ha sido definido por la falta de un método de monitoreo eficaz que permita asociar el nivel de daños causado por esta plaga en las cosechas de piñón blanco con su densidad de población. Farinha et al. (2021) estimaron el umbral económico de *L. occidentalis* en

función de la pérdida de semillas viables por piña y el número de insectos observados mensualmente, entre mayo y noviembre, en ramas y piñas de pino piñonero. Estos autores establecieron una reducción del 20,0% de semillas viables por piña cuando detectaron insectos en el 20,0% de los pinos, mientras que esta proporción se estimó en un 25,0% cuando observaron insectos en un tercio o un cuarto de los pinos. Por otro lado, sugieren que el umbral de daños podría ser mayor porque no contemplaron la mortalidad de las piñas inmaduras por la alimentación de *L. occidentalis*. Independientemente de esta estimación, el elevado coste del piñón blanco implica que su umbral de daño económico tiene que ser bajo, justificando la implementación de estrategias de control para la protección de las cosechas (Farinha et al., 2018b).

Las estrategias de control del MIP se pueden resumir en las siguientes: resistencia genética del hospedante, control cultural, estrategias de persuasión y atracción, control químico y control biológico. Todas aquellas seleccionadas en un programa de MIP son dependientes entre sí (Landis y Dumrose, 2014; Peshin y Dhawan, 2009).

La definición de las estrategias de control requiere el conocimiento de la fenología de la plaga, que se define mediante el monitoreo de la población durante su temporada de actividad (Ahmad y Kamarudin, 2011). Como se ha mencionado previamente, hasta la actualidad no se ha definido un método eficaz de monitoreo de las poblaciones de *L. occidentalis*.

#### 1.4.1. Resistencia genética del hospedante

La mejora y selección de las plantas frente al ataque de plagas es el método más efectivo, económico y fiable para mantener cultivos sanos y reducir la pérdida de producción (Peshin y Dhawan, 2009).

En España, tras más de 20 años de ensayos de selección de clones de *P. pinea* en función de su producción, se han definido una serie de clones élite como material base de reproducción para plantaciones enfocadas a la producción de piñón blanco (Guadaño y Mutke, 2016). El grupo operativo PINEA, con el objetivo de reducir el impacto de *L. occidentalis* en el sector del piñón, ha definido como acción correctora “Estudiar los materiales de *P. pinea* por su potencial resistencia a *L. occidentalis*” (FAFCYLE, 2023).

En Norteamérica se ha estudiado la preferencia de adultos de *L. occidentalis* por clones de *P. menziesii* y *P. contorta* para definir clones élite en función de su resistencia a *L. occidentalis*. La preferencia por ciertos clones se ha asociado con su capacidad para garantizar el desarrollo de las ninfas (Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1996a).

El mecanismo de selección de los clones por parte de *L. occidentalis* es complejo y puede depender de diferentes estímulos, como son los volátiles emitidos por el hospedante, como es el  $\delta$ -3-carene de *P. contorta*, aparentemente atractivo a corta distancia; la asociación del color de las acículas y de las piñas; el tamaño o su temperatura (Blatt, 1997; Richardson, 2017; Richardson et al., 2016; Zahradnik, 2012). Por otro lado, las necesidades de *L. occidentalis* en diferentes momentos de su desarrollo fenológico (Strong, 2015) y la variación intra e interanualmente de los estímulos, dependientes por otra parte de factores ambientales como el tipo de suelo o clima, podrían modificar la respuesta de atracción de *L. occidentalis* haciendo relativamente difícil la definición de clones resistentes a esta plaga a lo largo de todo su desarrollo fenológico.

#### 1.4.2. Control cultural

El control cultural consiste en el manejo del entorno para evitar el desarrollo de las plagas, reduciendo así su tasa de incremento y, por lo tanto, de daños económicos.

Esta estrategia incluye métodos mecánicos como el laboreo, la poda o la quema, y físicos como la rotación de cultivos, el uso de cultivos intercalados, el aislamiento de los cultivos, la reducción de espacio de los cultivos, el momento de la siembra y cosecha, la cuarentena de cultivos, la solarización del suelo, el riego o la fertilización. Aunque esta estrategia no elimina la plaga, contribuye a la conservación de los enemigos naturales y asegura que se mantengan las condiciones adecuadas para asegurar la productividad de los cultivos (Batra, 1982; Peshin y Dhawan, 2009).

La fertilización aumenta la producción y calidad de las piñas de pino piñonero, y reduce el porcentaje de piñones abortados, aumentando, por lo tanto, la producción de piñón blanco. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, la fertirrigación ha resultado ser perjudicial para la producción de piñón blanco por el aumento de la proporción de

daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* (Farinha et al., 2018b; Loewe-Muñoz et al., 2023).

Entre los métodos de control cultural se incluyen las barreras protectoras de los cultivos, como son las bolsas de malla colocadas sobre las piñas para evitar la alimentación de *L. occidentalis* (Kegley, 2019; Woods et al., 2015).

#### 1.4.3. Estrategias de persuasión y atracción

Las estrategias de persuasión y atracción, también denominadas estrategias push-pull, tienen como objetivo modificar el comportamiento de la plaga o de los enemigos naturales con el fin de manipular la distribución y abundancia de sus poblaciones.

El control biorracional se basa en el uso de compuestos que modifican el comportamiento de la plaga, como son las feromonas, kairomonas y repelentes, entre otros (Batra, 1982).

Las estrategias de persuasión consisten en la repulsión o disuasión de la población plaga mediante estímulos repelentes, disuasorios o que enmascaran la apariencia del hospedador, y que actúan a larga (señales visuales, repelentes sintéticos, volátiles del hospedador o no, feromonas antiagregación y de alarma) o corta distancia (disuasores de oviposición y alimentación) (Ahmad y Kamarudin, 2011; Howse et al., 2013). Como método de repulsión o disuasión de la población de *L. occidentalis* se podría utilizar su feromona de alarma (ver Epígrafe 1.2.2) (Shin et al., 2007), que en los adultos está compuesta por henaxal, hexanol, hexyl acetato, heptyl acetato y octyl acetato, y es emitida a través de su complejo de glándulas odoríferas metatorácicas. En el caso de las ninfas, esta feromona solamente está compuesta por (E)-2-hexanal y es segregada a través de dos glándulas (Benelli et al., 2014; Blatt, 1997; Blatt et al., 1998).

Las estrategias de atracción se basan en la captura de la población plaga, en trampas o cultivos trampa, por atracción mediante estímulos visuales, volátiles de los hospedantes (kairomonas, feromonas sexuales y de agregación) o estimulantes gustativos o de oviposición (Peshin y Dhawan, 2009). Entre estas estrategias se encuentran la captura masiva (mass trapping) de adultos, basada en la reducción de los

niveles de población de la siguiente generación, y la alteración del apareamiento (mating disruption) con componentes feromonales o antagonistas.

El uso de feromonas requiere de su formulación y disponibilidad comercial. Esta técnica favorece la conservación de la biodiversidad por tratarse de un método selectivo que no suele atraer a organismos no objetivo (Ahmad y Kamarudin, 2011).

La población adulta de *L. occidentalis* podría ser controlada mediante el uso de trampas térmicas, por atracción mediante la estimulación de sus órganos receptores de infrarrojos situados en el abdomen (Takács et al., 2009), o por trampas cebadas con feromonas sexuales o de agregación (ver Epígrafe 1.2.2). Como en otras especies del género *Leptoglossus*, la reproducción podría estar mediada por una feromona sexual de corto alcance emitida por los machos (Blatt, 1994; Blatt y Borden, 1996b; Dapporto et al., 2013; Franco-Archundia et al., 2018; Guarino et al., 2008; Wang y Millar, 2000) o por las hembras (Blatt, 1997) durante el cortejo. Entre los compuestos de una potencial feromona de agregación, de largo alcance emitida por los machos, se ha identificado una molécula, denominada leptotrieno, capaz de causar respuestas antenales consistentes en machos y hembras y de atraer población de ambos sexos en campo. Sin embargo, esta feromona no se ha formulado comercialmente hasta el momento (Millar et al., 2022).

#### 1.4.4. Control químico

El control químico consiste en el uso de compuestos naturales o sintéticos que interfieren con el metabolismo de plaga, como son los herbicidas, fungicidas, insecticidas, hormonas, quimioesterilizantes, reguladores del crecimiento y toxinas microbianas (Batra, 1982).

Varios autores han testado la eficacia de varios insecticidas contra *L. occidentalis*. Summers y Ruth (1987) testaron el efecto de la aplicación de tierra de diatomeas, dimetoato (0,1% y 0,01%), permetrina (0,1% y 1,0%) y malatión (0,1%) en la disminución de mortalidad de piñas de *P. contorta* y *P. monticola* de las que se alimentaron *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio, reduciéndose cuando se aplicaron las tres últimas formulaciones. La aplicación de los insecticidas fenvalerato (0,05%) y Matador®

(104 ml/ha) en piñas de *P. contorta* (Strong et al., 2001; Woods et al., 2015), y de esfenvalerato (0,0006%) en piñas de *P. monticola* (Rappaporto et al., 1994) también tuvo efecto en la disminución de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en huertos semilleros (ver Apartado III del Epígrafe 1.2.4).

Sin embargo, como se ha mencionado previamente, la legislación vigente indica que “los métodos biológicos, físicos y otros no químicos deberán preferirse a los métodos químicos. En todo caso, se emplearán de forma integrada con los productos fitosanitarios cuando no permitan un control satisfactorio de las plagas” (MAPA, 2021). Según la Guía de Gestión Integrada de Plagas de Coníferas, el control de *L. occidentalis* en coníferas solamente podrá utilizarse mediante medios químicos “en el caso de que existan, los productos fitosanitarios autorizados para este uso en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación” (MAPA, 2021). Según este registro, el único insecticida aplicable en “pinos” para el control de “chinchas, heterópteros” es el deltametrín 2,5% [EC]/PV, bajo los nombres comerciales AUDACE (nº registro: 23188) y DECIS (nº registro: 25100) (MAPA, 2023b).

En el caso de llegar a combinar el control químico y el control biológico en un programa de MIP, se deben considerar los efectos letales y subletales (alteraciones fisiológicas y comportamentales) que causan los insecticidas sobre los enemigos naturales, entre otras especies no objetivo (Desneux et al., 2007). Según los resultados de Abudulai et al. (2001), el porcentaje de parasitismo en campo de las puestas centinela de *Leptoglossus phyllopus* L. (Heteroptera: Coreidae) colocadas en árboles no tratados y tras ser tratados con endosulfán, se redujo del 14,4% - 21,8% al 2,6% - 7,1%, respectivamente.

#### 1.4.5. Control biológico

El control biológico consiste en el uso de organismos vivos o virus, denominados agentes de control biológico (ACB), como son bacterias, hongos, protozoos, nemátodos, ácaros, insectos y vertebrados, para reducir la densidad de población y, por lo tanto, el impacto de una plaga (Batra, 1982; Beddington et al., 1978; Eilenberg et al., 2001; Orr, 2009; Peshin y Dhawan, 2009) tanto en sistemas agronómicos como en áreas naturales (Messing y Wright, 2006).

El control biológico se subdivide en cuatro categorías en función de sus principios ecológicos: clásico, inundativo, inoculativo y conservativo.

(I) **Control biológico clásico:** consiste en la introducción intencionada de un ACB exótico, que puede o no haber coevolucionado junto con la especie plaga en su área de distribución nativa, para su establecimiento permanente en el nuevo territorio. El objetivo es el control de la población plaga a largo plazo (Batra, 1982; Eilenberg et al., 2001). El número de individuos liberados es menor que en el resto de las estrategias (Frank y Gillett-Kaufman, 2006).

El control biológico clásico se divide a su vez en las siguientes categorías (Eilenberg et al., 2001):

- Control biológico clásico: la plaga y el ACB son exóticos y han coevolucionado en su área de distribución nativa.
- Control biológico clásico de nueva asociación: la plaga y el ACB son exóticos, pero no han coevolucionado en su área de distribución nativa.
- Control biológico neoclásico: la plaga es nativa y el ACB es exótico.

Antes de iniciar un programa de control biológico (PCB) en campo hay que analizar los riesgos y beneficios de conlleva la introducción de un ACB exótico (Abram et al., 2016; Messing y Wright, 2006; Van Lenteren et al., 2003) a partir de una serie de ensayos desarrollados en laboratorio y en condiciones seminaturales y naturales. Estos ensayos definen la eficiencia y eficacia de los enemigos naturales como ACB mediante la estimación de los daños causados en especies no objetivo, su capacidad detectar y parasitar a la especie objetivo, su capacidad de establecimiento y de dispersión en el nuevo hábitat, sus relaciones de hiperparasitismo (con individuos de otras especies) y superparasitismo (con individuos de la misma especie) y su posible hibridación con otras especies nativas. Tras la suelta del ACB se deben seguir controlando los posibles riesgos que conlleva la introducción de este nuevo organismo porque los ensayos de laboratorio no siempre son predictivos (Binazzi et al., 2016; Quacchia et al., 2007). Medir estos riesgos es un proceso largo y costoso en el que intervienen muchas variables (Gibbs et al., 2011).

**(II) Control biológico aumentativo:** consiste en la supresión de plagas nativas o exóticas por el aumento de la población de enemigos naturales mediante sueltas periódicas inoculativas o inundativas (Peshin y Dhawan, 2009).

- Sueltas inoculativas: consisten en la liberación periódica de ACB para que controlen a la población plaga a largo plazo, aunque no de forma permanente como en el caso del control biológico clásico. Si tras aplicar un PCB clásico se requieren liberaciones adicionales, el control pasaría a considerarse inoculativo (Eilenberg et al., 2001).
- Sueltas inundativas: consisten en la liberación periódica de un gran número de ACB para suplementar a los presentes con la expectativa de que controlen la población plaga sin necesidad de reproducirse antes de dispersarse o morir. El éxito del programa depende de los organismos liberados y no de su progenie. Los biopesticidas suelen incluirse dentro de esta estrategia de control biológico (Eilenberg et al., 2001; Frank y Gillett-Kaufman, 2006). Este tipo de liberación requiere del estudio de la ecología y comportamiento de los ACB en el área en el que serán liberadas, del método de producción en masa a precios competitivos y de su aplicación (número de individuos) efectiva (Mills, 2010).

**(III) Control biológico conservativo:** esta estrategia se centra en el ACB y no en la población plaga, como es el caso del control cultural. Consiste en la modificación del entorno para favorecer la disponibilidad de recursos, como refugio y alimento, o en la mejora de las prácticas aplicadas, como es la limitación del uso de insecticidas para conservar y favorecer a los enemigos naturales de la plaga, ya sean exóticos o nativos (Eilenberg et al., 2001).

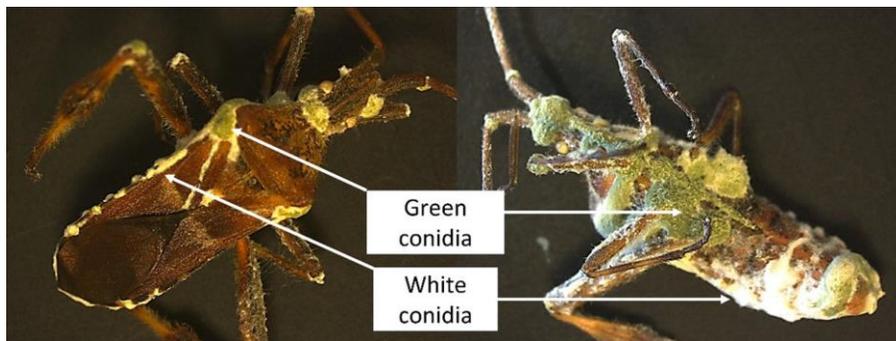
Los enemigos naturales tienen una gran importancia ecológica y económica por ser reguladores poblacionales (Keeling et al., 2004).

El éxito de un PCB depende de la selección de los ACB. Estos deben ser capaces de adaptarse al hábitat, tener una alta capacidad de establecimiento, estar sincronizado con la fase susceptible del hospedante y ser compatibles con el posible uso de insecticidas (Crowder, 2007). También hay que tener en cuenta las características del nuevo hábitat en el que se introduce el ACB, como las condiciones de temperatura y

humedad, la disponibilidad de refugio y de alimento (Ceballo y Walter, 2004; Desneux, et al., 2007; Sabbatini Peverieri, 2012; Stiling, 1993).

*Leptoglossus occidentalis* cuenta con enemigos naturales tanto fuera como dentro de su área de distribución nativa, entre los que se encuentran varias especies de hongos entomopatógenos (Barta 2009, 2010a, 2010b, Eski et al., 2022), parasitoides de adultos (Ridge-O'Connor, 2001) y parasitoides de huevos (Bates y Borden, 2004; Lesieur y Farinha, 2021; Maltese et al., 2012; Niccoli et al., 2009; Roversi et al., 2011a).

Entre las especies de hongos entomopatógenos virulentas que causan la mortalidad de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio se encuentran las siguientes: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912), *Isaria fumosorosea* Wize (1904) (= *Cordyceps fumosorosea*) (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn (1883), *Metarhizium flavoviride* W. Gams & Rozsypal (1973) (Figura 30) y *Metarhizium brunneum* Petch (1935) (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Barta, 2010a, 2010b; Eski et al., 2022). Sin embargo, su virulencia en campo es menor que en condiciones de laboratorio debido a la menor supervivencia de los conidios por las diferentes condiciones de temperatura, humedad relativa y radiación solar (Barta, 2010a). Por otro lado, no se ha demostrado la transmisión horizontal de los hongos en condiciones de laboratorio, método que podría utilizarse para la erradicación de las colonias de *L. occidentalis* durante la agregación invernal (Eski et al., 2022).



**Figura 30.** Adultos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann afectados por un hongo entomopatógeno. Conidios de *Metarhizium flavoviride*. White conidia: tras 6 días en cámara húmeda; green conidia: tras 10 días en cámara húmeda (Eski et al., 2022).

*Trichopoda pennipes* (F.) (Diptera: Tachinidae) (Figura 31) es el único parasitoide de adultos citado hasta el momento sobre *L. occidentalis*. En su área nativa, Ridge-

O'Connor (2001) registró un porcentaje de parasitismo del 1,5% - 16,0% en adultos capturados durante dos inviernos consecutivos. *Trichopoda pennipes* es una mosca que realiza la puesta sobre la superficie del cuerpo de los adultos. Cuando las larvas eclosionan se introducen en su cuerpo para alimentarse y, al final de su desarrollo, salen por su ano para pupar. Los adultos parasitados acaban muriendo. *Trichopoda pennipes* ha sido introducida accidentalmente en la Península Ibérica (Ricarte et al., 2000), aunque hasta el momento no se ha registrado parasitando a *L. occidentalis*.

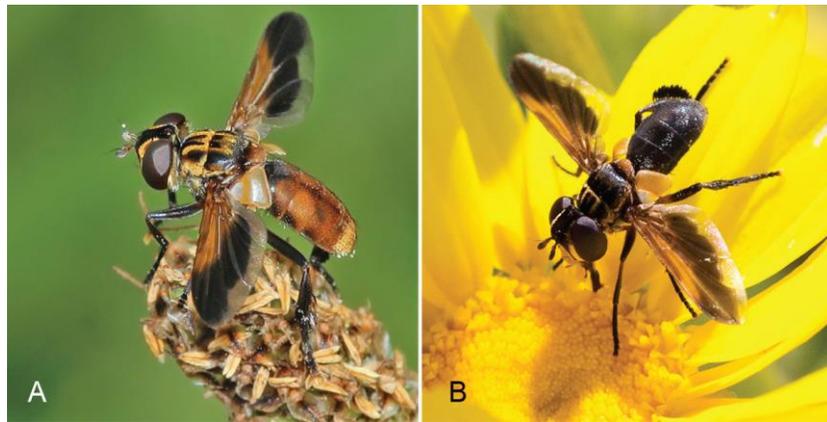


Figura 31. *Trichopoda pennipes* (F.). (A) hembra; (B) macho (Ricarte et al. 2020).

Los parasitoides de huevos (a partir de ahora parasitoides) son ACB que matan a la plaga antes de alcanzar el estadio causante de los daños económicos (Cusumano et al., 2012a). Este tipo de organismos muestran una mayor capacidad de establecimiento que los parasitoides con otras tácticas reproductivas (Mills, 2005).

El impacto de un parasitoide sobre la población plaga se puede medir en condiciones naturales utilizando cuatro índices (Colazza y Bin, 1995; Costi et al., 2018):

- **Índice de eficiencia de descubrimiento:** número de puestas con al menos un huevo parasitado respecto al total de puestas. Este índice representa la habilidad de los parasitoides para encontrar las puestas y depende de la capacidad de los parasitoides para detectar los huevos de los hospedantes mediante señales directas, como son los volátiles emitidos por las puestas, o indirectas, como son las feromonas de los adultos o los volátiles emitidos por las plantas cuando la plaga se alimenta o realiza la oviposición (Colazza et al., 2004; Cusumano et al., 2012a; Howse et al., 2013; Keeling et al., 2004; Lesieur y Farinha, 2021). Un ejemplo de

atracción indirecta es la feromona emitida por los machos de *Leptoglossus australis* Fabricius (Hemiptera: Coreidae) para atraer a las hembras, por la que se siente atraída el parasitoide *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae), anteriormente denominado *Gryon pennsylvanicum* (Yasuda, 1998; Yasuda y Tsurumachi, 1995).

- **Porcentaje de parasitismo:** número de huevos parasitados sobre el total de huevos. Este índice puede variar según el carácter gregario o solitario de los parasitoides. En las especies solitarias la ratio de emergencia es igual a la progenie, es decir, emerge un parasitoide por cada huevo parasitado, como es el caso de *H. pennsylvanicus* (nº huevos parasitados = fecundidad:  $80,7 \pm 36,0$ ). Mientras que en las especies gregarias la ratio de emergencia puede ser mayor a la unidad porque los parasitoides tienden a ovipositar más de un huevo en cada huevo del hospedante, como es el caso de *O. anasae* (nº huevos parasitados:  $9,4 \pm 4,3$ ; fecundidad:  $32,2 \pm 13,3$ ; progenie/huevo: rango 2 a 7) (Nechols et al., 1989; Tracy y Nechols, 1987). Por lo tanto, el porcentaje de parasitismo tiende a ser mayor en las especies solitarias porque necesitan parasitar un mayor número de huevos del hospedante respecto a las gregarias.
- **Índice de eficiencia de explotación de las puestas:** número de huevos parasitados sobre el total de huevos de las puestas parasitadas. Este índice representa la habilidad de los parasitoides para parasitar todos los huevos de una puesta. Puede estar influido por el carácter gregario o solitario de los parasitoides, y por su comportamiento reproductivo. Sabbatini Peverieri et al. (2013) observaron que las hembras de *H. pennsylvanicus* no comienzan a parasitar una nueva puesta hasta que no parasitan todos o la mayoría de los huevos de la puesta que se encuentran parasitando.
- **Impacto sobre la población plaga:** número de huevos parasitados respecto al total de huevos. Este índice representa la habilidad de los parasitoides para reducir la población plaga y debería incluir la mortalidad no reproductiva, es decir, los huevos parasitados de los que no emergen parasitoides (Abram et al., 2016; Colazza y Bin, 1995; Konopka et al., 2020) por diferentes causas como la inyección de sustancias

que modifican el ooplasma del huevo parasitado limitando el desarrollo del hospedante (Cusumano et al., 2012b).

La prospección de parasitoides de una plaga y el impacto sobre su población puede realizarse mediante:

- Monitoreo de las puestas ovipositadas en campo por la población.
- Monitoreo de puestas ovipositadas por hembras embolsadas junto con ramas en campo.
- Monitoreo de puestas centinela procedentes de laboratorio.

El desarrollo de la progenie de las puestas centinela no es tan exitoso como en las realizadas por la población, afectando a la viabilidad de los huevos para ser parasitados y, por lo tanto, a la estimación de daños causados por los parasitoides sobre la población. Esto puede deberse a la desecación de los huevos por las diferentes condiciones ambientales, respecto a las de laboratorio, o por la infertilidad de las hembras de laboratorio (Cornelius et al., 2016a). Por otro lado, la riqueza de parasitoides y el porcentaje de parasitismo de las puestas centinela es menor en comparación con las puestas realizadas por la población, probablemente porque las señales de atracción captadas por los parasitoides son diferentes (Cornelius et al., 2016b). En Norteamérica, la riqueza de parasitoides y el porcentaje de parasitismo de las puestas centinela (número de especies: 5; porcentaje de parasitismo: 0,8 - 4,6%) de la plaga exótica *Halyomorpha halys* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) fueron menores en comparación con los valores obtenidos en puestas realizadas por la población en campo (número de especies: 7; porcentaje de parasitismo: 28,4% - 55,3%) (Cornelius et al., 2016b; Jones et al., 2014). En puestas centinela de la plaga nativa de Norteamérica *Anasa tristis* DeGeer, (Hemiptera: Coreidae), emergió una menor proporción de *H. pennsylvanicus* (21,8%) que en puestas ovipositadas por la población de campo (55,7%) (Cornelius et al., 2016a). En Europa, los parasitoides nativos de *L. occidentalis* aceptaron mejor las puestas ovipositadas por la población (índice de eficiencia de descubrimiento: 21,21%; porcentaje de parasitismo: 7,71%, índice de eficiencia de explotación: 3,43 huevos/puesta) que las puestas centinela de laboratorio (índice de

eficiencia de descubrimiento: 4,58%; porcentaje de parasitismo: 1,42%; índice de eficiencia de explotación: 1,67 huevos/puesta) (Lesieur y Farinha, 2021).

El mayor impacto de los parasitoides sobre las puestas ovipositadas por la población puede deberse, como se ha mencionado previamente, a señales de atracción directas o indirectas que podrían estar ausentes en las puestas centinela de laboratorio. Por lo tanto, la prospección de parasitoides y su impacto sobre la población plaga varía en función del tipo de sustrato de oviposición monitoreado, pudiendo llegar a infravalorarse cuando se utilizan puestas centinela procedentes de laboratorio (Colazza y Bin, 1995; Jones et al., 2014).

La riqueza de parasitoides de una plaga también depende de su carácter nativo o exótico en el hábitat en el que se realiza la prospección. Las plagas nativas tienen una mayor riqueza de parasitoides que las exóticas, mientras que los parasitoides nativos requieren de un tiempo de adaptación a la fenología, ecología y comportamiento de las plagas exóticas con las que no han coevolucionado. Este hecho influye en el impacto de los parasitoides sobre la población plaga y en la proporción de especies generalistas y especialistas que forman parte del complejo de parasitoides, que en las plagas exóticas suele estar compuesto solamente por especies generalistas. La riqueza de parasitoides de una especie exótica puede aumentar con el transcurso del tiempo y su expansión geográfica, sin embargo, la proporción de especies generalistas y especialistas no se suele modificar (Cornelius et al., 2016b; Cornell y Hawkins, 1993; Herlihy et al., 2016). En Norteamérica, se ha registrado un claro ejemplo de cómo la coevolución de dos especies puede influir en el éxito de un PCB. El porcentaje de parasitismo (0,2%) y la ratio de emergencia (2,0%) de los huevos centinela de la plaga *H. halys* parasitados por cuatro especies de parasitoides nativos fueron menores en comparación con los valores obtenidos para una única especie exótica, *Trissolcus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Sceleonidae), procedente de la misma área de distribución que la plaga, Asia (porcentaje de parasitismo; 3,1%; ratio de emergencia (70,0%) (Herlihy et al., 2016; Talamas et al., 2015).

En Norteamérica, el principal parasitoide de huevos de *L. occidentalis* es *H. pennsylvanicus* (Figura 32a). Este fue citado por primera vez por Bates y Borden (2004), junto con *Anastatus pearsalli* Ashmead (Hymenoptera: Eupelmidae) y otras especies de

especies del género *Ooencyrtus*, en puestas centinela (0 - 7 días) expuestas al parasitismo durante tres semanas en ramas de *P. contorta* var. *latifolia*. El porcentaje de parasitismo fue del 87,0%, 8,0% y 4,0%, respectivamente. Posteriormente, Maltese et al. (2012) registraron porcentajes de parasitismo de *H. pennsylvanicus* del 2,3%, 4,5% y 44,0% en huevos ovipositados por la población, huevos centinela procedentes de laboratorio y huevos ovipositados por hembras embolsadas con ramas en campo, respectivamente. Estos autores solamente registraron dos puestas parasitadas por *A. pearsally* (12,1%) y otras dos por *Ooencyrtus johnsoni* (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae) (14,2%) en *P. monticola* en Canadá. Mientras que las puestas parasitadas por *H. pennsylvanicus* se encontraron en un mayor número de hábitats: *P. contorta*, *P. engelmannii*, *P. monticola* en Canadá y en *P. menziesii* y *P. lambertiana* en California.

En Europa, el complejo de parasitoides nativos de *L. occidentalis* está formado por *Anastatus bifasciatus* Geoffroy (Hymenoptera: Eupelmidae), *O. pityocampae*, *Baryscapus* (= *Tetrastichus*) *servadeii* Dom. (Hymenoptera: Eulophidae) y *Ooencyrtus telenomicida* Vassiliev (Hymenoptera: Encyrtidae). Los primeros registros de huevos de *L. occidentalis* parasitados por especies europeas tuvieron lugar en masas costeras de *P. pinaster* y montañosas de *P. nigra*, de los que solamente emergió la especie *A. bifascitus* (Niccoli et al., 2009). Posteriormente, Roversi et al. (2011a) colocaron 4.500 huevos centinela procedentes de laboratorio en masas costeras de pino piñonero. Estas fueron parasitadas en una proporción menor al 1,0% por *A. bifascitus*, *O. pityocampae* y *B. servadeii*. Lesieur y Farinha (2021) realizaron una prospección de parasitoides nativos en una plantación de *P. nigra* en Francia, encontrando las especies *A. bifascitus*, *O. pityocampae* y *O. telenomicida* Vassiliev (Hymenoptera: Encyrtidae). El conjunto, *A. bifascitus* parasitó más puestas (31), huevos (176) y huevos dentro de las puestas parasitadas (5,57) que las dos especies del género *Ooencyrtus* juntas (38, 50, 1,25, respectivamente).

El complejo de parasitoides de *L. occidentalis* en Europa podría incluir otras especies del género *Ooencyrtus*, caracterizadas por ser enemigos naturales de huevos de un gran número de especies de hemípteros y lepidópteros, entre otros, y por su una amplia distribución geográfica (Huang y Noyes, 1994; Mercet, 1921). Este último autor registró las siguientes especies de *Ooencyrtus* y *Schedius*, actualmente unificadas como

*Ooencyrtus* (Noyes, 1981), en España en su obra “Fauna Ibérica: Himenópteros, Familia Encírtidos”: *Schedius pityocampae* Mercet, *Schedius pityocampae* var. *abdominalis* Mercet, *Schedius obscurus* Mercet (Figura 32b), *Schedius distinctus* Mercet, *Schedius masii* Mercet, *Schedius kuwanae* Howard, *Schedius fasciatus* Mercet, *Schedius flavofasciatus* Mercet, *Schedius tardus* (Ratzeburg), *Schedius vinulae* (Masi), *Schedius azureus* Mercet, *Schedius proximus* Mercet, *Ooencyrtus gravis* (Nees), *Ooencyrtus elegans* Mercet y *Ooencyrtus vagus* Mercet (Hymenoptera: Encyrtidae).

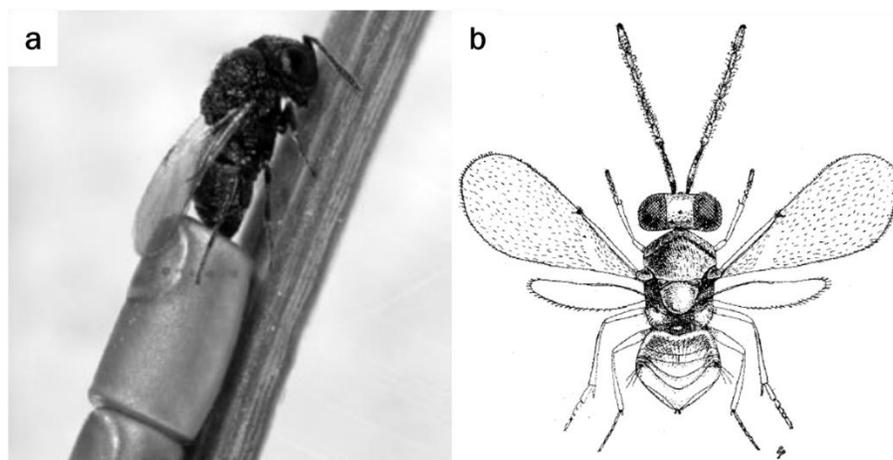


Figura 32. Parasitoides de huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. (a) *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead; (b) *Ooencyrtus pityocampae* Mercet. Modificación de Mercet (1921) y Roversi et al. (2011b).

Los parasitoides europeos no parecen ser lo suficientemente efectivos como para reducir la población de *L. occidentalis* en comparación con el especialista *H. pennsylvanicus* (Lesieur y Farinha, 2021). A pesar de que el uso de parasitoides nativos como ACB garantiza la conservación de las especies no objetivo (Costi et al., 2018; Van Lenteren et al., 2003), cuando su impacto sobre la población plaga es muy bajo hay que optar por la introducción de enemigos naturales más eficaces, como es el caso de *H. pennsylvanicus* con *L. occidentalis* (Bates y Borden, 2004; Maltese et al., 2012). Roversi et al., (2011b) propusieron la introducción de esta especie en Europa tras obtener un alto porcentaje de parasitismo en condiciones de laboratorio (71,8% - 87,0%) y un alto índice de eficiencia de explotación de las puestas, es decir, una alta capacidad para parasitar todos o la mayoría de los huevos de una puesta (Roversi et al., 2011b, 2012; Sabbatini Peverieri et al., 2012, 2013).

El uso de *H. pennsylvanicus* como ACB de *L. occidentalis* en Europa es respaldado por su baja proporción de parasitismo (5,0%) y escaso éxito reproductivo en ocho especies europeas no objetivo de las familias Coreidae (4), Alididae (1), Pentatomidae (1) y Reduviidae (2). Solamente emergió un parasitoide de un huevo de *Gonocerus juniperi* Herrich-Schaeffer (Hemiptera: Coreidae), y otros tres no consiguieron emerger de los huevos sin pseudopérculo de otras dos especies no objetivo. *Hadronotus pennsylvanicus* emerge a través del pseudopérculo del huevo mordisqueando su unión con el corion, por lo que una de las claves para la proliferación de este parasitoide en especies no objetivo es el pseudopérculo. A pesar de los esperanzadores resultados de este estudio, el amplio rango de distribución de *L. occidentalis* en Europa hace que sea necesario medir el impacto de *H. pennsylvanicus* en otras especies no objetivo presentes en otras regiones o hábitats (Binazzi et al., 2016; Roversi et al., 2013). A pesar de que hasta el momento no se ha desarrollado ningún PCB clásico con *H. pennsylvanicus* como ACB, no puede descartarse la presencia accidental de este parasitoide, como ha ocurrido recientemente en Japón (Komeda et al., 2020).

Aunque el impacto de los parasitoides europeos en las poblaciones de *L. occidentalis* es bajo, se ha estudiado el potencial de *O. pityocampae* como ACB en condiciones de laboratorio. Esta especie es capaz de parasitar huevos en los que las ninfas se encuentran totalmente desarrolladas sin reducir el porcentaje de parasitismo (Tunca et al., 2022), el número medio de huevos parasitados, la progenie o la *sex ratio* (% de hembras). La edad del huevo solamente afecta a la duración del desarrollo larvario de las hembras (Binazzi et al., 2013).

Los parámetros de la tabla de vida (Tabla 13), la fecundidad a lo largo de la vida de las hembras (Figura 33) y los parámetros demográficos (Tabla 14) reflejan el crecimiento y tamaño poblacional futuro de los enemigos naturales, y a su vez, su capacidad como ACB (Giovannini et al., 2020).

**Tabla 13. Parámetros de una tabla de vida.** Definición y unidad de los parámetros de una tabla de vida (Roversi et al., 2017).

Parámetro	Definición	Unidad
Longevidad de los adultos	Periodo transcurrido desde la emergencia hasta la muerte	Días
Periodo de pre-oviposición	Periodo transcurrido desde la emergencia y la primera oviposición	Días
Periodo de oviposición	Periodo transcurrido entre la primera y la última oviposición	Días

**Tabla 13 (Cont.). Parámetros de una tabla de vida.** Definición y unidad de los parámetros de una tabla de vida (Roversi et al., 2017).

Parámetro	Definición	Unidad
Periodo post-reproductivo	Periodo transcurrido desde la última puesta hasta la muerte	Días
Fecundidad	Número de descendientes de una hembra	Progenie/hembra
Fertilidad	Número de huevos ovipositados por una hembra	Stalks/hembra
Progenie abortada	Número de descendientes que no llegan a emerger	Progenie no emergida/hembra
Ratio de emergencia	Proporción de progenie emergida por huevo parasitado	Progenie/huevo
Mortalidad inmaduros	Cociente entre el número de huevos parasitados sin orificios de salida y el total de huevos parasitados	%
Periodo de desarrollo pre-imaginal	Periodo transcurrido desde la oviposición hasta la emergencia de la progenie	Días
Sex ratio	Proporción de hembras de la progenie	% hembras

**Tabla 14. Parámetros demográficos.** Definición, unidad y fórmula de los parámetros demográficos (Jervis et al., 2007).

Parámetro	Definición	Unidad	Fórmula
Tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ )	Crecimiento potencial poblacional	Hembras/hembra/día	$r_m = \ln(\sum l_x \cdot m_x) / T$
Tasa bruta de reproducción (GRR)	Fecundidad de las hembras a lo largo de su vida	Hembras/hembra/generación	$GRR = \sum m_x$
Tasa neta de reproducción ( $R_0$ )	Número veces que se multiplica la población por generación	Hembras/hembra/generación	$R_0 = \sum l_x \cdot m_x$
Capacidad finita de incremento ( $\lambda$ )	Número veces que se multiplica la población por unidad de tiempo	Hembras/hembra/día	$\lambda = e^{r_m}$
Duración media de una generación (T)		Días	$T = \sum x \cdot l_x \cdot m_x / R_0$
Tiempo de duplicación de la población ( $T_d$ )		Días	$T_d = (\ln 2) / r_m$

Entre los parámetros demográficos, la tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ) refleja el crecimiento potencial de una población bajo unas condiciones ambientales determinadas, define su capacidad de supervivencia en un determinado ambiente, como es el desarrollo en una nueva especie con la que no ha coevolucionado, y permite estimar el impacto de un enemigo natural en una población plaga. La tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) es la progenie media producida por una sola hembra a lo largo de toda su vida teniendo en cuenta la mortalidad y, se estima a partir de la ratio de supervivencia ( $l_x$ ) y fecundidad ( $m_x$ ) de las hembras a una edad y condiciones específicas. El producto de ambos factores es la progenie media producida por una hembra a la edad  $x$ . El sumatorio de la progenie de todas las edades es igual a la progenie media a lo largo de toda la vida de la hembra. Este parámetro también se denomina ratio de reemplazamiento y define la dinámica poblacional. Cuando  $R_0 < 1$ , la progenie no reemplaza completamente a la población de la generación anterior, por lo que decrece; si  $R_0 = 0$ , toda la población es reemplazada por la nueva progenie y la población se

mantiene estable; si  $R_0 > 1$ , la progenie es mayor que la población de la generación anterior, por lo que aumenta. Por otro lado, la población se mantiene estable cuando  $R_0 = 1$  y  $r_m = 0$ ; decrece si  $R_0 < 1$  y  $r_m < 1$ ; y aumenta si  $R_0 > 0$  y  $r_m > 0$ . La representación de la ratio de supervivencia ( $l_x$ ) y de la fecundidad ( $m_x$ ) de las hembras, en diferentes edades específicas, define la fecundidad de las hembras a lo largo su vida (Figura 33). Normalmente, la supervivencia de las hembras decrece paulatinamente con el paso de los días, mientras que la fecundidad de las hembras varía con el tiempo en función de su comportamiento reproductivo (Hulting et al., 1990; Jervis et al., 2001, 2005). La tasa bruta de reproducción (GRR) define el crecimiento potencial de la población sin tener en cuenta límites ecológicos, por ejemplo, la depredación. Es el límite poblacional máximo, siendo el valor real inferior al tratarse de un parámetro difícil de conseguir en la naturaleza (Jervis et al., 2007).

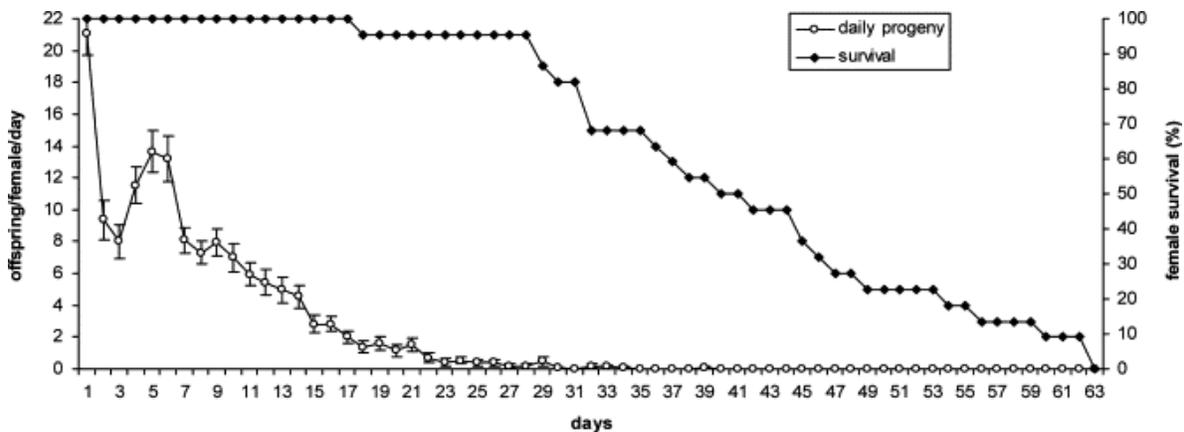
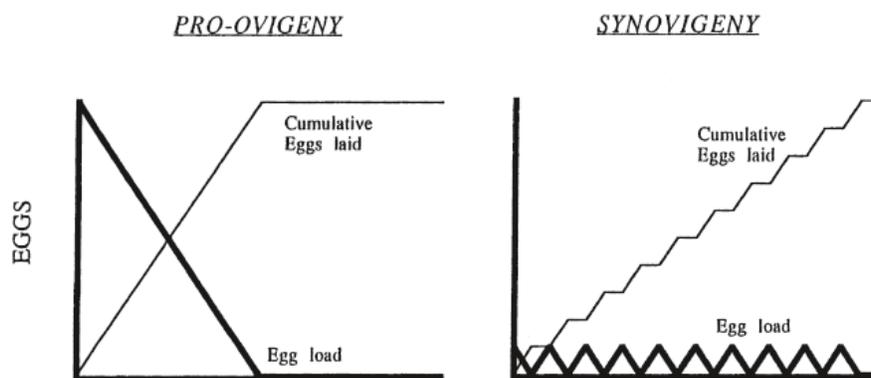


Figura 33. Fecundidad a lo largo de la vida de *Hadronotus pennsylvanicus* Ashmead. Número de progenie hembras por hembra y porcentaje de supervivencia de las hembras por día (Sabbatini Peverieri, 2012).

La longevidad de las hembras depende de la disponibilidad de alimento (Aung et al., 2010; Ganjisaffar y Perring, 2020; Jervis et al., 2005; Lee 1979; Martel et al., 2019; Mohammadpour et al., 2018; Roversi et al., 2017; Sabbatini Peverieri et al., 2012; Straser et al., 2022; Tunca et al., 2015) y de sustrato de oviposición. Mientras la longevidad de *O. pityocampae* (Mohammadpour et al., 2018), *H. pennsylvanicus* (Straser et al., 2022) y *Gryon gonikopalense* (Hymenoptera: Scelionidae) (Martel et al., 2019) se reduce cuando no disponen de huevos sobre los que realizar la oviposición, la longevidad de *Ooencyrtus submetallicus* (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae) aumenta con la disponibilidad de huevos (Lee, 1979).

La fecundidad de las hembras a lo largo de su vida (Figura 33) depende, principalmente, de su comportamiento reproductivo, aunque también influyen factores externos como la temperatura o la disponibilidad de alimento. Los parasitoides se dividen en especies pro-ovigénicas, las hembras emergen con todos los huevos maduros y no producen más huevos una vez realizada la oviposición, y sinovigénicas, las hembras emergen con una parte de los huevos maduros y el resto se desarrollan a lo largo de su vida (Figura 34). La primera oviposición puede realizarse días después de emerger, tras un periodo de pre-oviposición, y puede transcurrir un periodo de post-oviposición desde que las hembras realizan la última puesta hasta que mueren. Cuando una especie sinovigénica no requiere alimento para finalizar la maduración de los huevos se denomina autógena, mientras que si necesita alimento se denomina anautógena. La clasificación de las especies en función de su comportamiento reproductivo se puede definir mediante el índice de ovigenia, o la proporción huevos ovipositados durante su primer día de vida respecto al total. Sin embargo, es más adecuado utilizar el número de huevos maduros y no maduros en el momento de la emergencia de las hembras, medido de forma experimental mediante disecciones. En las especies pro-ovigénicas el índice de ovigenia es igual a la unidad, mientras que para aquellas extremadamente sinovigénicas es 0, existiendo rangos intermedios de sinovigénica. La longevidad de las especies pro-ovigénicas suele ser menor que la de las especies sinovigénicas (Ceballos y Walter, 2004; Jervis, 2007; Jervis et al., 2001).



**Figura 34. Distribución de la oviposición a lo largo de la vida de las especies pro-ovigénicas y sinovigénicas.** Los huevos ovipositados por hembras pro-ovigénicas aumentan linealmente con el tiempo porque emergen con todos los huevos maduros, mientras que en las sinovigénicas aumenta de forma escalada y progresiva porque emergen con una parte de los huevos inmaduros y el resto se desarrollan con el tiempo (Heimpel y Rosenheim, 1998).

Los parámetros demográficos y de la tabla de vida pueden variar en función de las condiciones ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo), la edad y densidad de los huevos del hospedante, y la edad y densidad de las hembras utilizadas en los ensayos de laboratorio. Estos parámetros se calculan de forma experimental mediante la exposición de una determinada densidad de huevos a una o varias hembras con una edad inferior a 24 h, con o sin macho, a lo largo de la vida de la hembra. El grupo de huevos expuestos al parasitismo es reemplazado periódicamente, tanto para ofrecer una cantidad de huevos suficiente a las hembras como para asegurarse de que los huevos se encuentran en condiciones óptimas para ser aceptados por las hembras. Mientras que el periodo de reemplazamiento de los huevos puede ser superior a 24 h, la vitalidad de las hembras, el número de huevos parasitados y la emergencia de los parasitoides se registra a diario (Tunca et al., 2019).

- La temperatura de desarrollo de los ensayos puede influir en la longevidad de los adultos, la maduración de los huevos de las hembras sinovigénicas, el periodo de oviposición, la ratio de emergencia, la duración del desarrollo de los estadios inmaduros y la *sex ratio* (Aung et al., 2010; Lee, 1979; Tracy, 1987). Como ejemplo, la ratio de emergencia, la *sex ratio* (% hembras), la duración del desarrollo de los estadios inmaduros y la longevidad de los adultos de *O. telenomicida* en huevos *Bagrada hilaris* Burmeister (Hemiptera: Pentatomidae) aumentó con el incremento de la temperatura (Roversi et al., 2017; Tunca et al., 2022). El tipo de reproducción partenogenética (descrito a continuación), de especies como *O. pityocampae* y *O. submetallicus*, puede variar en función de la temperatura pre-imaginal e imaginal a la que se exponen las madres y, por lo tanto, influir en la *sex ratio* de la progenie (Halperin, 1990; Wilson y Woolcock, 1960). La diapausa de estadios inmaduros y adultos del género *Ooencyrtus* también puede ser inducida o finalizada por la temperatura y el fotoperiodo, limitando el número de generaciones por año y el impacto sobre la población plaga (Anderson y Kaya, 1974, 1975).
- La edad de los huevos del hospedante puede determinar su aceptación como sustrato de oviposición. Como ejemplo, el número de huevos ovipositados por *O. nezarea* en huevos de *Riptortus clavatus* Thunberg (Hemiptera: Alydidae) se redujo significativamente a partir del cuarto día (Takasu y Hirose, 1993). Sin embargo,

otras especies como *H. pennsylvanicum* son capaces de parasitar huevos de *L. occidentalis* y *L. zonatus* con ninfas en avanzado estado de desarrollo (Sabbatini Peverieri et al., 2013; Straser et al., 2022).

- La edad de las hembras puede influir en la *sex ratio* de la progenie, generalmente a favor de los machos por el agotamiento del esperma almacenado. Como ejemplo, *H. pennsylvanicus* se aparea una sola vez y la proporción de progenie hembras se reduce con la edad de la hembra en el momento (Ganjisaffar y Perring, 2020; Sabbatini Peverieri et al., 2012).
- La densidad de huevos expuestos al parasitismo puede influir en la *sex ratio*. Según los resultados de Tracy y Nechols (1987), la proporción de hembras de la progenie de *O. anasae* aumentó con la reducción de la densidad de los huevos expuestos al parasitismo. Esta variable también puede influir en las relaciones de competencia cuando los ensayos de parasitismo se realizan con más de una hembra (superparasitismo). En las especies *O. kuvanae* y *O. pityocampae*, el superparasitismo de los huevos aumentó con la reducción de la densidad de huevos expuestos (Tunca et al., 2016, 2017). Algunas especies, como *O. nezarea*, evitan el superparasitismo no ovipositando en huevos parasitados por otras hembras (Takasu y Hirose, 1988).
- La densidad de las hembras puede influir sobre la mortalidad de la progenie, su tamaño e incluso en el número de ovocitos en el caso de ser hembras (Cusumano et al., 2012a, 2015). También puede incrementar el tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros y la proporción de machos, o reducir de la longevidad de la progenie (Tunca et al., 2016, 2017).

La *sex ratio* de la progenie puede estar sesgada por la edad de las hembras (Sabbatini Peverieri et al., 2012) y por la infección de las hembras por un microorganismo del género *Wolbachia*. Este provoca que toda la progenie sean hembras y puede transmitirse horizontalmente por relaciones de superparasitismo (Pijls et al., 1996). Sin embargo, el factor determinante de la *sex ratio* de la progenie es la estrategia de reproducción de los parasitoides. Los himenópteros se caracterizan por su capacidad de reproducción asexual por partenogénesis: arrenotóquica, las hembras son

biparentales y diploides (2n), mientras que su progenie está formada exclusivamente por machos haploides (n); pseudo-arrenotóquica, la progenie de los huevos fecundados está formada por machos y hembras diploides (2n); deuterotóquica, la progenie son exclusivamente hembras uniparentales y diploides (2n); o telitóquica, las hembras son uniparentales y diploides (2n), mientras que su progenie está formada por hembras diploides y, en raras ocasiones, por machos haploides (n) no funcionales (Frank y Gillet-Kaufman, 2006). En los programas de control biológico, el carácter deuterotóquico o telitóquico de los ACB se considera una ventaja (Ceballo y Walter, 2004).

## 2. Objetivos

La preocupación del sector del piñón blanco en España, especialmente en la meseta Norte, por el declive de las cosechas registrado desde la detección de la plaga de piñas de coníferas, *L. occidentalis*, impulsó el desarrollo de esta tesis cuyos objetivos principales son establecer una relación entre el declive de las cosechas y la alimentación de *L. occidentalis* en diferentes momentos del desarrollo fenológico de las piñas para definir los periodos más susceptibles a sufrir daños y, por lo tanto, establecer una base cronológica para la aplicación de estrategias de control de esta plaga; así como la búsqueda de enemigos naturales y nativos de *L. occidentalis* que puedan ser utilizados como ACB en futuros PCB como parte de un programa de manejo integrado de esta plaga en España.

Para la consecución de estos objetivos se definieron tres ensayos, cuyos objetivos específicos se enumeran a continuación:

- Ensayo para la caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de *Pinus pinea* causados por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis*:
  - (I) Relacionar los daños ocasionados por *L. occidentalis* con los síntomas del “síndrome de la piña seca”.
  - (II) Caracterizar y cuantificar los daños en piñas y piñones de *P. pinea* causados por la alimentación de *L. occidentalis* en diferentes momentos del desarrollo fenológico de las piñas de primer, segundo y tercer año: daños estacionales.

- (III) Estimar los daños causados por la alimentación de la población de *L. occidentalis* en piñas expuestas durante todo su desarrollo fenológico.
- Prospección de parasitoides de huevos nativos de *Leptoglossus occidentalis*:
  - (IV) Identificar la comunidad de parasitoides nativos de huevos de *L. occidentalis* en dos hábitats de *P. pinea*.
  - (V) Estimar el impacto causado por los parasitoides nativos de huevos sobre la población de *L. occidentalis* mediante el cálculo de cuatro índices de parasitismo.
  - (VI) Estimar la sincronización entre el estado susceptible de *L. occidentalis* y los parasitoides nativos de huevos.
- Evaluación de *Ooencyrtus obscurus* como enemigo natural de *Leptoglossus occidentalis* en laboratorio:
  - (VII) Relacionar el tamaño de las puestas de *L. occidentalis* con la capacidad de parasitismo de la especie con mayor impacto en la población de *L. occidentalis* en campo, y con la ratio de emergencia y la sex ratio de la progenie.
  - (VIII) Definir la estrategia reproductiva de la especie con mayor impacto en la población de *L. occidentalis* en campo.
  - (IX) Definir la capacidad como ACB de la especie nativa con mayor impacto sobre la población de *L. occidentalis* en campo mediante la definición de sus parámetros de la tabla de vida y demográficos, y la fecundidad de las hembras a lo largo de su vida en condiciones estándar de laboratorio.
  - (X) Describir la evolución del aspecto externo de los huevos de *L. occidentalis* parasitados.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Zonas de experimentación

Los ensayos de caracterización de los daños a piñas y piñones causados por la alimentación de *L. occidentalis* se desarrollaron en la parcela número 15 (B23TORa, febrero de 2008) del banco clonal “El Molinillo” (Tordesillas, Valladolid; X: 337.475,6, Y: 4.596.011, ETRS89-UTM Huso 30 norte; 675 m) (Figura 35) formada por 144 pinos injertados de la especie *P. pinea*, con una altura de 1 a 3 m y plantados un marco de 6 x 6 m (278 pies/ha). La presencia de masas adultas en el entorno del banco clonal aseguró la polinización de los pinos (Calama et al., 2011). La parcela no fue fertirrigada, pero las malas hierbas se eliminaron anualmente de forma mecanizada, exceptuando el área situada bajo la copa de los pinos.

La prospección de parasitoides nativos se desarrolló en la parcela número 15 del banco clonal y en una parcela de 100 x 100 m de una repoblación de *P. pinea* (M.U.P. 17 “Común y Escobares”), localizada en Nava del Rey (Valladolid; X: 328.547,1, Y: 4.590.585,3, ETRS89-UTM Huso 30 norte; 687 m), con una altura de 1,5 a 3 m y una edad aproximada de 15 años (Figura 2).

El monitoreo de la población de *L. occidentalis* se desarrolló en las parcelas número 15, 19 y 20 (B23TORb, febrero de 2008) del banco clonal. Las dos últimas parcelas estaban formadas por un total de 138 pinos injertados de la especie *P. pinea*, con una altura de 1 a 3 m y plantados un marco de 6 x 6 m (278 pies/ha) (Figura 35).

El clima de las zonas de experimentación es mediterráneo continentalizado, caracterizado por veranos secos e inviernos fríos con probabilidad de heladas entre septiembre y mayo. La temperatura media anual varía de 10,1 °C a 13,5 °C, y la absoluta de -22 °C a 44 °C. La precipitación media anual es de 460 mm (rango de 275 a 700 mm) (Calama et al., 2011).



**Figura 35. Banco clonal “El Molinillo”.** Parcela 15 (B23TORa) (línea continua) y parcelas 19 y 20 (B23TORa) (línea discontinua). Modificación de Visor IDECyL (2023).

### 3.2. Colonia de laboratorio de *Leptoglossus occidentalis*

Las hembras y ninfas utilizadas en los ensayos de campo, y los huevos utilizados en los ensayos de laboratorio se obtuvieron de una colonia de *L. occidentalis* mantenida en el laboratorio de Plagas y Enfermedades Forestales del Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales de la Universidad de Valladolid (Palencia) desde el año 2014. La colonia fue ampliada anualmente con los insectos cedidos por los Agentes Medioambientales y el Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos de la Junta de Castilla y León, los emergidos durante los ensayos de prospección de parasitoides en campo y durante los ensayos de laboratorio.

La colonia se mantuvo en cajas de cría (47,5 × 47,5 × 93 cm, 160 µm malla) (Entomopraxis, Barcelona) en condiciones estándar de laboratorio (21 ± 2 °C; HR 40% ± 10%) y fotoperiodo natural. Como fuente de alimento se ofrecieron piñones blancos *ad libitum*, y como fuente de agua y sustrato de oviposición varias plántulas de *P. halepensis* (2 - 3 savias) (Figura 36).



**Figura 36.** Colonia de laboratorio de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Laboratorio de Plagas y Enfermedades Forestales de la Universidad de Valladolid (Palencia). Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 3.3. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de *Pinus pinea* causados por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis*

#### 3.3.1. Embolsamiento de piñas con *Leptoglossus occidentalis*: daños estacionales

La caracterización y cuantificación de los daños a piñas y piñones, causados por la alimentación de *L. occidentalis* en diferentes momentos del desarrollo fenológico de las piñas, se estimó a partir de tres ensayos en función de la edad de las piñas: primer, segundo y tercer año (Figura 37, Tabla 15).



**Figura 37.** Piñas de *Pinus pinea* L. embolsadas. (a) Piñas de primer, (b) segundo y (c) tercer año embolsadas para el desarrollo de los ensayos de caracterización y cuantificación de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* a lo largo de su desarrollo fenológico. Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

**Tabla 15. Parámetros de los ensayos de caracterización y cuantificación de los daños a piñas y piñones de *Pinus pinea* L. causados por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Número y estadio de *L. occidentalis* embolsados por piña, número de pinos, número de piñas embolsadas con insectos (E) y número de piñas protegidas (P) de la alimentación de la población de *L. occidentalis* por pino, fecha de embolsamiento y ensayo.

Ensayo	Número y estadio de los insectos	Edad de las piñas	Número de pinos	Número de piñas/pino (E:P)	Fechas de embolsamiento
1	2 hembras	3 años	10	4:1	10 - 24 abril; 7 - 21 mayo; 4 - 18 junio; 2 - 16 julio
			10	4:1	24 abril - 7 mayo; 21 mayo - 4 junio; 18 junio - 2 julio; 16 - 30 julio
			10	2:1	4 - 18 agosto; 1 - 15 septiembre
2	2 hembras	2 años	10	4:1	7 - 21 mayo; 4 - 18 junio; 2 - 16 julio; 20 agosto - 3 septiembre
			10	2:1	4 - 18 agosto; 1 - 15 septiembre
			10	2:1	2 - 9 julio; 20 - 27 agosto
3	2 ninfas	1 año	10	2:1	14 - 21 julio; 28 julio - 4 agosto
			10	2:1	

La selección de los pinos se basó en la disponibilidad de piñas de la misma edad (Bates et al., 2001), independientemente de los clones (Bates et al., 2002a; Strong, 2015). En marzo de 2015 se seleccionaron dos grupos de 10 pinos con al menos cinco piñas de tercer año (Ensayo 1). De forma simultánea se seleccionaron dos grupos de 10 pinos con un mínimo de tres o cinco piñas de segundo año (Ensayo 2). En marzo de 2016, se seleccionaron 10 árboles adicionales con al menos tres piñas de tercer año para completar la secuencia de embolsamiento al final del periodo de desarrollo (Ensayo 1). Un grupo de 10 árboles con al menos tres piñas de primer año se seleccionaron a finales de junio de 2015 y 2016, tras su polinización (Mutke, 2000), para evitar que la bolsa actuase como una barrera dando lugar a una elevada proporción de piñones vanos (Schowalter, 1994) o incluso a la muerte de las piñas de primer año por una alta proporción de semillas no polinizadas (Abellanas, 1990). Las fechas de embolsamiento de los insectos y la piña control se asignaron de forma aleatoria en cada pino. Las piñas control sirvieron como referencia de piñas y piñones sanos (Bates et al., 2002a). En el momento de la selección de las piñas todas fueron embolsadas con malla de polietileno con una luz de 1 x 1 mm. Se asumió que el microclima creado por la bolsa no afecta al rendimiento de las piñas (Strong et al., 2001).

Dos hembras, sexo causante de la mayor proporción de daños (Bates et al., 2000a, 2001, 2002a), fueron embolsadas durante dos semanas con las piñas de tercer y segundo año (Ensayos 1 y 2). La vitalidad de las hembras se revisó semanalmente y aquellas muertas o desaparecidas se sustituyeron. Estas últimas se consideraron muertas (Bates et al., 2002b). Los ensayos de embolsamiento de hembras comenzaron

a mitad de abril, cuando los adultos de *L. occidentalis* comienzan a emerger del estado de letargo invernal para reproducirse (Barta, 2016; Tamburini et al., 2012). Las ninfas (estadios N3 y N4) fueron embolsadas con las piñas de primer año durante una semana (Ensayo 3) a partir del mes de julio, tras la polinización de las piñas de primer año en el banco clonal (Mutke, 2000). No se utilizaron ninfas de primer y segundo estadio porque son considerados los menos dañinos (Strong, 2006).

La mortalidad de las piñas y las posibles señales causadas por la inserción de la probóscide en la superficie de las piñas se revisaron visualmente con una frecuencia semanal durante el verano en el que fueron tratadas. La mortalidad de las piñas tratadas durante su primer o segundo año también fue revisada al comienzo del siguiente o siguientes estadios de desarrollo. Las piñas de primer y segundo se consideraron abortadas cuando se desprendieron de la rama con un ligero toque o cuando las brácteas se tornaron de color grisáceo con un aspecto deprimido. Las piñas de tercer año abortadas se caracterizaron por sus brácteas oscuras y deprimidas, y por su tamaño mucho inferior al del resto de su cohorte (Figura 38).



**Figura 38. Piñas de primer, segundo y tercer año de *Pinus pinea* L. abortadas.** (a) Piña de primer año embolsada con dos hembras del 10 al 24 de abril (izq.) al lado de una piña de tercer año no embolsada con insectos (der.), fotografiada el 21 de mayo. (b) Piña de segundo año embolsada con dos hembras del 7 al 21 de mayo (der.) al lado de una piña de segundo año no embolsada con insectos (izq.), fotografiada el 4 de junio. (c) Piña de primer año embolsada con dos ninfas del 2 al 9 de julio. Piña de primer año sana fotografiada el 9 de julio (izq.) y una semana más tarde abortada (der.). Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

### 3.3.2. Ensayo de exclusión: daños causados por la población de *Leptoglossus occidentalis*

Treinta pinos, con al menos 10 piñas de primer año, fueron seleccionados aleatoriamente tras la polinización de las piñas a finales de junio de 2016. En cada pino,

se embolsaron cinco piñas (piñas protegidas:  $n = 150$ ) y las otras cinco fueron marcadas con una etiqueta (piñas no protegidas:  $n = 150$ ) (Figura 39). La mortalidad de las piñas se revisó en febrero de 2017, al comienzo de su segundo año de desarrollo, en marzo de 2018, al comienzo de su tercer año de desarrollo, y en noviembre de 2018, tras su maduración, cuando se cosecharon. No se estimó la densidad de la población de *L. occidentalis* en la parcela.



**Figura 39. Ensayo de exclusión.** Pinos con cinco piñas embolsadas y cinco expuestas para estimar los daños causados por la población de *L. occidentalis* a lo largo de su desarrollo fenológico. Parcela 15 (B23TORa) del banco clonal “El Molinillo”. Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 3.3.3. Procesado de piñas y piñones

Las piñas maduras se cosecharon a mitad de noviembre de su año correspondiente, es decir, las piñas tratadas durante su tercer año se cosecharon ese mismo noviembre, las tratadas durante su segundo año al siguiente noviembre, y las tratadas durante su primer año en su tercer noviembre de vida.

En todas las piñas cosechadas se buscaron síntomas de *P. validirostris*, *D. mendacella* (Calama et al., 2017) o *S. sapinea* (Tiberi, 2007b). Las piñas sanas fueron individualizadas en una bolsa, identificadas y procesadas en base al protocolo descrito en Calama et al. (2020). El peso fresco de la piña (CFW) fue medido el mismo día de la cosecha, mientras que el peso seco de la piña (CDW) fue medido tras el proceso de

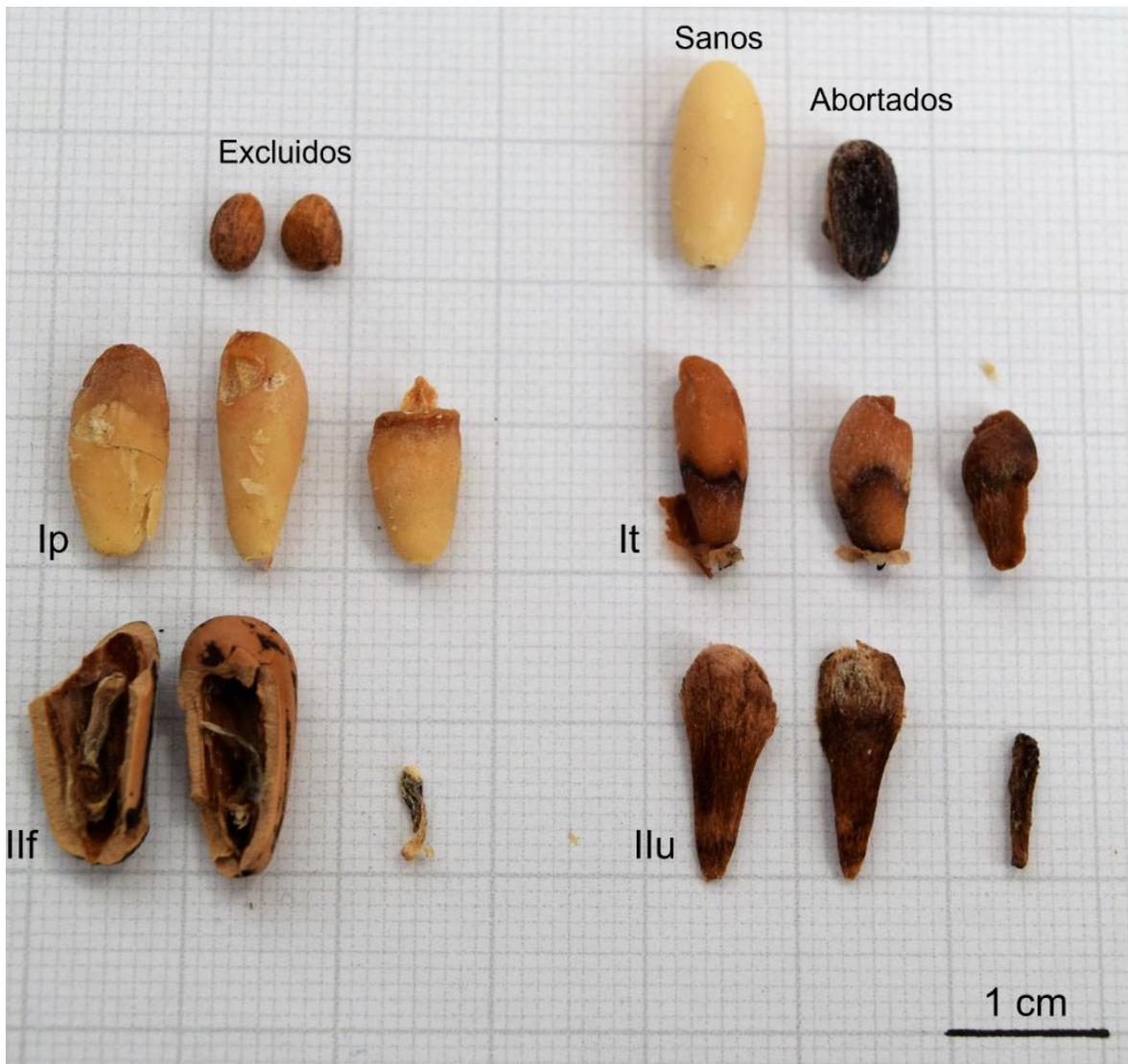
secado (45 °C hasta la apertura completa de las piñas). Las piñas se pesaron con una precisión de 1,0 g. Los piñones fueron extraídos de las piñas manualmente. Aquellos con una longitud menor a los 6 mm, principalmente procedentes de las brácteas basales no fértiles (Abellanas, 1990), fueron eliminados al considerarse no desarrollados por razones ajenas a la alimentación de *L. occidentalis*. El resto de los piñones fueron contabilizados y extraídos de la testa con un cascador manual de frutos secos (Figura 40). Los piñones sanos se pesaron con una precisión de 0,1 g.



**Figura 40. Procesado de piñas y piñones de *Pinus pinea* L.** (a) Piña verde; (b) pesaje de piña seca; (c) piñones extraídos de una piña seca; (d) apertura manual y clasificación de piñones. Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

Los piñones blancos se clasificaron en base a Farinha et al. (2018b) (Figura 29) en las siguientes categorías (Figura 41):

- *Sanos*: comercializables, endospermo no dañado.
- *Abortados*: piñones vanos, sin embrión ni endospermo.
- *Tipo I*: piñones con el embrión sano y el endospermo dañado. Esta categoría se divide en *tipo Ip* o con el endospermo parcialmente dañado; y *tipo It* o con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado.
- *Tipo II*: piñones con el embrión seco y sin endospermo. Esta categoría se divide en *tipo IIf* o con el tegmen totalmente fusionado a la testa; y *tipo IIu* o tegmen no fusionado a la testa, pero deforme.



**Figura 41. Clasificación de piñones.** (Excluidos) piñones con una longitud menor a 6 mm; (Sanos), piñones comercializables, endospermo no dañado; (Abortados) piñones vanos, sin embrión ni endospermo; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado; (Ilf) piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme. Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 3.4. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis*

#### 3.4.1. Prospección de parasitoides de huevos nativos de *Leptoglossus occidentalis*

La prospección de parasitoides de huevos nativos de *L. occidentalis* se realizó durante tres años consecutivos (2017, 2018, 2019) en la parcela 15 del banco clonal y durante un año en la repoblación de *P. pinea* (2019), desde finales de mayo/principios de junio hasta septiembre (Tabla 16).

Los huevos expuestos al parasitismo fueron ovipositados por las hembras de las colonias establecidas en campo. Cada colonia estaba formada por una rama de *P. pinea*, de unos 30 cm de longitud, embolsada con una malla (40 × 30 cm, polietileno, 1 × 1 mm luz) con forma rectangular atada a la rama con un alambre. Las bolsas fueron implementadas con una apertura lateral con Velcro® para facilitar la búsqueda de las puestas. En cada una de las colonias se introdujeron dos hembras y un macho, procedentes de la colonia de laboratorio, y piñones blancos *ad libitum* como fuente de alimento. La rama sirvió como fuente de agua y sustrato de oviposición.

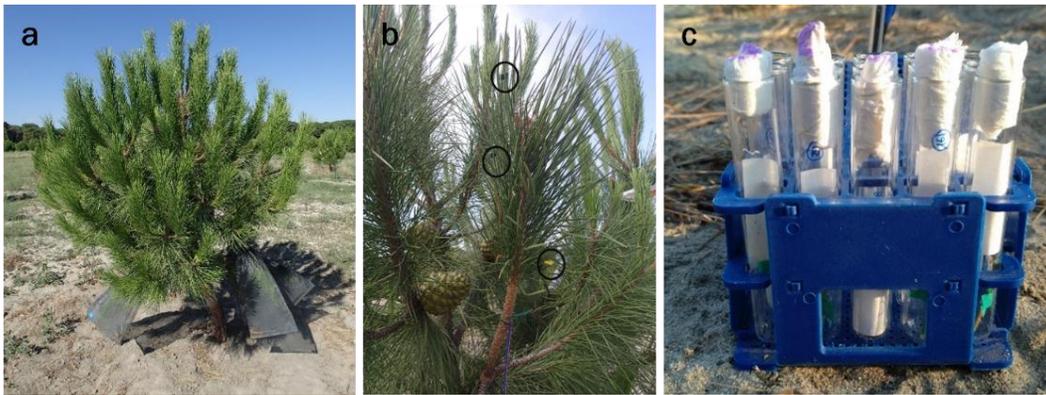
El número de colonias de campo y su fecha de instalación dependió de la disponibilidad de adultos de *L. occidentalis* en la colonia de laboratorio, y varió entre 22 y 40 anualmente (Tabla 16).

**Tabla 16. Colonias de campo.** Número de colonias instaladas por semana (S) y mes en el banco clonal (2017, 2018 y 2019) y en la repoblación (2019) de *P. pinea* para la obtención de huevos de *L. occidentalis* en campo para la prospección de parasitoides de huevos nativos.

Ensayo	Mayo				Junio				Julio				Agosto					Total
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S5	
Banco clonal 2017					10				10			10			10			40
Banco clonal 2018			2			4		1			1	3	5	5	5			26
Banco clonal 2019			5	5														10
Repoblación 2019				3	2	5		1			1							12
<b>Total/ mes</b>		<b>10</b>				<b>28</b>				<b>25</b>					<b>25</b>			<b>88</b>

Las colonias se revisaron semanalmente. Los adultos muertos se sustituyeron y las ramas con puestas se desembolsaron para evitar que la malla actuase como una

barrera para los parasitoides. Las colonias retiradas de las ramas con puestas se instalaron en otra rama del mismo pino. Las puestas se expusieron al parasitismo durante una semana, entonces se individualizaron en tubos de ensayo (1,5 cm diam., 10 cm long.) tapados con papel o algodón (Figura 42) y se trasladaron al laboratorio donde se mantuvieron en condiciones estándar y fotoperiodo natural. Los parasitoides encontrados sobre las puestas se capturaron para su identificación. Las ninfas emergidas se añadieron a la colonia de laboratorio.

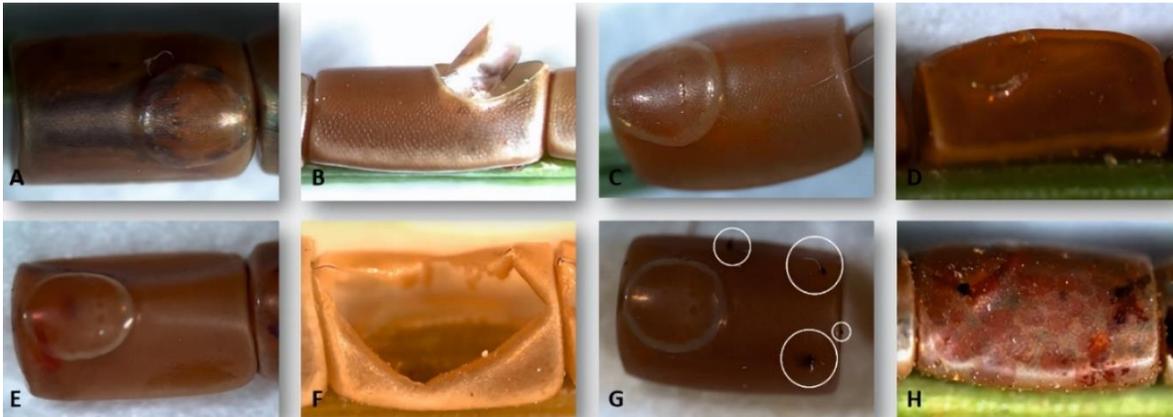


**Figura 42. Prospección de parasitoides nativos de huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Pino con colonias formadas por dos hembras y un macho para la obtención de puestas en campo; (b) rama con puestas expuestas al parasitismo; (c) puestas recolectadas tras una semana de exposición al parasitismo en campo. Autoría: Ponce-Herrero, L.

Cada huevo se codificó y categorizó individualmente con un estereomicroscopio (Nikon SMZ 745T) (Figura 43) en las siguientes categorías:

- **Huevos fértiles:** corion liso de color marrón claro cuando son recientes y de color marrón rojizo más intenso en función del desarrollo de la ninfa. Los huevos eclosionados se incluyeron en esta categoría.
- **Huevos no fértiles:** corion seco/deshidratado o colapsado y de color amarillo pálido por la ausencia de la ninfa en desarrollo.
- **Huevos abortados:** color rojo intenso y, en algunos casos con puntos rojos, líneas o el cadáver de la ninfa.
- **Huevos depredados:** ausencia de lumen y corion parcial o totalmente mordisqueado.

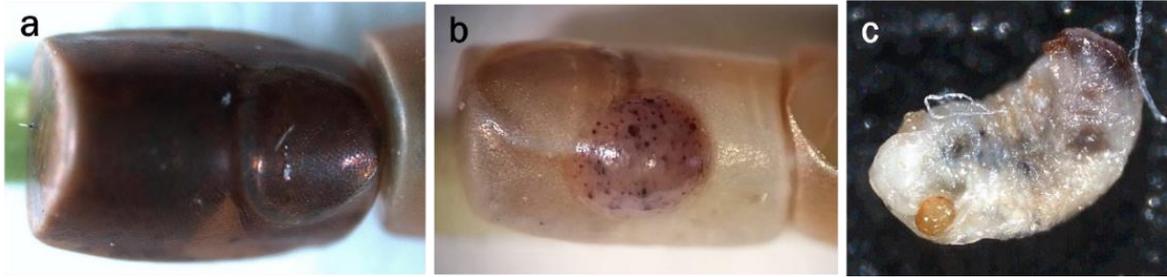
- Huevos parasitados: color ceniciento y presencia de pedúnculos o stalks sobre el corion, es decir, tubos que conectan el ovipositor del parasitoide con el lumen del huevo hospedante (Maple, 1947). En función del desarrollo del parasitoide se distinguen puntos y líneas negras y/o detritus bajo el corion.



**Figura 43. Categorización de los huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann de las puestas expuestas al parasitismo en campo.** (A) Huevo fértil sin emergencia de ninfa; (B) huevo fértil tras emergencia de la ninfa; (C) huevo no fértil; (D) huevo no fértil y deshidratado; (E) huevo abortado; (F) huevo depredado (G) huevo parasitado con stalks (círculos blancos); (H) huevo parasitado con detritus y puntos negros bajo el corion. Autoría: Ponce-Herrero, L.

Para la identificación de las especies de parasitoides se envió una muestra al Museo de Historia Natural de Londres y el resto se identificaron y sexaron con un estereomicroscopio (Nikon SMZ 745T) en base a las indicaciones dadas por el Museo y las claves de Mercet (1921).

Los huevos parasitados sin orificios de salida de parasitoides se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio y luz natural durante 45 días para comprobar si los parasitoides se encontraban en estado de diapausa (Anderson y Kaya, 1974). Tras este periodo, los huevos se diseccionaron y categorizaron en las siguientes categorías: huevos parasitados sin desarrollo larvario, pero con una masa translúcida y granular (Maple, 1947), larva o parasitoide abortados (Figura 44).



**Figura 44. Huevos parasitados de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann no eclosionados.** (a) Huevo parasitado no eclosionado; (b) disección de huevo con masa translúcida y granular; (c) larva abortada. Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 3.4.2. Monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis*

La población de *L. occidentalis* se monitoreó de forma visual en las parcelas 15, 19 y 20 del banco clonal durante dos años consecutivos y con una frecuencia semanal, desde principios de junio hasta finales de octubre en 2018 y desde mediados de mayo hasta finales de septiembre en 2019. El monitoreo consistió en la inspección visual de las piñas y ramas bajas (max. 2 m altura) de todos los pinos, excepto aquellos utilizados en los ensayos de parasitismo (2018: 274 pinos; 2019: 280 pinos). Las ninfas se clasificaron según su estadio, los adultos se sexaron y los huevos de las puestas de la población de campo (Figura 54) se categorizaron y mantuvieron en laboratorio hasta la emergencia de los parasitoides o las ninfas, como se ha explicado previamente.

## 3.5. Evaluación de *Ooencyrtus obscurus* como enemigo natural de *Leptoglossus occidentalis* en laboratorio

### 3.5.1. Colonia de laboratorio de *Ooencyrtus obscurus*

La colonia de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) (Hymenoptera: Encyrtidae) se estableció a partir de los parasitoides emergidos de las puestas parasitadas en campo durante los ensayos de prospección de parasitoides de huevos nativos de *L. occidentalis* desarrollados en el banco clonal y en la repoblación de *P. pinea* en el año 2019. Como se ha indicado en el Epígrafe 3.4.1., las puestas parasitadas en campo se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio y fotoperiodo natural hasta la emergencia de los parasitoides, parámetro comprobado a diario.

Los parasitoides identificados como *O. obscurus*, según lo indicado en el Epígrafe 3.4.1., se individualizaron en tubos de ensayo (1,5 cm diam., 10 cm long.) cerrados con un tapón de papel y se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio y fotoperiodo natural (Figura 45a). Como fuente de alimento se proporcionó una capa fina de miel pura (Sabbatini Peverieri et al., 2012) colocada sobre la superficie interior del tubo de ensayo o sobre un papel secante. Todos los parasitoides emergidos de los ensayos de parasitismo de laboratorio se añadieron a la colonia.

Las puestas de *L. occidentalis* utilizadas en los ensayos de parasitismo se obtuvieron de la colonia del laboratorio. Las puestas, incluidas las acículas de pino, se recogieron a diario y, aquellas no utilizadas el mismo día de la recolección fueron almacenadas en tubos de ensayo (1,5 cm diam., 10 cm long.) cerrados con un tapón de plástico (Figura 45b) y mantenidas en frío ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) hasta un máximo de 7 días (Binazzi et al., 2013).

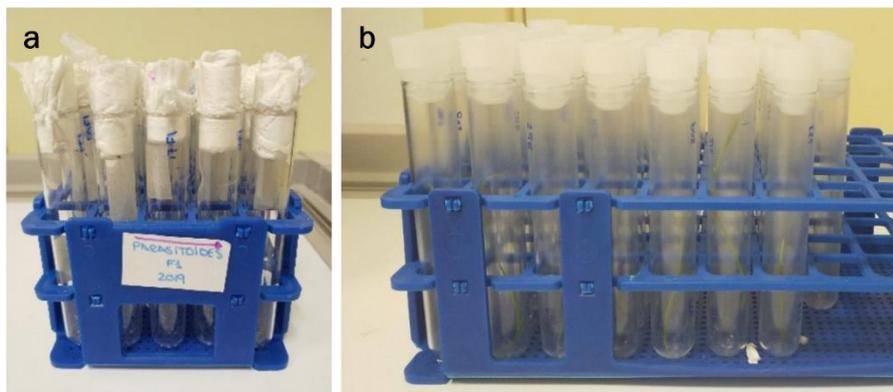


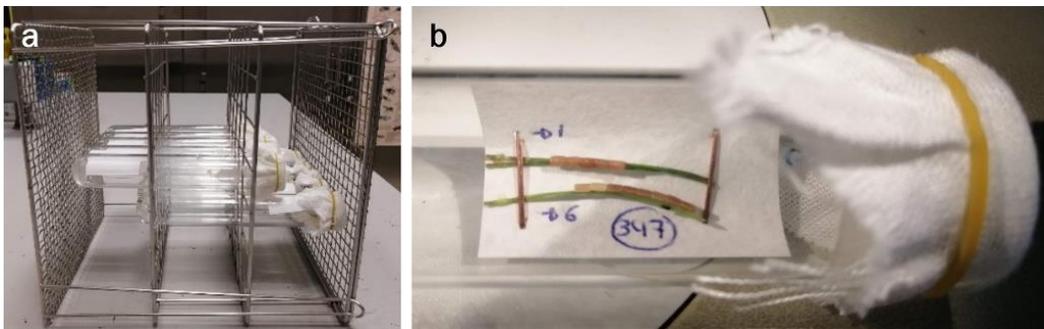
Figura 45. Colonia de parasitoides de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. (a) Parte de la colonia de *O. obscurus*; (b) huevos de *L. occidentalis* almacenados en frío. Autoría: Ponce-Herrero, L.

### 3.5.2. Diseño experimental

Se diseñaron dos ensayos previos para obtener información básica sobre el comportamiento reproductivo de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis*. En el Primer ensayo se determinó el efecto del tamaño de la puesta de *L. occidentalis* en el porcentaje de parasitismo de *O. obscurus*, la ratio de emergencia y la sex ratio (% hembras) de su progenie, mientras que en el Segundo ensayo se definió la estrategia de reproducción de *O. obscurus*. El Tercer ensayo se diseñó en base a los resultados obtenidos en los dos anteriores (número de huevos expuestos y hembra apareada o no)

para definir la fecundidad de las hembras a lo largo de su vida, los parámetros de la tabla de vida y los parámetros demográficos de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis*. Adicionalmente, se realizó el seguimiento diario de la apariencia externa de los huevos parasitados a lo largo de su desarrollo (Figura 58).

**Condiciones generales de los ensayos:** los ensayos se desarrollaron en condiciones estándar de laboratorio (Martel et al., 2019) y luz blanca (16:8; L:O) con parasitoides emergidos durante las 24 h anteriores (Sabbatini Peverieri et al., 2012). Las acículas de pino con las puestas de *L. occidentalis* (con un máximo de 7 días, Binazzi et al., 2013) se graparon en un trozo de papel secante (Bates y Borden, 2004) y se introdujeron en tubos de ensayo (2,5 cm diam., 10 cm long.) cerrados con muselina de algodón con una de luz de 1 × 1 mm (Figura 46). Como fuente de alimento se ofreció miel pura, siguiendo la misma metodología utilizada que en la colonia de *O. obscurus*.



**Figura 46.** Ensayos de parasitismo de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. (a) Desarrollo de los ensayos de parasitismo en condiciones estándar de laboratorio; (b) detalle de las puestas de *L. occidentalis* sobre las acículas grapadas a un trozo de papel secante dentro del tubo de ensayo. Autoría: Ponce-Herrero, L.

**Primer ensayo. Efecto del tamaño de la puesta de *L. occidentalis*:** grupos de 5 - 9 huevos (parejas = 30; huevos = 212) y 10 - 13 huevos (parejas = 30; huevos = 306) se expusieron al parasitismo de una pareja de *O. obscurus* durante 96 horas.

**Segundo ensayo. Estrategia de reproducción de *O. obscurus*:** grupos de 5 - 14 huevo (n = 281) se expusieron al parasitismo de una hembra de *L. occidentalis* (n = 30) sin contacto previo con machos (no emergidos de forma simultánea) durante 96 horas. La *sex ratio* (% hembras) de la progenie se comparó con la de la progenie de las hembras apareadas del Primer ensayo.

**Tercer ensayo.** Fecundidad de las hembras de *O. obscurus* a lo largo de su vida, parámetros de la tabla de vida y parámetros demográficos: grupos de 5 a 15 huevos ( $n = 6.430$ ) se expusieron al parasitismo de una pareja *O. obscurus* ( $n = 40$ ) durante 48 - 72 h (Tunca et al., 2019), siendo reemplazados hasta la muerte de la hembra. Los machos muertos se sustituyeron (Sabbatini Peverieri et al., 2012).

**Detección del parasitismo:** durante el tiempo de exposición de los huevos al parasitismo (Figura 47) el número de huevos parasitados y el número de stalks de cada huevo parasitado (Figura 43G) se contabilizó a diario con un estereomicroscopio (Nikon SMZ 745T). Para describir la progresión de los síntomas (stalks, puntos y/o líneas negras y detritus bajo el corion) de los huevos parasitados, se definió a diario su apariencia externa, desde la detección del primer stalk hasta la emergencia de los parasitoides. La emergencia de parasitoides también se comprobó a diario (Figura 48).

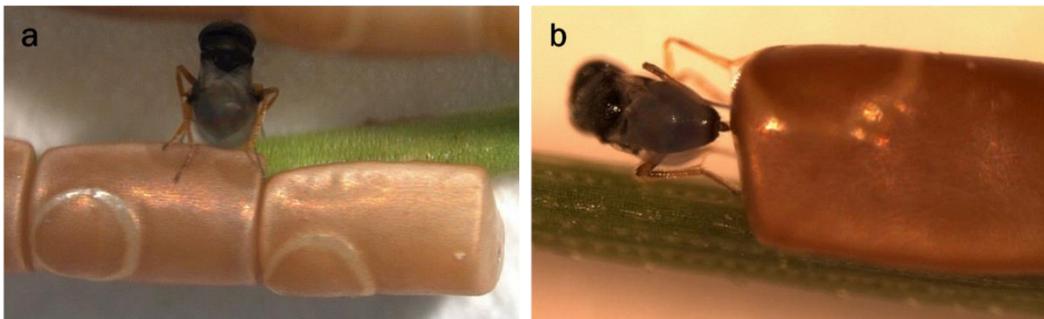


Figura 47. Hembras de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) parasitando huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Autoría: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.



Figura 48. Huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann parasitados y dos *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) emergidos. Autoría: Ponce-Herrero, L.

Las ninfas de *L. occidentalis* eclosionadas de los huevos no parasitados en los ensayos de parasitismo se añadieron a la colonia de laboratorio. Los huevos parasitados sin orificios de salida de parasitoides se diseccionaron y clasificaron según lo descrito en el Epígrafe 3.4.1 (Figura 44).

### 3.6. Análisis de datos

Todos los análisis se analizaron con el programa SAS 9.4 de SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (<http://www.sas.com>, Statistical Analysis System, RRID:SCR\_008567).

#### 3.6.1. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de *Pinus pinea* causados por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis*

La *supervivencia* de las hembras se calculó como la media de hembras vivas durante las dos semanas de embolsamiento (Ensayos 1 y 2), mientras que la *supervivencia* de las ninfas se calculó como la media de las ninfas vivas durante la única semana de embolsamiento (Ensayo 3). En ambos casos se expresó en porcentaje por fecha de embolsamiento y ensayo.

La *mortalidad de las piñas* se calculó como el cociente entre el número de piñas abortadas y el total de piñas, expresado en porcentaje, por fecha de embolsamiento y ensayo. Este parámetro se analizó utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución binaria de la variable respuesta y función de enlace logit para la probabilidad del aborto de las piñas en los Ensayos 1, 2 y 3. Las piñas fueron la unidad experimental, los pinos se consideraron un factor aleatorio y las fechas de embolsamiento se consideraron factores inter-sujeto. La *mortalidad* de las piñas del Ensayo de exclusión se analizó utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con función de enlace logit y distribución binomial de la variable respuesta de parámetro cinco para la probabilidad del aborto de cada piña, por edad (año 1, año 2, año 3, viva), dentro de cada grupo de cinco piñas seleccionadas por pino para cada tratamiento (protegidas/no protegidas) como parámetro a estimar. La unidad experimental fueron los pinos, mientras que el tratamiento y la edad de aborto se consideraron factores intra-sujeto.

El *número de piñones* se expresó como la media del número de piñones con testa por piña y por fecha de embolsamiento en los Ensayos 1, 2 y 3 o por tratamiento en el Ensayo de exclusión.

El *rendimiento de piñón blanco por piña* ( $\rho$ ), simplificado como *rendimiento*, se calculó como la media del *rendimiento final de piñón blanco por piña fresca*, para cada fecha

de embolsamiento (Ensayos 1, 2 y 3) o tratamiento (Ensayo de exclusión), utilizando la Ecuación (I).

$$(I) \quad \rho = (SCW/CFW^*) \cdot 100$$

Dónde  $SCW$  = peso de los piñones sanos (g);  $CFW^*$  = peso fresco de la piña estandarizado (g), estimado mediante la Ecuación (II) como el peso de la piña al 37,0% de humedad relativa (humedad ambiental estimada durante la cosecha en noviembre) (Calama et al., 2020).

$$(I) \quad CFW^* = CFW \cdot [(1 - H)/0,63]$$

Dónde  $CFW$  = peso fresco de la piña (g);  $H$  = humedad definida mediante la Ecuación (III).

$$(II) \quad H = (CFW - CDW)/CFW$$

Dónde  $CDW$  = peso seco de la piña (g).

El *número de piñones* y el *rendimiento* se analizaron utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución gaussiana de la variable respuesta y función de enlace identity, siendo el número de piñones o el rendimiento los parámetros a estimar. Las piñas vivas fueron la unidad experimental, los pinos se consideraron factores aleatorios y las fechas de embolsamiento (Ensayos 1, 2 y 3) o tratamientos (Ensayo de exclusión) se consideraron factores inter-sujeto.

El *porcentaje de piñones* de cada tipo se calculó como la media (intervalo de confianza del 95%) por fecha de embolsamiento (Ensayos 1, 2 y 3) o tratamiento (Ensayo de exclusión) del cociente entre el número de piñones de cada tipo y el total de piñones por piña. El *porcentaje de piñones* de cada tipo se analizó utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con función de enlace logit y distribución binomial de la variable respuesta. El número de piñones de cada tipo fue variable para cada piña y la probabilidad de ocurrencia de cada tipo de daño dentro de cada piña fue el parámetro a estimar. Las piñas vivas fueron la unidad experimental, los pinos se consideraron un factor aleatorio, los tipos de daños por piña factores intra-sujeto y las fechas de embolsamiento (Ensayos 1, 2 y 3) o los tratamientos (Ensayo de exclusión) se consideraron factores inter-sujeto.

### 3.6.2. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis*

Las puestas expuestas al parasitismo en campo se clasificaron en parasitadas y no parasitadas, y los huevos se agruparon en las siguientes categorías por semana y ensayo:

- No eclosionados: no fértiles y abortados.
- Viables: fértiles y parasitados.
- Huevos no viables: no eclosionados y depredados.

Las puestas y huevos parasitados se clasificaron por especie. Los huevos parasitados sin orificios de salida de parasitoides fueron clasificados en función de la especie que emergió del resto de huevo/s de la puesta. En ningún caso emergieron especies diferentes de una misma puesta.

El impacto de los parasitoides en la población de *L. occidentalis* se estimó mediante el cálculo de cuatro índices expresados en porcentaje por especie y ensayo (Colazza y Bin, 1995; Costi et al., 2018):

- I. Índice de eficiencia de descubrimiento: cociente entre el número de puestas parasitadas y el número total de puestas.
- II. Porcentaje de parasitismo: cociente entre el número de huevos parasitados y el número total de huevos.
- III. Índice de eficiencia de explotación de las puestas: cociente entre el número de huevos parasitados y el número total de huevos de las puestas parasitadas.
- IV. Impacto sobre la población plaga (modificado): cociente entre el número de huevos parasitados y el número de huevos viables (fértiles y parasitados), es decir, capaces de generar progenie de *L. occidentalis*.

Estos índices se analizaron con un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución binomial de la variable respuesta y función de enlace logit con sintaxis eventos/ensayos. Las unidades experimentales fueron las puestas para los índices I, II y IV, y las puestas parasitadas para el índice III. La especie se consideró un factor intra-

sujeto y los ensayos (Banco clonal 2017, Banco clonal 2018, Banco clonal 2019 y Repoblación 2019) se consideraron factores inter-sujetos. Para la comparación entre especies y ensayos se utilizó la prueba “t” de Student con nivel de significación 0,05. En los modelos se utilizó una matriz de covarianza aleatoria no estructurada (UN). Para contrastar los efectos principales y el efecto de interacción del modelo se utilizaron los tests chi-cuadrado de Wald.

La *sex ratio* (machos:hembras) de los parasitoides se calculó como el cociente entre el número de hembras y machos por especie y ensayo.

La *ratio de emergencia* se calculó como el cociente entre el total de parasitoides emergidos y el número de huevos parasitados con orificios de salida de parasitoides por especie y ensayo. Este parámetro se analizó utilizando un modelo lineal mixto (MIXED), considerando los ensayos como factores inter-sujetos y las especies como factores intra-sujetos. El modelo utilizó una estructura de simetría compuesta (CS) de la varianza. Para analizar las comparaciones se utilizó la prueba “t” de Student con un nivel de significación de 0,05.

La *proporción de huevos no eclosionados y depredados* se calculó respecto al número total de huevos por ensayo expresado en porcentaje. Estos parámetros se analizaron utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución binomial de la variable respuesta y función de enlace logit con sintaxis eventos/ensayos. Solamente se consideró el ensayo como factor. Para analizar las comparaciones se utilizó la prueba “t” de Student con un nivel de significación de 0,05.

### 3.6.3. Evaluación de *Ooencyrtus obscurus* como enemigo natural de *Leptoglossus occidentalis* en laboratorio

En todos los ensayos se descartaron las hembras no fértiles (Martel et al., 2019) y se calcularon los siguientes parámetros:

- *Porcentaje de parasitismo*: media  $\pm$  SE del cociente entre el número de huevos parasitados y el total de huevos expuestos a cada hembra, expresado en porcentaje.
- *Fecundidad*: progenie de una hembra.

- *Supervivencia de los estadios pre-imaginales*: cociente entre el número de huevos parasitados con orificios de salida de parasitoides y el número total de huevos parasitados, expresado en porcentaje.
- *Ratio de emergencia*: cociente entre la progenie y el número de huevos parasitados con orificios salida de parasitoides.
- *Sex ratio (% hembras)*: cociente entre el número de hembras y el total de la progenie expresado en porcentaje.

**Primer ensayo. Efecto del tamaño de la puesta de *L. occidentalis***: el efecto del tamaño de la puesta en el *porcentaje de parasitismo* se estimó con un análisis de regresión utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución binomial de la variable respuesta y función de enlace logit. Los huevos parasitados fueron la unidad experimental.

La relación entre la progenie y el número de huevos parasitados con orificios de salida de parasitoides se analizó con un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución de Poisson de la variable respuesta y función de enlace log link.

El efecto del tamaño de la puesta en la *sex ratio (% hembras)* de la progenie se midió con un análisis de regresión utilizando un modelo lineal mixto generalizado (GLIMMIX) con distribución gaussiana de la variable respuesta y función de enlace logit. Los huevos parasitados fueron la unidad experimental.

**Tercer ensayo. Fecundidad de las hembras de *O. obscurus* a lo largo de su vida, parámetros de la tabla de vida y parámetros demográficos**: los parámetros de la tabla de vida se definen a continuación:

- *Longevidad*: número de días de vida o periodo transcurrido desde la emergencia de la hembra hasta su muerte, medido en días.
- *Periodo de pre-oviposición*: periodo transcurrido desde la emergencia de la hembra hasta que ovipositó la primera puesta, medido en días.
- *Periodo de oviposición*: periodo transcurrido entre la primera y la última puesta, medido en días.

- *Periodo post-reproductivo*: periodo transcurrido desde que la hembra ovipositó la última puesta hasta su muerte, medido en días.
- *Fecundidad*: definido previamente.
- *Fertilidad*: número de huevos ovipositados por una hembra. Se consideró que las hembras de *O. obscurus* ovipositaron un huevo por cada stalk detectado sobre la superficie de los huevos de *L. occidentalis* (Tracy y Nechols, 1987).
- *Progenie abortada*: progenie no emergida por hembra o diferencia entre la *fecundidad* y la *fertilidad*.
- *Ratio de emergencia*: definido previamente.
- *Periodo de desarrollo pre-imaginal*: periodo transcurrido desde la detección del stalk hasta la emergencia de los parasitoides, medido en días.
- *Sex ratio (% hembras)*: definido previamente.

El *periodo de desarrollo pre-imaginal* se definió para cada sexo y se comparó con una prueba “t” de Student con un nivel de significación del 0,05.

La relación entre la edad de las hembras y la *sex ratio (% hembras)* se definió con un modelo mixto de regresión lineal.

La fecundidad a lo largo de la vida de las hembras se definió de forma experimental mediante el registro diario de su mortalidad y *fecundidad* (media  $\pm$  SE).

El *índice de ovigenia* se calculó como la media ( $\pm$  SE) de la fracción de los huevos ovipositados durante las primeras 24 horas de vida de las hembras (Jervis et al., 2001).

La relación entre la *fecundidad* y la *longevidad* de las hembras se definió con modelo mixto de regresión lineal.

La *esperanza de vida* de las hembras se definió como el día en el que el 50,0% de las hembras seguían vivas.

Los parámetros demográficos se definieron de acuerdo con Sabbatini Peverieri et al. (2012) y Jervis et al. (2007):

- Tasa intrínseca de crecimiento (hembras/hembra/día):  $r_m = \ln(\sum l_x \cdot m_x)/T$

- Capacidad finita de incremento (hembras/hembra/día):  $\lambda = e^{rm}$
- Duración media de una generación (días):  $T = \sum x \cdot l_x \cdot m_x / R_0$
- Tiempo de duplicación de la población (días):  $T_d = (\ln 2) / r_m$
- Tasa neta de reproducción (hembras/hembra/generación):  $R_0 = \sum l_x \cdot m_x$
- Tasa bruta de reproducción (hembras/hembra/generación):  $GRR = \sum m_x$

Dónde  $x$  = edad de las hembras en días,  $l_x$  = ratio de supervivencia de las hembras a una edad específica y  $m_x$  = fecundidad de las hembras a una edad específica, fueron medidos de forma experimental.

La evolución de la apariencia externa de los huevos parasitados se estimó calculando el número medio ( $\pm$  SE) de días transcurridos entre la aparición de los diferentes síntomas relacionados con el parasitismo.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización y cuantificación de los daños de piñas y piñones de *Pinus pinea* causados por la alimentación de *Leptoglossus occidentalis*

No se encontraron marcas asociadas con la alimentación de *L. occidentalis* cuando se comparó la superficie de las piñas embolsadas con ninfas o adultos con la superficie de las piñas control. Ninguna de las piñas mostró síntomas de *S. sapinea* o *P. validirostris*. Cuatro piñas protegidas y una no protegida se eliminaron del Ensayo de exclusión por presentar síntomas de *D. mendacella*.

#### 4.1.1. Embolsamiento de piñas con *Leptoglossus occidentalis*: daños estacionales

**Ensayo 1. Piñas de tercer embolsadas con hembras:** los valores medios de mortalidad (%) y rendimiento (%) de las piñas se representan en la Figura 49 (a y b), y el número de piñones y porcentaje por tipo de piñones se recogen en la Tabla 17.

Los daños causados por la alimentación de las hembras se redujeron con el avance del desarrollo de las piñas de tercer año (Figura 50). Solo se registró *mortalidad* en las piñas de tercer año embolsadas con hembras desde principios de abril hasta principios de junio.

El menor *rendimiento* también fue registrado durante este periodo, aunque fue significativamente menor en las piñas embolsadas con hembras hasta septiembre en comparación con los controles (control vs. 10 - 24 abril:  $p\text{-valor} = 0,0083$  con  $t\text{-valor} = 2,72$ ; control vs. 24 abril - 7 mayo:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 6,52$ ; control vs. 7 - 21 mayo:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 10,47$ ; control vs. 21 mayo - 4 junio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 7,56$ ; control vs. 4 - 18 junio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 5,83$ ; control vs. 18 junio - 2 julio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 6,30$ ; control vs. 2 - 16 julio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 6,03$ ; control vs. 16 - 30 julio:  $p\text{-valor} = 0,0058$  con  $t\text{-valor} = 2,85$ ; control vs. 4 - 18 agosto:  $p\text{-valor} = 0,0096$  con  $t\text{-valor} = 2,67$ ). El número de *piñones* por piña fue significativamente menor respecto a los controles en las piñas embolsadas con hembras a principios de agosto (control vs. 4 - 18 agosto:  $p\text{-valor} = 0,0050$  con  $t\text{-valor} = 2,90$ ) y abril (control vs. 10 - 24 abril:  $p\text{-valor} = 0,0366$  con  $t\text{-valor} = 2,13$ ; control vs. 24 abril - 7 mayo:  $p\text{-valor} = 0,0258$  con  $t\text{-valor} = 2,28$ ), sin embargo, en la última fecha indicada solamente sobrevivió una piña.

La proporción de *piñones sanos* fue significativamente menor respecto a los controles cuando las piñas se embolsaron con hembras desde abril hasta finales de julio (control vs. 24 abril - 7 mayo:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 4,67$ ; control vs. 7 - 21 mayo:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 5,45$ ; control vs. 21 mayo - 4 junio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 5,61$ ; control vs. 4 - 18 junio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 4,90$ ; control vs. 18 junio - 2 julio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 6,49$ ; control vs. 2 - 16 julio:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 4,80$ ; control vs. 16 - 30 julio:  $p\text{-valor} = 0,0016$  con  $t\text{-valor} = 3,17$ ), cuando se incrementó gradualmente con el avance del desarrollo de las piñas.

Excepto para las fechas de embolsamiento 4 - 18 junio y 2 - 16 julio, cuando los principales daños fueron de tipo If y Ilu, respectivamente, el tipo de daño predominante fueron los *piñones abortados*, siendo su proporción significativamente mayor respecto a los controles en las piñas embolsadas con hembras desde abril hasta principios de julio (control vs. 10 - 24 abril:  $p\text{-valor} = 0,0404$  con  $t\text{-valor} = -2,05$ ; control vs. 24 abril -

7 mayo:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -5,07; control vs. 7 - 21 mayo:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -6,05; control vs. 21 mayo - 4 junio:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -5,48; control vs. 18 junio - 2 julio:  $p$ -valor = 0,0031 con  $t$ -valor = -2,98), excepto para las piñas embolsadas entre el 18 de junio y el 4 de julio. En junio, el porcentaje de piñones *tipo If* fue significativamente mayor en las piñas embolsadas con hembras que en los controles (control vs. 4 - 18 junio:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -6,24; control vs. 18 junio - 2 julio:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -5,44). En julio, se registró la mayor proporción de piñones *tipo Ilu*, siendo significativamente diferente respecto a los controles (control vs. 2 - 16 julio:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -7,80; control vs. 16 - 30 julio:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -4,71). Finalmente, la proporción de piñones *tipo It* fue significativamente mayor en las piñas embolsadas con hembras desde mediados de junio hasta mediados de agosto que en los controles (control vs. 18 junio - 2 julio:  $p$ -valor = 0,0053 con  $t$ -valor = -2,80; control vs. 2 - 16 julio:  $p$ -valor = 0,0022 con  $t$ -valor = -3,08; control vs. 16 - 30 julio:  $p$ -valor = 0,0068 con  $t$ -valor = -2,71; control vs. 4 - 18 agosto:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -4,00).

**Ensayo 2. Piñas de segundo año embolsadas con hembras:** los valores medios de *mortalidad (%)* y *rendimiento (%)* de las piñas se representan en la Figura 49 (c y d), y el *número de piñones* y porcentaje por *tipo de piñones* se recogen en la Tabla 18.

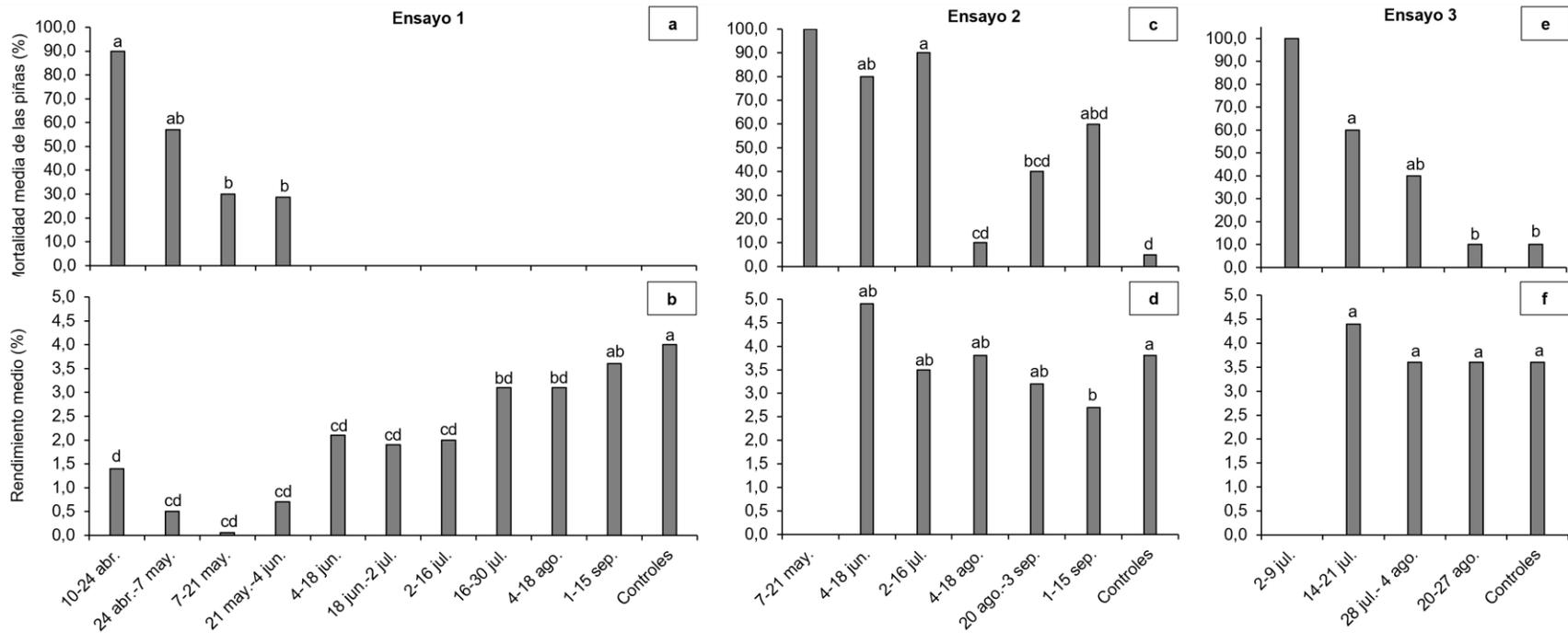
Tres piñas embolsadas con hembras del 24 de abril al 7 de mayo y del 21 de mayo al 4 de junio se cosecharon prematuramente para otro ensayo no incluido en este documento.

La *mortalidad* de las piñas fue el mayor daño causado por la alimentación de las hembras en las piñas de segundo año. El *rendimiento* de las piñas embolsadas con hembras fue significativamente menor respecto al de los controles a principios de septiembre ( $p$ -valor = 0,0258 con  $t$ -valor = -2,47), mientras que el *número de piñones* y piñones sanos no fue significativamente diferente al de los controles en ninguna de las fechas de embolsamiento. El porcentaje de piñones *abortados* fue significativamente mayor respecto a los controles en las piñas embolsadas con hembras desde principios de agosto hasta principios de septiembre (control vs. 4 - 18 agosto:  $p$ -valor  $< 0,0001$  con  $t$ -valor = -3,46; control vs. 1 - 15 septiembre:  $p$ -valor = 0,0280 con  $t$ -valor = -2,21).

Las diferencias significativas de los daños *tipo lp* entre las piñas embolsadas en junio y los controles no se consideran consistentes porque solamente sobrevivieron dos piñas.

**Ensayo 3. Piñas de primer año embolsadas con ninfas:** los valores medios de *mortalidad (%)* y *rendimiento (%)* de las piñas se representan en la Figura 49 (e y f), y el *número de piñones* y porcentaje por *tipo de piñones* se recogen en la Tabla 19.

La *mortalidad* de las piñas fue el principal daño causado por la alimentación de las ninfas las piñas de primer año. Este tipo de daño se redujo con el desarrollo de las piñas. El porcentaje de piñones *abortados* fue significativamente mayor respecto a los controles en las piñas embolsadas con hembras a principios de septiembre (*p-valor* = 0,0323 con *t-valor* = -2,16). En las piñas embolsadas con ninfas a finales de julio, el porcentaje medio de piñones *tipo IIf* (*p-valor* = 0,0121 con *t-valor* = 2,54) y *tipo It* (*p-valor* = 0,0088 con *t-valor* = 2,65) fue significativamente mayor respecto a los controles.



**Figura 49. Mortalidad y rendimiento de las piñas.** Mortalidad media de las piñas (%) y rendimiento medio de las piñas (%). (a) (b) Ensayo 1. Piñas de tercero embolsada con hembras; (c) (d) Ensayo 2. Piñas de segundo embolsadas con hembras; (e) (f) Ensayo 3. Piñas de primero embolsadas con ninfas. Las columnas en la misma gráfica con la misma letra no son significativamente diferentes (t-test;  $p$ -valor < 0,05).

**Tabla 17. Piñas de tercer año embolsadas con hembras.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (If) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test; *p*-valor < 0,05).

Fecha embolsamiento (n=piñas)	Número de piñones	Tipo de piñones					
		Abortados	If	Ilu	It	Ip	Sanos
10-24 abr. (n=10)	51,0 (9,9; 93,5) d	70,5 (16,7; 96,6) abc	0,0	2,0 (0,0; 76,5) abcdef	0,0	0,0	27,5 (3,6; 79,5) abcde
24 abr.-7 may. (n=7)	98,6 (73,9; 123,3) b	85,5 (61,7; 95,6) ab	0,0	2,0 (0,2; 13,6) cdef	0,0	0,0	12,5 (3,9; 33,8) e
7-21 may. (n=10)	76,8 (60,1; 93,5) abd	93,2 (78,0; 98,2) a	0,7 (0,0; 0,1) e	1,1 (0,1; 7,9) def	0,0	0,2 (0,0; 14,0) a	4,8 (1,2; 17,9) e
21 may.-4 jun. (n=7)	89,9 (70,4; 109,4) abcd	68,5 (49,3; 82,9) b	10,0 (4,6; 20,3) ce	0,9 (0,1; 10,0) f	0,2 (0,0; 5,4) abc	3,8 (1,3; 10,6) a	16,6 (7,4; 33,4) e
4-18 jun. (n=10)	94,6 (80,3; 108,8) abcd	16,0 (8,6; 27,8) de	37,5 (29,5; 45,0) a	1,0 (0,2; 4,9) ef	0,5 (0,1; 2,2) bc	1,7 (0,6; 5,1) a	43,3 (32,1; 55,3) cd
18 jun.-2 jul. (n=10)	102,9 (88,6; 117,2) abcd	32,8 (22,1; 45,6) c	24,7 (18,1; 32,7) b	6,1 (3,3; 11,2) cdf	2,1 (1,0; 4,2) ab	3,5 (1,6; 7,2) a	30,8 (21,2; 42,5) de
2-16 jul. (n=10)	92,3 (78,0; 106,5) a	17,4 (9,6; 29,6) cde	2,3 (0,7; 7,0) de	32,0 (24,9; 40,0) a	2,4 (1,2; 4,7) ab	2,1 (0,8; 5,6) a	43,8 (32,4; 55,8) cd
16-30 jul. (n=10)	102,1 (87,8; 116,4) a	20,8 (12,3; 33,0) cde	0,5 (0,0; 5,3) de	17,8 (12,5; 24,7) b	2,0 (1,0; 4,1) ab	2,6 (1,1; 6,1) a	56,3 (44,5; 67,4) bc
4-18 ago. (n=10)	74,7 (60,5; 89,0) c	13,9 (6,4; 27,6) e	1,5 (0,3; 7,3) de	9,0 (4,9; 15,9) cf	4,0 (2,2; 7,1) a	4,1 (1,8; 9,0) a	67,5 (53,7; 79,9) ab
1-15 sept. (n=10)	97,3 (83,1; 111,6) ab	10,7 (4,9; 21,8) e	0,8 (0,1; 5,4) de	9,1 (5,4; 14,9) cf	1,0 (0,4; 2,9) abc	4,5 (2,3; 8,7) a	73,9 (62,5; 83,0) a
Controles (n=30)	96,7 (88,1; 105,3) a	14,7 (10,2; 20,9) e	0,4 (0,1; 2,0) de	4,9 (3,2; 7,4) cdef	0,3 (0,1; 1,0) c	3,2 (2,0; 5,0) a	76,5 (70,1; 81,8) a

**Tabla 18. Ensayo 2. Piñas de segundo año embolsadas con hembras.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test; *p*-valor < 0,05).

Fecha embolsamiento (n=piñas)	Número de piñones	Tipo de piñones					
		Abortados	Ilf	Ilu	It	Ip	Sanos
7-21 may. (n=10)	-	-	-	-	-	-	-
4-18 jun. (n=10)	102,7 (67,8; 137,6) a	6,5 (2,1; 18,5) b	1,2 (0,0; 35,0) a	9,9 (3,4; 25,6) a	3,3 (0,4; 21,1) a	0,008 (0,01; 6,4) b	78,2 (55,9; 91,0) ab
2-16 jul. (n=10)	90,5 (43,9; 137,1) a	9,4 (2,2; 31,7) ab	0,0	2,8 (0,1; 39,2) a	0,9 (0,0; 75,0) a	9,3 (3,7; 21,7) a	77,6 (42,3; 94,2) ab
4-18 ago. (n=10)	82,4 (62,8; 102,0) a	23,7 (17,0; 32,1) a	3,9 (1,1; 13,2) a	4,8 (1,9; 11,9) a	1,1 (0,1; 8,9) a	0,0	66,5 (53,1; 77,6) b
20 ago.-3 sept. (n=10)	100,9 (78,3; 123,4) a	6,2 (3,1; 11,8) b	1,0 (0,0; 10,6) a	5,6 (2,4; 12,4) a	0,1 (0,0; 30,7) a	1,1 (0,4; 3,2) a	86,0 (74,8; 92,7) a
1-15 sept. (n=10)	89,5 (63,9; 115,0) a	17,2 (9,6; 28,9) a	0,3 (0,0; 67,4) a	12,2 (5,3; 25,7) a	4,5 (0,9; 18,0) a	0,9 (0,2; 5,0) a	64,9 (45,8; 80,2) b
Controles (n=20)	96,8 (81,3; 112,4) a	8,0 (5,6; 11,4) b	1,3 (0,4; 4,9) a	7,7 (5,6; 11,4) a	2,8 (1,3; 6,2) a	0,9 (0,4; 1,9) a	79,3 (72,1; 84,9) ab

**Tabla 19. Ensayo 3. Piñas de primer año embolsadas con ninfas.** Número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test; *p*-valor < 0,05).

Fecha embolsamiento (n=piñas)	Número de piñones	Tipo de piñones					
		<i>Abortados</i>	<i>Ilf</i>	<i>Ilu</i>	<i>It</i>	<i>Ip</i>	<i>Sanos</i>
2-9 jul. (n=10)	-	-	-	-	-	-	-
14-21 jul. (n=10)	104,8 (82,4; 127,1) ab	9,2 (5,2; 15,7) b	0,5 (0,0; 9,1) ab	1,3 (0,2; 10,2) a	0,5 (0,0; 17,8) ab	0,3 (0,0; 98,0) a	88,3 (67,4; 97,5) a
28 jul.-4 ago. (n=10)	105,07 (86,6; 123,5) a	11,5 (7,9; 16,7) b	5,2 (2,5; 10,2) a	9,2 (5,0; 16,3) a	6,6 (3,0; 14,0) a	0,3 (0,0; 75,7) a	67,2 (48,3; 81,7) a
20-27 ago. (n=10)	80,6 (65,3; 95,8) b	19,5 (14,6; 25,5) a	0,9 (0,2; 4,6) ab	9,4 (5,2; 16,4) a	0,9 (0,1; 7,0) ab	0,6 (0,0; 44,4) a	68,7 (50,5; 82,7) a
Controles (n=20)	94,5 (83,4; 105,6) ab	13,5 (10,7; 16,7) b	1,2 (0,5; 2,9) b	8,2 (5,6; 12,2) a	0,7 (0,2; 3,1) b	6,8 (1,0; 11,6) a	72,7 (61,5; 81,6) a

#### 4.1.2. Ensayo de exclusión: daños causados por la población de *Leptoglossus occidentalis*

Los valores de *mortalidad (%)*, *rendimiento (%)*, *número de piñones* y *porcentaje por tipo de piñones* por tratamiento se recogen en la Tabla 20.

La *mortalidad* de las piñas fue significativamente mayor en las piñas no protegidas que en las protegidas durante su primer ( $p\text{-valor} = 0,0038$  con  $t\text{-valor} = 2,97$ ) y segundo ( $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 4,93$ ) año de desarrollo. Los valores de *rendimiento* ( $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = -12,28$ ), *número de piñones* ( $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = -7,27$ ) y *proporción de piñones sanos* ( $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = -10,61$ ) fueron significativamente menores en las piñas no protegidas que en las protegidas, mientras que el porcentaje de daños en los piñones fue significativamente mayor en las piñas no protegidas (*abortados*:  $p\text{-valor} = 0,0023$  con  $t\text{-valor} = 3,05$ ; *II*:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 5,42$ ; *III*:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 8,98$ ; *IV*:  $p\text{-valor} < 0,0001$  con  $t\text{-valor} = 8,49$ ), excepto los daños tipo *It*.

**Tabla 20. Ensayo de exclusión.** Mortalidad media de las piñas por año (%), rendimiento (%), número medio de piñones y porcentaje medio (intervalo de confianza del 95%) para cada tipo de piñones (%) ordenados en función de la severidad de los daños por fecha de embolsamiento. (Ilf) Piñones con el tegmen totalmente fusionado a la testa; (Ilu) piñones con tegmen no fusionado a la testa, pero deforme; (Ip) piñones con el endospermo parcialmente dañado; (It) piñones con el endospermo totalmente dañado, arrugado o degradado. Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (t-test; *p*-valor < 0,05).

Trat. (n=piñas)	Mortalidad piñas			Rendimiento	Piñones	Tipo de piñones					
	Año 1	Año 2	Año 3			Abortados	Ilf	Ilu	It	Ip	Sanos
Proteg. (n=146)	0,7a	2,7a	8,2a	3,8a	105,3 a	14,5 (11,5; 18,2)a	4,9 (3,5; 6,8)a	1,8 (1,1; 2,9)a	2,5 (1,5; 4,1)a	0,6 (0,4; 0,9)a	73,6 (68,2; 78,3)a
No proteg. (n=149)	18,1b	43,6b	8,7a	1,8b	82,0b	19,0 (14,7; 24,3)b	15,1 (10,2; 21,6)b	17,5 (11,6; 25,6)b	3,7 (1,8; 7,3)a	4,2 (2,8; 6,2)b	35,6 (27,9; 44,0)b

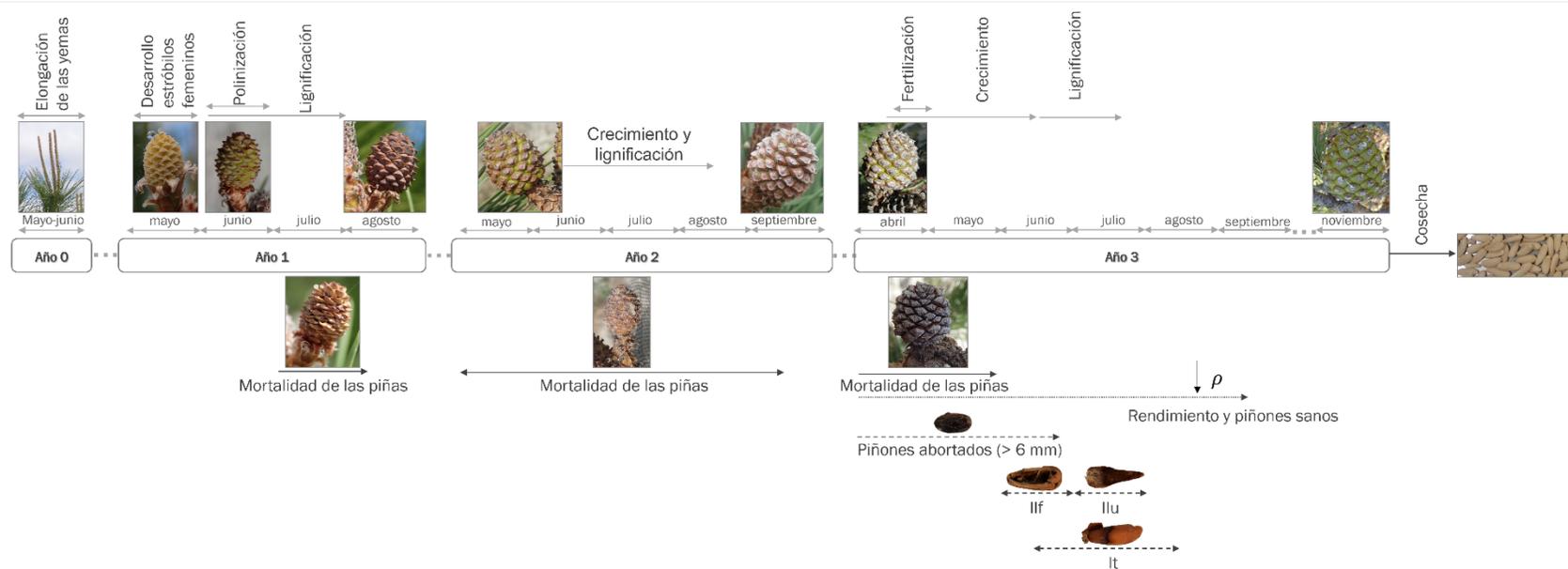
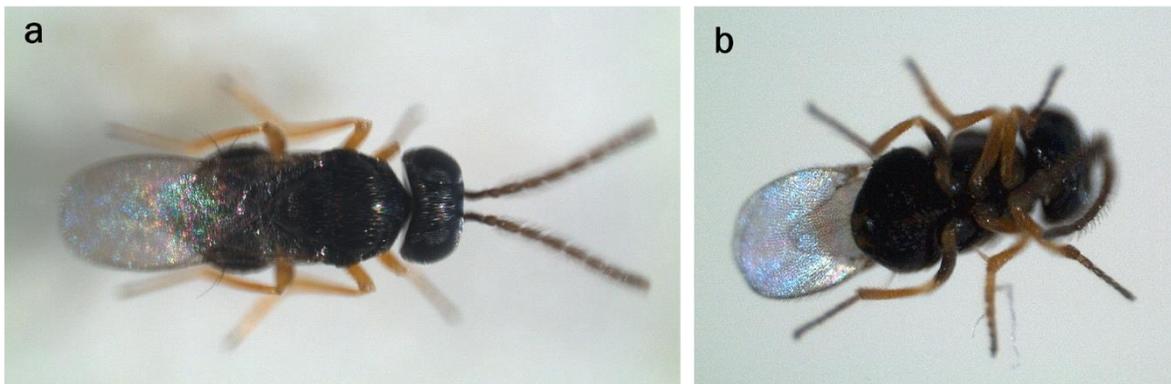


Figura 50. Secuencia de daños en piñas y piñones de *P. pinea* en función del momento de la alimentación de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann a lo largo de su desarrollo fenológico. Autoría fotografías: Ponce-Herrero, L. y Ponce Díaz, A.

## 4.2. Prospección de parasitoides de huevos nativos y monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis*

### 4.2.1. Prospección de parasitoides de huevos nativos de *Leptoglossus occidentalis*

Se identificaron dos especies de parasitoides de huevos nativos de *L. occidentalis*: *O. obscurus* (Figura 51) y *O. pityocampae* (Figura 52).



**Figura 51. *Ooencyrtus obscurus* (Mercet).** (a) Vista superior y (b) vista inferior de un macho de *O. obscurus*. Autoría: Ponce-Herrero, L.



**Figura 52. *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet).** (a) Vista superior y (b) vista inferior de una hembra de *O. pityocampae*. Autoría: Ponce-Herrero, L.

El número de puestas y huevos obtenidas en las colonias de campo se recogen en la Tabla 21 por tipología, ensayo y semana.

Tabla 21. Puestas y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann obtenidos en las colonias de campo. Clasificación por categoría y semana (S) en el banco clonal (2017, 2018 y 2019) y en la repoblación (2019).

Semana	Número de puestas				Número de huevos								
	No parasitadas	Parasitadas por <i>O. obscurus</i>	Parasitadas por <i>O. pityocampae</i>	Total	Viabiles				No viabiles				
					Fértiles	Parasitadas por <i>O. obscurus</i>	Parasitadas por <i>O. pityocampae</i>	Total viabiles	No eclosionados			Total no viabiles	
									No fértiles	Abortados	Depredados		
<b>Banco clonal 2017</b>													
Julio-S1	3	0	0	3	25	0	0	25	9	1	0	10	35
Julio-S2	8	0	0	8	24	0	0	24	12	0	2	14	38
Julio-S3	20	7	0	27	87	12	0	99	58	2	2	62	161
Julio-S4	16	7	0	23	61	13	0	74	21	2	4	27	101
Agosto-S1	13	15	0	28	72	44	0	116	20	2	0	22	138
Agosto-S2	11	10	0	21	54	19	0	73	18	4	2	24	97
Agosto-S3	6	3	3	12	51	7	4	62	2	0	0	2	64
Agosto-S4	10	24	13	47	47	73	37	157	53	3	1	57	214
Agosto-S5	19	12	9	40	59	43	28	130	78	1	1	80	210
Sept.-S1	4	13	13	30	18	35	37	90	26	0	0	26	116
Sept.-S2	4	0	9	13	16	0	39	55	3	2	0	5	60
Sept.-S3	2	0	0	2	15	0	0	15	1	1	0	2	17
Sept.-S4	1	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	5	5
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>91</b>	<b>47</b>	<b>255</b>	<b>529</b>	<b>246</b>	<b>145</b>	<b>920</b>	<b>306</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>336</b>	<b>1.256</b>
<b>Banco clonal 2018</b>													
Junio-S4	1	0	0	1	10	0	0	10	0	1	0	1	11
Julio-S1	5	0	0	5	34	0	0	34	3	2	1	6	40
Julio-S2	5	0	0	5	35	0	0	35	3	1	0	4	39
Julio-S3	13	0	0	13	65	0	0	65	10	0	0	10	75
Julio-S4	10	0	0	10	62	0	0	62	1	1	17	19	81
Agosto-S1	20	2	0	22	79	2	0	81	63	2	21	86	167
Agosto-S2	16	3	1	20	144	12	1	157	18	3	2	23	180
Agosto-S3	23	7	1	31	102	13	6	121	66	8	4	78	199
Agosto-S4	27	16	6	49	115	36	11	162	80	22	18	120	282
Agosto-S5	16	4	0	20	43	13	0	56	47	7	4	58	114
Sept.-S1	11	3	0	14	35	8	0	43	28	6	7	41	84
Sept.-S2	10	0	2	12	10	0	5	15	38	0	0	38	53
Sept.-S3	7	0	0	7	7	0	0	7	15	0	0	15	22
<b>Total</b>	<b>164</b>	<b>35</b>	<b>10</b>	<b>209</b>	<b>741</b>	<b>84</b>	<b>23</b>	<b>848</b>	<b>372</b>	<b>53</b>	<b>74</b>	<b>499</b>	<b>1.347</b>

**Tabla 21 (Cont.). Puestas y huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann obtenidos en las colonias de campo. Clasificación por categoría y semana (S) en el banco clonal (2017, 2018 y 2019) y en la repoblación (2019).**

Semana	Número de puestas				Número de huevos									
	No parasitadas	Parasitadas por <i>O. obscurus</i>	Parasitadas por <i>O. pityocampae</i>	Total	Viabiles				No viabiles					
					Fértiles	Parasitadas por <i>O. obscurus</i>	Parasitadas por <i>O. pityocampae</i>	Total viabiles	No eclosionados					
									No fértiles	Abortados	Depredados	Total no viabiles		
<b>Banco clonal 2019</b>														
Junio-S3	7	0	0	7	48	0	0	48	3	4	0	7	55	
Junio-S4	13	0	0	13	52	0	0	52	7	1	7	15	67	
Julio-S1	12	5	1	18	74	9	1	84	2	5	0	7	91	
Julio-S2	14	5	1	20	69	9	2	80	10	6	4	20	100	
Julio-S3	2	3	0	5	3	8	0	11	5	0	0	5	16	
Julio-S4	3	5	0	8	16	8	0	24	2	0	0	2	26	
Agosto-S1	1	6	0	7	18	13	0	31	16	1	0	17	48	
Agosto-S2	6	7	0	13	20	13	0	33	15	10	5	30	63	
Agosto-S3	12	4	1	17	46	9	3	58	13	10	0	23	81	
Agosto-S4	3	3	0	6	5	10	0	15	11	0	0	11	26	
Agosto-S5	2	2	0	4	11	4	0	15	5	0	1	6	21	
Sept.-S1	3	0	0	3	6	0	0	6	1	0	0	1	7	
Sept.-S2	3	0	0	3	2	0	0	2	5	1	0	6	8	
Sept.-S3	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	2	2	
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>40</b>	<b>3</b>	<b>125</b>	<b>370</b>	<b>83</b>	<b>6</b>	<b>459</b>	<b>97</b>	<b>38</b>	<b>17</b>	<b>152</b>	<b>611</b>	
<b>Repoblación 2019</b>														
Julio-S1	3	0	2	5	14	0	5	19	0	1	19	20	39	
Julio-S2	2	0	0	2	11	0	0	11	0	0	0	0	11	
Julio-S3	0	2	0	2	2	6	0	8	1	0	0	1	9	
Julio-S4	6	0	0	6	31	0	0	31	1	2	1	4	35	
Agosto-S1	6	1	0	7	18	6	0	24	2	1	2	5	29	
Agosto-S2	3	1	0	4	15	2	0	17	0	2	0	2	19	
Agosto-S3	10	1	0	11	39	2	0	41	8	4	1	13	54	
Agosto-S4	2	1	1	4	10	1	3	14	2	0	0	2	16	
Agosto-S5	2	0	0	2	6	0	0	6	0	0	0	0	6	
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>43</b>	<b>146</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>171</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>23</b>	<b>47</b>	<b>218</b>	

En el banco clonal, el porcentaje medio (95% IC) global de masas parasitadas (*índice de eficiencia de descubrimiento*) fue de 26,2% (23,1; 29,5) en 2017, 9,1% (6,6; 12,5) en

2018 y 9,7% (5,6; 16,2) en 2019. A nivel de huevo (*porcentaje de parasitismo*) el porcentaje medio (95% IC) fue 15,1% (12,9; 17,6), 3,3% (2,2; 4,8) y 3,8% (1,9; 7,5), para los tres años consecutivos. Para ambos parámetros se encontraron diferencias significativas entre los años 2017 y 2018, pero no entre 2018 y 2019 (*índice de eficiencia de descubrimiento*: 2017 vs. 2018:  $t$ -valor = 6,37 con  $p$ -valor < 0,0001; 2017 vs. 2019:  $t$ -valor = 3,84 con  $p$ -valor = 0,0001; *porcentaje de parasitismo*: 2017 vs. 2018:  $t$ -valor = 7,52 con  $p$ -valor < 0,0001; 2017 vs. 2019:  $t$ -valor = 3,98 con  $p$ -valor = < 0,0001).

En la repoblación (2019), el porcentaje medio (95% IC) de puestas y huevos parasitados fue 9,9% (5,2; 18,2) y 5,4% (2,7, 10,4), respectivamente. Durante 2019, los niveles de parasitismo globales del banco clonal no fueron diferentes respecto a los de la repoblación.

El porcentaje medio (95% IC) para los cuatro índices se recogen por especie y ensayo en la Tabla 22. Teniendo en cuenta todos los ensayos del banco clonal, el porcentaje medio (95% IC) del *índice de eficiencia de descubrimiento* de *O. obscurus* (27,3% (23,6; 31,3)) fue significativamente mayor que el de *O. pityocampae* (6,1% (4,0; 9,3);  $t$ -valor = 6,67 con  $p$ -valor < 0,0001). Comparando a nivel de ensayo, el *índice de eficiencia de descubrimiento* en el banco clonal fue significativamente mayor para *O. obscurus* que para *O. pityocampae* (2017:  $t$ -valor = 3,72 con  $p$ -valor = 0,0002; 2018:  $t$ -valor = 3,56 con  $p$ -valor = 0,0004; 2019:  $t$ -valor = 4,63 con  $p$ -valor < 0,0001). En la repoblación, el *índice de eficiencia de descubrimiento* de *O. obscurus* fue mayor, pero de forma no significativa. Comparando este índice a nivel de especie y lugar de experimentación (ensayos de 2019), solo se encontraron diferencias significativas para la especie *O. obscurus* ( $t$ -valor= 2,20 con  $p$ -valor = 0,0285). Tomando el huevo como unidad experimental (*porcentaje de parasitismo*), el porcentaje medio (95% IC) global en el banco clonal también fue significativamente mayor para *O. obscurus* (12,0% (10,0; 14,3)) que para *O. pityocampae* (2,7% (1,8; 4,2);  $t$ -valor = 6,13 con  $p$ -valor < 0,0001). Comparando a nivel de ensayo, en todos los ensayos del banco clonal el *porcentaje de parasitismo* fue significativamente mayor para *O. obscurus* que para *O. pityocampae* (2017:  $t$ -valor = 2,88 con  $p$ -valor = 0,0042; 2018:  $t$ -valor = 2,93 con  $p$ -valor = 0,0032; 2019:  $t$ -valor = 3,47 con  $p$ -valor = 0,0006). Sin embargo, esta tendencia no se observó

en la repoblación. En 2019, no se encontraron diferencias cuando se compararon los valores de este índice a nivel de especie y lugar de experimentación. El *índice de eficiencia de explotación de las puestas* también fue significativamente mayor para *O. obscurus* que para *O. pityocampae* en todos los ensayos del banco clonal (2017: *t-valor* = 2,77 con *p-valor* = 0,0061; 2018: *t-valor* = 2,82 con *p-valor* = 0,0052; 2019: *t-valor* = 3,41 con *p-valor* = 0,0008), pero no fue significativamente mayor en la repoblación. Tampoco se detectaron diferencias significativas al comparar este índice por especie y lugar de experimentación en 2019. El *impacto sobre la población plaga* causado por *O. obscurus* fue significativamente mayor en comparación con *O. pityocampae* en todos los ensayos realizados en el banco clonal (2017: *t-valor* = 2,80 con *p-valor* = 0,0054; 2018: *t-valor* = 2,81 con *p-valor* = 0,0051; 2019: *t-valor* = 3,30 con *p-valor* = 0,0010). En 2019, no se detectaron diferencias significativas entre lugares de experimentación por especie.

El periodo de actividad de los parasitoides en los huevos de *L. occidentalis* se estimó a partir del número de huevos parasitados por especie y semana (Figura 53). Englobando los tres años de ensayos en el banco clonal, el periodo de actividad de *O. obscurus* en los huevos de *L. occidentalis* comenzó a principios de julio y finalizó a principios de septiembre, mientras que para la especie *O. pityocampae* se alargó hasta mediados de septiembre. En la repoblación, el periodo de actividad de ambos parasitoides fue intermitente. La actividad de *O. obscurus* se concentró entre mediados de julio y finales de agosto y la de *O. pityocampae* entre principios de julio y finales de agosto. En 2017, los picos de actividad de *O. obscurus* se registraron durante la primera, la cuarta y la quinta semana de agosto, mientras que el pico de actividad de *O. pityocampae* se extendió desde la cuarta semana de agosto hasta la segunda de septiembre. En 2018, el pico de actividad de ambas especies se detectó durante la cuarta semana de agosto. En 2019 la actividad de los parasitoides fue menos intensa. La actividad de *O. obscurus* se concentró en las dos primeras semanas de agosto en el banco clonal y durante la tercera semana de julio y la primera de agosto en la repoblación. Los picos de actividad de *O. pityocampae* se registraron durante la tercera semana de agosto en el banco clonal y la primera semana de julio en la repoblación.

Tabla 22. Porcentaje medio (95% IC) del *índice de eficiencia de descubrimiento, porcentaje de parasitismo, índice de eficiencia de explotación de las puestas e impacto sobre la población plaga*. Por especie y ensayo. BC: banco clonal; R: repoblación. Las medias en la misma fila por índice con la misma letra no son significativamente diferentes (t-test, *p*-valor < 0,05).

Ensayo	<i>Índice de eficiencia de descubrimiento</i>		<i>Porcentaje de parasitismo</i>		<i>Índice de eficiencia de explotación</i>		<i>Impacto sobre la población plaga</i>	
	<i>O. obscurus</i>	<i>O. pityocampae</i>	<i>O. obscurus</i>	<i>O. pityocampae</i>	<i>O. obscurus</i>	<i>O. pityocampae</i>	<i>O. obscurus</i>	<i>O. pityocampae</i>
BC 2017	35,7 (30,0; 41,8) a	18,4 (14,1; 23,7) b	19,6 (16,0; 23,8) a	11,5 (8,7; 15,1) b	35,3 (29,7; 41,4) a	20,8 (15,8; 27,0) b	26,7 (21,8; 32,3) a	15,8 (11,8; 20,8) b
BC 2018	16,8 (12,3; 22,5) a	4,8 (2,6; 8,7) b	6,2 (4,3; 9,0) a	1,7 (0,8; 3,5) b	25,1 (18,2; 33,5) a	6,9 (3,3; 13,9) b	9,9 (6,8; 14,3) a	2,7 (1,2; 5,8) b
BC 2019	32,0 (24,4; 40,7) a	2,4 (0,8; 7,2) b	13,6 (9,5; 19,1) a	1,0 (0,2; 4,0) b	38,8 (28,7; 50,0) a	2,8 (0,6; 11,5) b	18,1 (12,5; 25,5) a	1,3 (0,3; 5,8) b
R2019	14,0 (6,3; 28,0) a	7,0 (2,2; 19,8) a	7,8 (3,4; 16,9) a	3,7 (1,1; 12,0) a	32,7 (15,7; 55,9) a	15,4 (4,3; 42,4) a	9,9 (4,2; 21,7) a	4,7 (1,2; 16,0) a

Varios parasitoides fueron capturados mientras se encontraban posados sobre las puestas en el banco clonal en 2017 y 2018 (Figura 53). Ninguno de los parasitoides fue capturado sobre puestas con orificios de salida de parasitoides. Durante la tercera semana de agosto de 2018 se capturaron dos machos de *O. obscurus*, el resto fueron hembras.

Ninguna de las especies pasó por un estado de diapausa durante su desarrollo larvario en condiciones estándar de laboratorio. El número de parasitoides emergidos, su *sex ratio* y su *ratio de emergencia* varió por especie y ensayo (Tabla 23). La *ratio de emergencia* máxima fue de 5 parasitoides/huevo para la especie *O. obscurus* y de 4 parasitoides/huevo para la especie *O. pityocampae*. No se encontraron diferencias significativas entre especies por ensayo para esta última *ratio*.

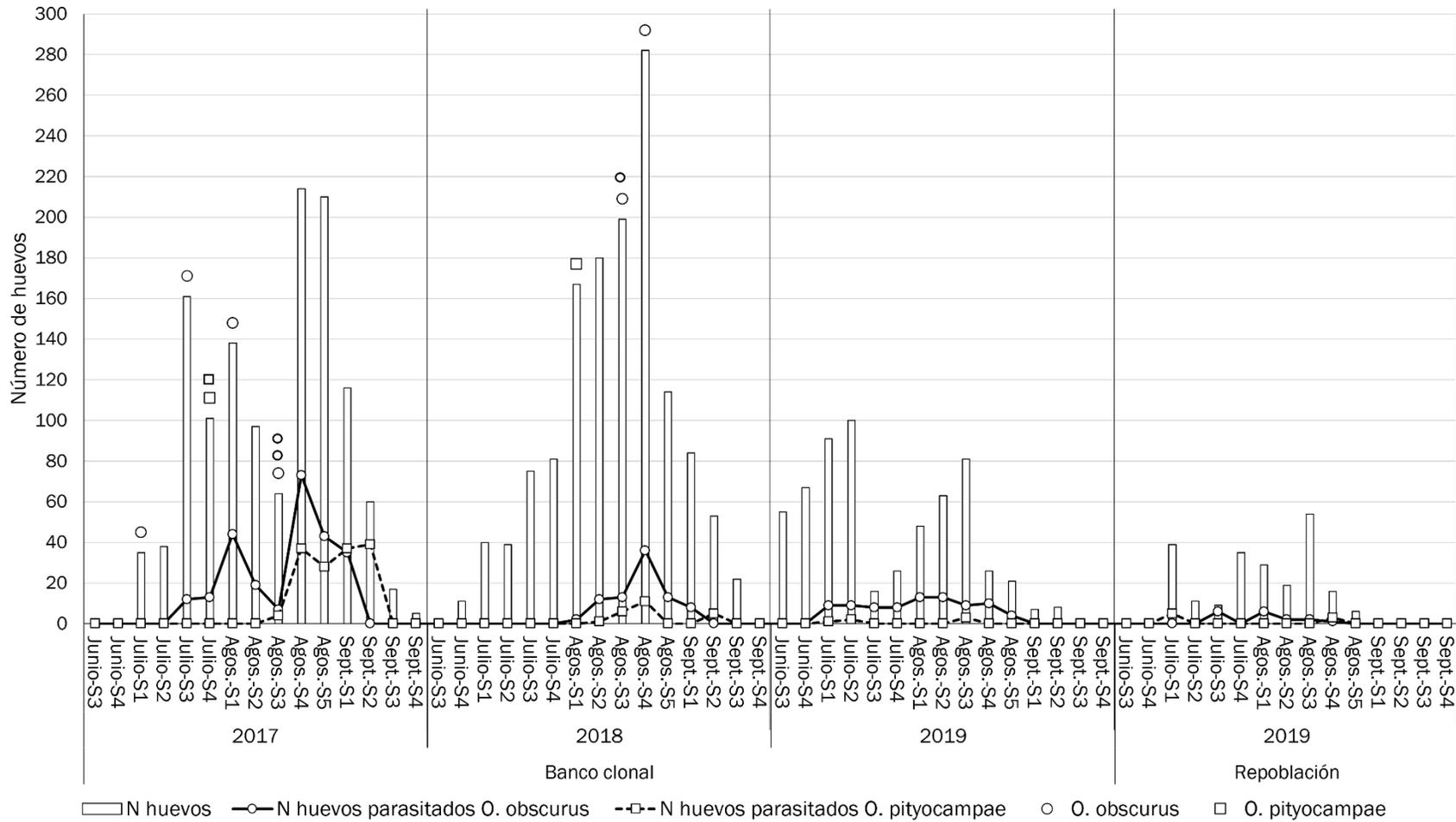
El porcentaje medio (95% IC) de *huevos no emergidos* en el banco clonal fue de 25,8% (23,5; 28,3) en 2017, 31,6% (29,2; 34,1) en 2018 y 22,1% (19,0; 25,7) en 2019, siendo significativamente diferente entre los años 2017 y 2018 ( $t\text{-valor} = -3,22$  con  $p\text{-valor} = 0,0013$ ); y 2018 y 2019 ( $t\text{-valor} = 4,15$  con  $p\text{-valor} < 0,0001$ ) en el banco clonal. En la repoblación, este porcentaje fue significativamente menor (11,0% (7,5; 16,1)) que en el banco clonal en 2019 ( $t\text{-valor} = 3,37$  con  $p\text{-valor} = 0,0008$ ). En 2017, la proporción de huevos parasitados sin orificios de salida de parasitoides fue 10,7% (42 huevos): 22 huevos en puestas con otros huevos parasitados por *O. obscurus* y el resto en puestas con huevos parasitados por *O. pityocampae*. Cuatro de los huevos diseccionados contenían una masa granulada y translúcida (Maple, 1947), 12 parasitoides abortados y 28 larvas abortadas. En 2018 se diseccionaron tres huevos (2,8%), dos con masa granular y translúcida y uno con una larva abortada. Todos ellos en puestas con otros huevos parasitados por *O. obscurus*. En 2019 se diseccionaron cinco huevos (5,6%), uno con masa granular y translúcida y los otros cuatro con una larva abortada, todos ellos en puestas con otros huevos parasitados por *O. obscurus*. En la repoblación (2019), se diseccionaron dos huevos (8,0%) con una larva abortada cada uno. Uno de los huevos se encontraba en una puesta parasitada por *O. obscurus* y el otro en una puesta parasitada por *O. pityocampae*.

En cuanto a la *ratio de depredación*, el porcentaje medio (95% IC) varió de 1,0% (0,5; 1,7) en 2017 a 5,5% (4,4; 6,9) en 2018 y 2,8% (1,7; 4,5) en 2019 en el banco clonal,

siendo significativamente diferente entre todos los años (2017 vs. 2018:  $t$ -valor = -5,67 con  $p$ -valor < 0,0001; 2017 vs, 2019:  $t$ -valor = -2,86 con  $p$ -valor = 0,0044; 2018 vs, 2019:  $t$ -valor = 2,57 con  $p$ -valor = 0,0103). En la repoblación, este porcentaje fue mayor (10,6% (7,2; 15,6)) y significativamente diferente que en el banco clonal en 2019 ( $t$ -valor = -4,30 con  $p$ -valor < 0,0001).

**Tabla 23.** Número de parasitoides emergidos de las puestas parasitadas de las colonias de campo. Sex ratio (machos:hembras) y ratio de emergencia (Número de parasitoides emergidos/huevo) por especie y ensayo.

Ensayo	Especie	Parasitoides emergidos			Sex ratio (♂:♀)	Ratio de emergencia
		Machos	Hembras	Total		
Banco clonal 2017	<i>O. obscurus</i>	69	295	364	1:4	1,6
	<i>O. pityocampae</i>	5	202	207	1:40	1,6
Banco clonal 2018	<i>O. obscurus</i>	32	130	162	1:4	1,7
	<i>O. pityocampae</i>	0	39	39	–	1,9
Banco clonal 2019	<i>O. obscurus</i>	20	111	131	1:6	1,5
	<i>O. pityocampae</i>	0	7	7	–	1,2
Repoblación 2019	<i>O. obscurus</i>	7	31	38	1:4	2,3
	<i>O. pityocampae</i>	0	11	11	–	1,3
<b>Total</b>	<b><i>O. obscurus</i></b>	<b>128</b>	<b>567</b>	<b>695</b>	<b>1:4</b>	<b>1,7</b>
	<b><i>O. pityocampae</i></b>	<b>5</b>	<b>259</b>	<b>264</b>	<b>1:40</b>	<b>1,5</b>

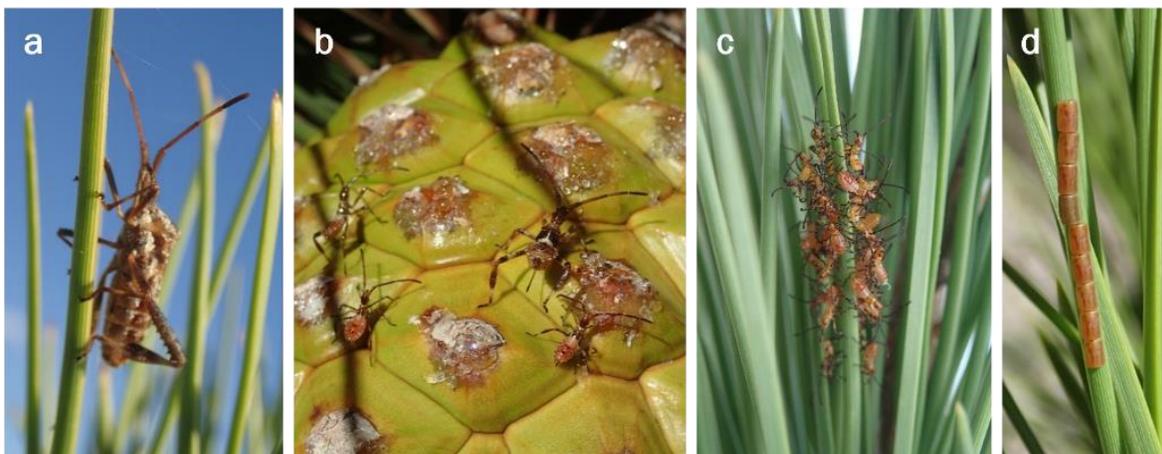


**Figura 53. Periodo de actividad de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) y *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Banco clonal 2017, 2018 y 2019, y Repoblación 2019. Actividad estimada por comparación del número de huevos parasitados por cada especie y el total de huevos ovipositados por las hembras en las colonias de campo (barras) por semana. Parasitoides de las especies *O. obscurus* (○) y *O. pityocampae* (□) encontrados sobre puestas de *L. occidentalis* de las colonias de campo.**

#### 4.2.2. Monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis*

El número de ninfas y adultos de *L. occidentalis* (Figura 54) observados en 2018 (ninfas: 525; adultos: 183) fue mayor que en 2019 (ninfas: 257; adultos: 53). El comienzo del periodo de actividad de *L. occidentalis* se registró a finales de mayo (2018) y principios de junio (2019). En la Figura 55 se representa el número de huevos, ninfas y adultos observados semanalmente en el banco clonal en 2018 y 2019.

En 2018 se encontraron cuatro puestas, dos de ellas con huevos parasitados: una puesta con ocho huevos eclosionados y tres parasitados (27,3%) por *O. obscurus* (cuarta semana de agosto de 2018), y otra con un huevo no fecundado y dos parasitados (66,7%) por *O. obscurus* (quinta semana de agosto de 2018). En 2019, se encontraron tres puestas, pero ninguna contenía huevos parasitados (Figura 55).



**Figura 54. Monitoreo visual de la población de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** (a) Adulto en acícula; (b) ninfas de segundo (N2) y tercer (N3) estadio sobre una piña; (c) ninfas de primer (N1) y segundo (N2) estadio en acícula; (d) puesta con un huevo parasitado diferenciado por su color más oscuro (cuarto desde arriba). Autoría: Ponce-Herrero, L., Ponce Díaz, A.

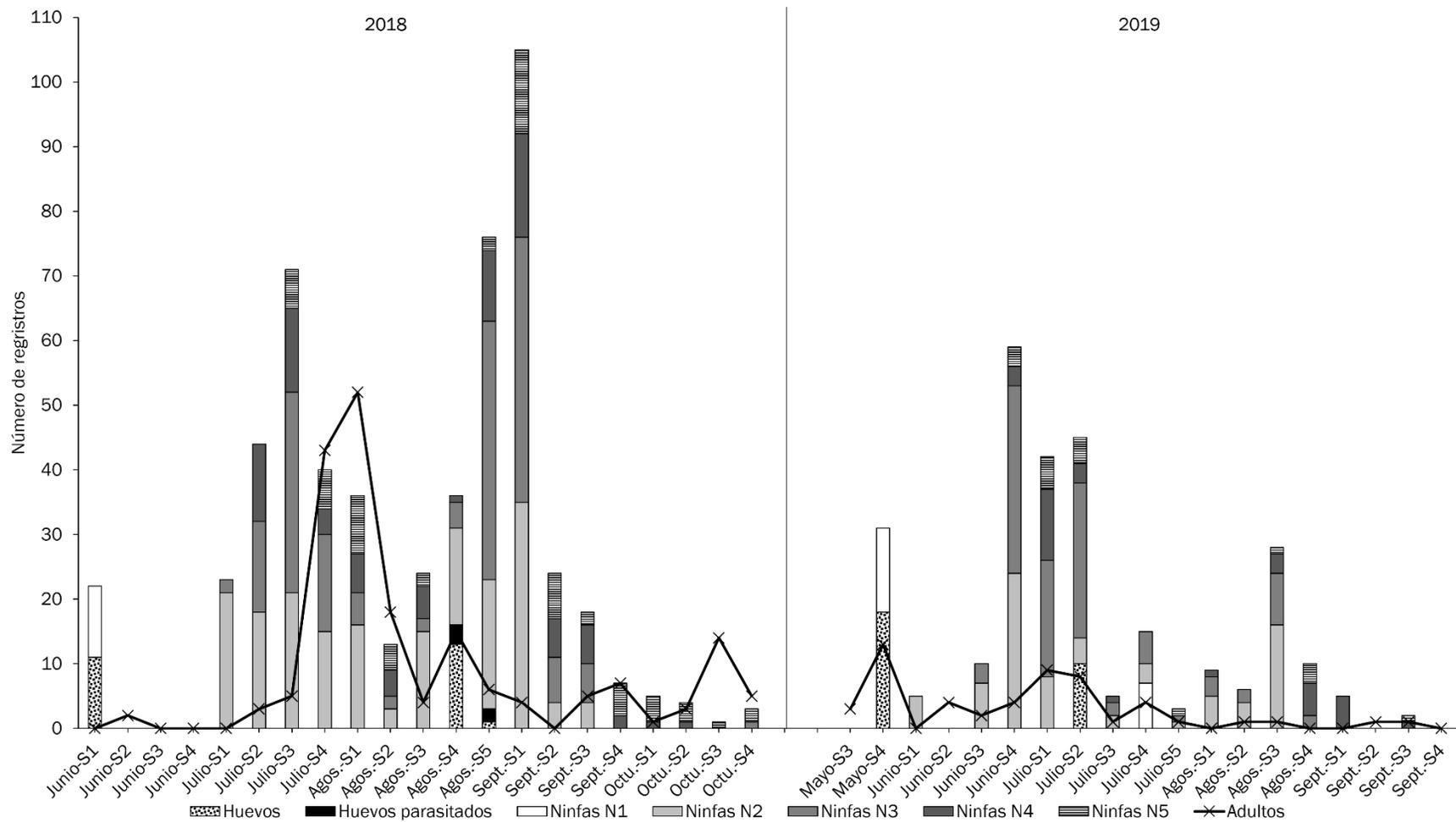


Figura 55. Registro de la población de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann en el banco clonal. Número de huevos, huevos parasitados, ninfas por estadio (N1, N2, N3, N4 y N5), y adultos encontrados en ramas y piñas bajas durante los monitoreos semanales realizados en las parcelas 15, 19 y 20 del banco clonal en 2018 y 2019.

#### 4.3. Evaluación de *Ooencyrtus obscurus* como enemigo natural de *Leptoglossus occidentalis* en laboratorio

**Primer ensayo. Efecto del tamaño de la puesta de *L. occidentalis*:** seis de las 60 parejas fueron eliminadas porque las hembras quedaron atrapadas en la miel. De las 54 hembras restantes, 19 parasitaron al menos un huevo (35,2%). El 34,0% de los 188 huevos expuestos fueron parasitados (*porcentaje de parasitismo*), emergiendo 116 parasitoides. La probabilidad de que un huevo de *L. occidentalis* fuese parasitado aumentó con el tamaño de la puesta, aunque de forma no significativa (*t-valor* = 0,07 con *p-valor* = 0,9452). El número medio de huevos parasitados por hembra fue de  $3,4 \pm 0,5$  (rango de 1 a 7). La progenie media (*fecundidad*) por hembra fue de  $6,1 \pm 1,0$  parasitoides (rango de 1 a 15). La *supervivencia de los estadios pre-imaginales* fue alta (92,2%), no emergiendo progenie de cinco huevos parasitados. La *ratio de emergencia* fue de  $2,0 \pm 0,14$  parasitoides/huevo (rango de 1 a 6), y decreció de forma no significativa con el aumento del número de huevos parasitados (*t-valor* = -0,26 con *p-valor* = 0,7986). La *sex ratio* (% hembras) fue 56,0% y no estuvo significativamente influida por el tamaño de la puesta (*t-valor* = -1,54 con *p-valor* = 0,1307).

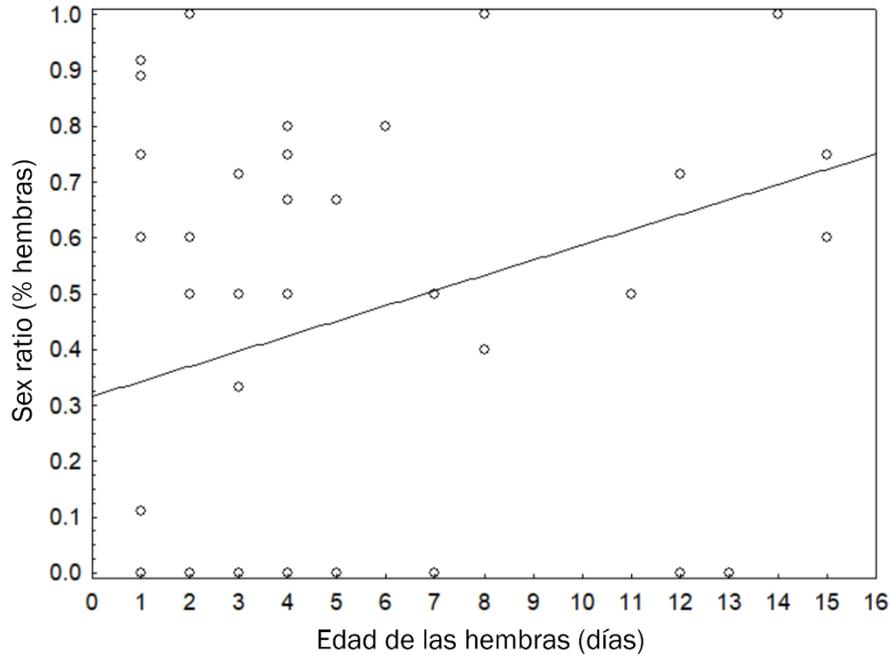
**Segundo ensayo. Estrategia de reproducción sexual:** *Ooencyrtus obscurus* se reproduce de forma sexual, dando lugar a progenie de ambos sexos, y de forma asexual por partenogénesis pseudo-arrenotóquica, generando solamente machos (Frank y Gillett-Kaufman, 2006). Todas las hembras vírgenes ( $n = 30$ ) murieron de forma natural, y solamente 9 parasitaron al menos un huevo (30,0%). El 37,7% de los 77 huevos expuestos fueron parasitados (*porcentaje de parasitismo*), emergiendo 58 parasitoides. La *fecundidad* media fue de  $3,2 \pm 0,6$  parasitoides/hembra (rango de 2 a 16). La *supervivencia de los estadios pre-imaginales* fue alta (86,2%), no emergiendo progenie de cuatro huevos parasitados. La *ratio de emergencia* fue de  $2,3 \pm 0,2$  parasitoides/huevo (rango de 1 a 4). La *sex ratio* (% hembras) fue 0,0%.

**Tercer ensayo. Fecundidad a lo largo de la vida de las hembras y parámetros demográficos y de la tabla de vida:** todas las hembras ( $n = 40$ ) murieron de forma natural, y 27 parasitaron al menos un huevo (67,5%). El 2,8% de los 4.476 huevos expuestos fueron parasitados (*porcentaje de parasitismo*), emergiendo 209

parasitoides. El número medio de huevos parasitados por hembra fue de  $4,5 \pm 0,5$  parasitoides/hembra. Los parámetros de la tabla de vida se recogen en la Tabla 24. La *supervivencia de los estadios pre-imaginales* fue alta (96,7%), no emergiendo progenie de cuatro huevos parasitados. Estos contenían una larva muerta ( $n = 3$ ) y una masa granular y translúcida ( $n = 1$ ) asociada con el parasitismo (Maple, 1947). La *fertilidad* fue mayor que la *fecundidad*, y  $0,5 \pm 0,2$  de los huevos parasitados no llegó a desarrollarse completamente. La *fecundidad* media varió de 2 a 23 huevos/hembra. El *periodo de desarrollo de los estadios pre-imaginales* a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  fue significativamente mayor (prueba “t” de Student; *t*-valor = 2,53 con *p*-valor = 0,0122) para las hembras (21,6 días) que para los machos (20,6 días). La *sex ratio* (% hembras) media fue 41,2% (rango de 0 a 100%), aumentando con la edad de las hembras de forma significativa (*t*-valor = 2,48 con *p*-valor = 0,024 en el modelo mixto de regresión lineal, Figura 56).

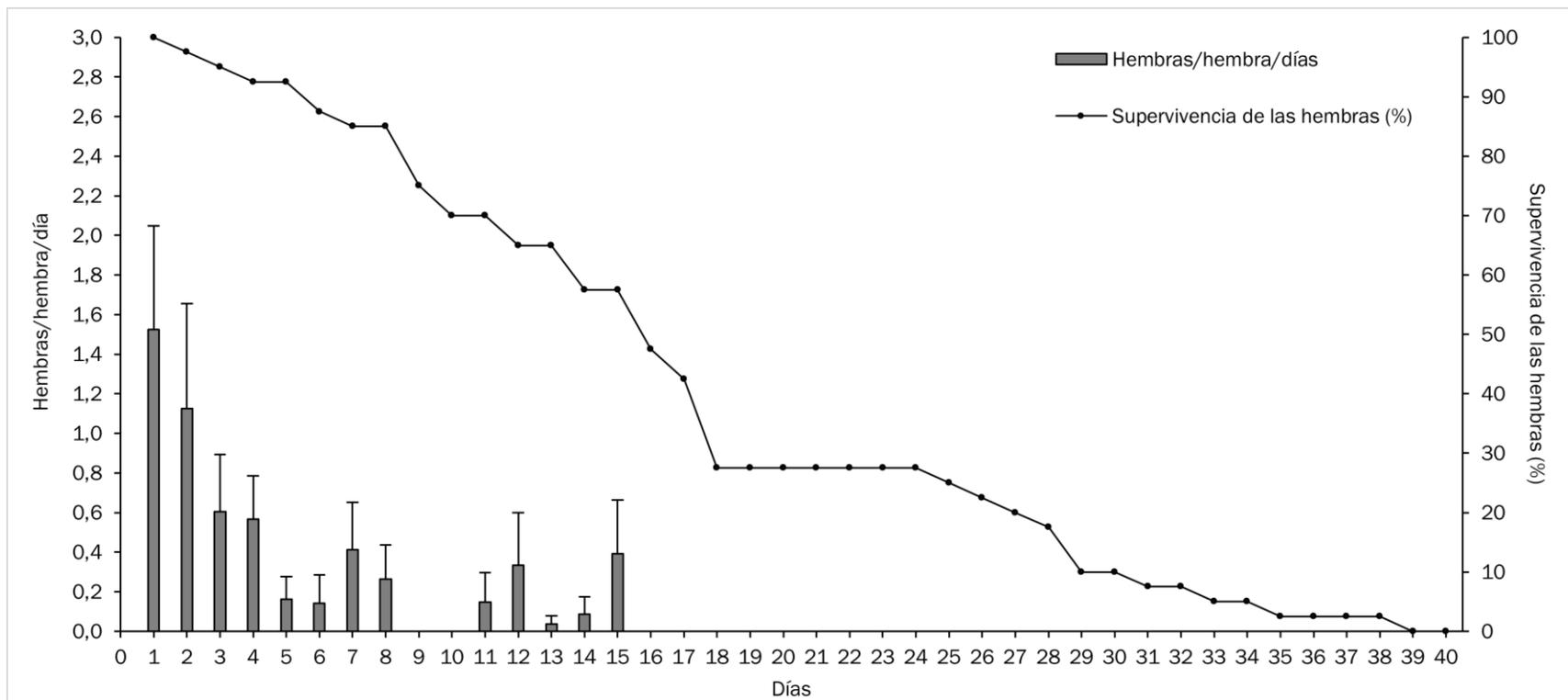
**Tabla 24. Parámetros de la tabla de vida de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Valores medios ( $\pm$  SE) para *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo ( $n = 27$ ).

Parámetro	Valor medio ( $\pm$ SE)
Longevidad de las hembras (días)	$16,9 \pm 1,7$
Periodo de pre-oviposición (días)	$3,9 \pm 0,7$
Periodo de oviposición (días)	$2,3 \pm 0,5$
Periodo post-reproductivo (días)	$10,6 \pm 1,7$
Fecundidad (progenie/hembra)	$7,7 \pm 1,0$
Fertilidad (stalks/hembra)	$8,2 \pm 1,0$
Progenie abortada (progenie no emergida/hembra)	$0,5 \pm 0,2$
Ratio de emergencia (progenie/huevo)	$1,7 \pm 0,1$
Periodo de desarrollo pre-imaginal de las hembras (días)	$21,6 \pm 0,3$
Periodo de desarrollo pre-imaginal de los machos (días)	$20,6 \pm 0,3$
Sex ratio (% hembras)	41,2



**Figura 56. Relación entre la edad de las hembras y la sex ratio (% hembras) de la progenie de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet).** Modelo mixto de regresión lineal ( $t$ -valor = 2,48 con  $p$ -valor = 0,024) para la edad de las hembras y la sex ratio (% hembras) de la progenie de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo ( $n = 27$ ).

De acuerdo con la Figura 57, el parasitismo se concentró en las dos primeras semanas de la vida de *O. obscurus*, especialmente durante el primer día, cuando el 30,2% de los huevos fueron parasitados y la *fecundidad* media ( $\pm$ SE) máxima fue de  $2,3 \pm 0,6$  parasitoides por hembra. En el día 1, el porcentaje de oviposición representó el 28,8% de la oviposición, mientras que el 50,0% y el 90,0% de la oviposición fue realizada en los días 2 y 11, respectivamente. El *índice de ovigenia* fue  $0,27 \pm 0,08$ . No se observó una correlación significativa entre la *fecundidad* y la *longevidad* ( $t$ -valor = -1,93 con  $p$ -valor = 0,0709). Las hembras comenzaron a morir a partir del día 2, pero la mortalidad decreció constantemente hasta el día 18 cuando se estabilizó. A partir del día 26 comenzó a decrecer de nuevo hasta el día 38, cuando se registró la longevidad máxima. La *esperanza de vida* de las hembras fue de 14 días.



**Figura 57. Fecundidad de las hembras de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) a lo largo de su vida en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Fecundidad media (+SE) de las hembras a una edad específica (barras) y supervivencia de las hembras (%) de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo (n = 27).

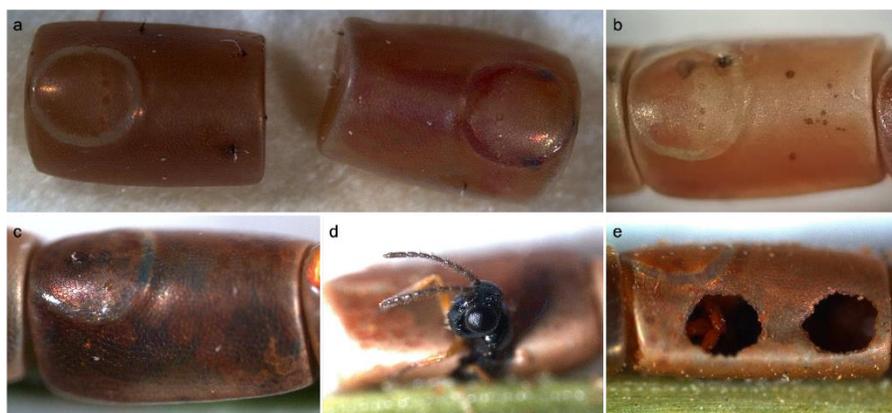
Los parámetros demográficos se recogen en la Tabla 25. La tasa *intrínseca de crecimiento* ( $r_m$ ) fue de 0,05 hembras/hembra/día, por lo que población de parasitoides fue capaz de multiplicarse 1,05 veces al día ( $\lambda$ ) doblando su tamaño a los 14,34 días ( $T_d$ ). Una única hembra de *O. obscurus* dio lugar a más de 3 hembras en una generación ( $T$ ) de aproximadamente 23,96 días.

**Tabla 25. Parámetros demográficos de *Ooencyrtus obscurus* (Mercet) en huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann.** Valores medios en condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo ( $n = 27$ ).

Parámetro	Valor medio
Tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ) (hembras/hembra/día)	0,05
Capacidad finita de incremento ( $\lambda$ ) (hembras/hembra/día)	1,05
Duración media de una generación ( $T$ ) (días)	23,96
Tiempo de duplicación de la población ( $T_d$ ) (días)	14,34
Tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) (hembras/hembra/generación)	3,19
Tasa bruta de reproducción ( $GRR$ ) (hembras/hembra/generación)	3,55

**Detección del parasitismo:** los huevos parasitados presentaron cuatro apariencias externas (Figura 58). (a) Stalks sobre el corion; (b) puntos y/o líneas negras bajo el corion; (c) detritus bajo el corion; (d) orificios de salida de los parasitoides.

El tiempo de medio de desarrollo, desde la detección del primer stalk, fue de  $3,9 \pm 0,1$  días para la fase b (puntos);  $8,5 \pm 0,2$  días para la fase c (detritus) y  $21,0 \pm 0,2$  días para la fase d (emergencia de parasitoides o presencia de los orificios de salida).



**Figura 58. Apariencia externa de los huevos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann parasitados por *Ooencyrtus obscurus* (Mercet).** (a) Stalks; (b) puntos y/o líneas negras bajo el corion; (c) detritus bajo el corion; (d) orificios de salida de los parasitoides; (e) parasitoides emergiendo. Condiciones de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40 \pm 10\%$ ), fotoperiodo 16:8 (L:O) y miel como fuente de alimento *ad libitum*. Datos del Tercer ensayo ( $n = 27$ ).

## 5. Discusión

Los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en las piñas de *P. pinea* varían, desde la mortalidad de las piñas de todas las edades hasta la reducción del número de piñones comercializables, en función del momento del desarrollo de las piñas en el que tiene lugar la alimentación (Lesieur et al., 2014). Se observan tendencias estacionales en la mortalidad de las piñas y en la proporción de los diferentes tipos de daños en los piñones de las piñas de tercer año. La mortalidad de las piñas inmaduras, de primer y segundo año, y el aumento de la proporción de piñones vanos y dañados, pero externamente sanos, también son síntomas del “síndrome de la piña seca”. Sin embargo, la alimentación de *L. occidentalis* en momentos puntuales del desarrollo de las piñas no reduce el número de piñones, daño asociado con este síndrome (Bracalini et al., 2013; Calama et al., 2015, 2020; Farinha et al., 2018b, 2021; Mutke et al., 2014, 2015a, 2015b, 2017). Los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización y cuantificación de daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en piñas y piñones de *P. pinea* respaldan la afirmación de Bracalini et al. (2013) en la que se refiere a esta plaga como “una de las más dañinas para la producción de piñón blanco” en la cuenca mediterránea.

De acuerdo con otros autores, la detección los daños causados por *L. occidentalis* en campo está limitada por la ausencia de señales visibles al ojo humano sobre la superficie de las piñas tras su alimentación (Bracalini et al., 2013; Strong, 2001). Incluso, una vez extraídos los piñones, la morfología externa de aquellos dañados o abortados es similar a la de los piñones sanos (Bates et al., 2002b).

La gravedad de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en las piñas de *P. pinea*, como en el caso de otras especies, se reduce a medida que avanza la estación de desarrollo (Figura 50) (Bates et al., 2001; Connelly y Schowalter, 1991; Schowalter y Sexton, 1990), probablemente con la lignificación progresiva de las brácteas tras el engorde de las piñas durante su primer, segundo y tercer año (Mutke, 2000).

Los principales daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* en las piñas inmaduras son: el aborto y la reducción del número de semillas (Bates et al., 2002b). El

porcentaje de mortalidad de las piñas de primer año de *P. pinea* embolsadas con dos ninfas durante una semana siguió una tendencia estacional (Figura 49e). El 100,0% de las piñas tratadas a principios de julio abortaron, mientras que esta proporción decreció progresivamente con el avance de la temporada hasta el 10,0% a finales de agosto, equiparándose con la mortalidad de los controles (10,0%). En Norteamérica, también se han registrado altos porcentajes de mortalidad (75,0%) en piñas inmaduras de *P. monticola* embolsadas con dos ninfas, aunque durante un periodo superior (3 - 5 semanas) (Bates et al., 2002b). La mortalidad de las piñas de segundo año de *P. Pinea* embolsadas con dos hembras durante dos semanas (Figura 49c) no siguió una tendencia estacional tan marcada como en las piñas de primer y tercer año. La mortalidad de las piñas tratadas entre mayo y la primera mitad de julio (80,6% - 100,0%) fue significativamente mayor que la de los controles (5,0%), sin embargo, a partir de agosto (10,0% - 60,7%) la mortalidad se equiparó a la de los controles. En Italia, el 80,0% de la mortalidad de las piñas de segundo año de *P. pinea* se asoció con la alimentación de *L. occidentalis* (Roversi et al., 2011b), proporción incluida en el rango de mortalidad registrado en el banco clonal. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad de las piñas de segundo año embolsadas con dos hembras durante todo el mes de agosto en Portugal fue inferior (18,4%), considerándose bajo y relacionándose con un estado fisiológico de las hembras poco demandante en cuanto a necesidades nutricionales en comparación con otros momentos de su ciclo de vida (Farinha et al., 2018b). Esta hipótesis no puede ser respaldada por los resultados obtenidos en el banco clonal porque, aunque el porcentaje de mortalidad a principios de agosto también fue bajo (10,0%) y significativamente igual al de los controles (5,0%), la proporción de piñones abortados (23,7%) fue significativamente superior en comparación con la de los controles (8,0%). Según Bates et al. (2000a, 2001) la severidad de los daños en las piñas durante su último año de desarrollo depende de la madurez de las piñas. En las piñas de tercer año de *P. pinea*, la mortalidad de las piñas siguió una tendencia estacional reduciéndose progresivamente con el avance de la temporada, entre abril (90,0%) y principios de junio (28,6%), cuando se equiparó con la de los controles (0,0%) (Figura 49a). Connelly y Schowalter (1991) también observaron una elevada mortalidad (40,0%) en piñas de *P.*

*contorta* asociada con la alimentación de *L. occidentalis* al inicio de su última temporada de desarrollo.

Como se ha mencionado previamente, la reducción del número de semillas es uno de los daños asociados con la alimentación de *L. occidentalis* en piñas inmaduras (Bates et al., 2002b; Connelly y Schowalter, 1991; Strong, 2006). Sin embargo, el número de piñones de las piñas de primer y segundo año de *P. pinea* expuestas a la alimentación de *L. occidentalis*, durante una o dos semanas en diferentes momentos de su desarrollo fenológico, no fue significativamente menor respecto al de los controles. Solamente se observó un menor número de piñones, respecto a los controles (96,7), en las piñas de tercer año embolsadas con dos hembras durante dos semanas entre el 10 y el 24 de abril (51,0) y del 4 al 18 de agosto (74,7). Hay que tener en cuenta que el dato de abril no puede considerarse consistente por corresponder a una sola piña. Farinha et al., (2018b) tampoco observaron una reducción en el número de piñones de las piñas de *P. pinea* embolsadas con ninfas o adultos durante el mes de agosto.

El rendimiento y, por lo tanto, la proporción de piñones sanos, de las piñas de primer y segundo año de *P. pinea* embolsadas con *L. occidentalis* no siguieron una tendencia estacional, como es el caso de *P. contorta*, *P. monticola* y *P. menziesii* (Bates et al., 2002a, 2002b). El rendimiento de las piñas de primer año, embolsadas con ninfas durante una semana, no fue significativamente diferente respecto al de los controles (3,8%) en julio y agosto (3,6% - 4,3%). En cuanto a las piñas de segundo año, embolsadas con hembras durante dos semanas, se observó una reducción en el rendimiento de las piñas tratadas en agosto (3,8% - 3,2%) y la primera mitad de septiembre (2,7%), siendo significativamente menor respecto a los controles (3,8%) solamente en septiembre. Sin embargo, este resultado no se considera consistente porque la proporción de piñones sanos de las piñas tratadas en septiembre (73,9%) fue mayor que en los controles (64,9%). El rendimiento de las piñas de tercer año, embolsadas con hembras durante dos semanas, aumentó considerablemente entre dos fechas de embolsamiento concretas (Figura 49b). El primer incremento se observó entre los embolsamientos del 21 de mayo al 7 de junio (0,7%) y del 4 al 18 de junio (2,1%), coincidiendo la fecundación y la embriogénesis de los piñones, mientras que el segundo incremento se observó entre los embolsamientos del 2 al 16 de julio (2,0%) y del 16 al

30 de julio (3,1%), coincidiendo con el inicio del endurecimiento de la esclerotesta y la acumulación de sustancias de reserva en el endospermo (Mutke, 2000). El rendimiento aumentó y se equiparó con el de los controles en el tratamiento desarrollado durante la primera quincena de septiembre (3,6%). Connelly y Schowalter (1991) también observaron esta tendencia estacional en los valores del rendimiento de las piñas, de *P. monticola* durante su último año de desarrollo, embolsadas con *L. occidentalis* en Norteamérica. La proporción de piñones sanos de las piñas de tercer año siguió una tendencia estacional, más o menos similar a la del rendimiento, equiparándose con la de los controles (76,5%) a partir de los tratamientos realizados en agosto (67,5% - 73,9%).

Comparando los valores de rendimiento registrados en la meseta Norte, antes (serie 1992 - 2000: 3,5%) y después (serie 2012 - 2016: 1,8%) de la invasión de *L. occidentalis*, se puede afirmar que la alimentación de *L. occidentalis* en piñas de tercer año afecta a su rendimiento. La reducción del rendimiento en la meseta Norte se ha relacionado con el aumento de la proporción de piñones dañados desde el 13,4%, para la serie 1992 - 2000, hasta el 49,2% para la serie 2012 - 2016 (Calama et al., 2020).

La proporción de piñones dañados en las piñas inmaduras embolsadas con *L. occidentalis* no siguió una tendencia estacional. Solo se observaron diferencias puntuales en la proporción de daños tipo Ilf (5,2%) y It (6,6%), en las piñas de primer año tratadas entre el 28 de julio y el 4 de agosto, respecto a los controles (Ilf: 1,2%; It: 0,7%). Estos daños podrían estar relacionados con alteraciones mecánicas de los tejidos de las piñas inmaduras ocasionadas por la introducción de la probóscide de *L. occidentalis* durante su alimentación (Abellanas, 1990). La proporción total de piñones dañados en las piñas de tercer año puede relacionarse con la alimentación de las hembras entre abril y mediados de julio (rango de 95,2% a 56,2%), ya que es mayor que la proporción de daños registrada en la meseta Norte antes (13,4%) y después (49,2%) de la invasión de *L. occidentalis* (Calama et al., 2020). Sin embargo, a partir de mediados de julio esta relación no es tan clara por ser menor (rango de 26,1% a 43,7%) a la registrada en la meseta Norte tras la invasión de *L. occidentalis*. Por otro lado, la proporción de los diferentes tipos de daño varió a lo largo de la estación de desarrollo

de las piñas de tercer año desde los más intensos, al principio de la temporada, hasta los más leves al final: piñones abortados, tipo llf, tipo llu, tipo lt y tipo lp (Figura 50).

En las piñas de tercer año, el tipo de daño predominante al inicio de la temporada (10 abril - 4 junio) fueron los piñones abortados (rango de 68,5% a 93,2%), siendo su proporción significativamente superior respecto a los controles (14,7%). Esta tendencia fue previamente observada en semillas de *P. contorta* y *P. menziesii* en Norteamérica (Bates et al., 2000a; Connelly y Schowalter, 1991; Schowalter y Sexton, 1990; Strong, 2006; Strong et al., 2001). En el mes de junio (4 junio - 2 julio) predominaron los piñones sin endospermo y con el tegmen fusionado a la testa (tipo llf) (rango de 24,7% a 37,4%), siendo su proporción significativamente superior a la de los controles (0,4%). En piñas otras especies de coníferas, como *P. menziesii*, *P. contorta* var. *latifolia*, *P. sylvestris* o *P. nigra*, la fusión de las semillas a las brácteas es un daño típico asociado con la alimentación de *L. occidentalis* al inicio de la temporada de desarrollo de las piñas (Bates et al., 2000a; Koerber, 1963; Lesieur et al., 2014; Strong, 2006; Strong et al., 2001). Aunque este tipo de daño no se ha observado en los piñones de *P. pinea*, puede asemejarse con la fusión del tegmen y la testa (tipo llf) por tratarse de un tipo de colapso de los tejidos protectores de la semilla (Pasek y Dix, 1988). La fusión de los tejidos de protección de los piñones de *P. pinea* se asocia con la alimentación de *L. occidentalis* antes de su fecundación, durante la primera quincena de junio en la meseta Norte (Mutke, 2000), o después, por el derrame del contenido del piñón a través del orificio originado por la probóscide o por la alteración de su desarrollo (Bates et al., 2000a; Lesieur et al., 2014). En el mes de julio (2 - 30 julio) predominaron los piñones sin endospermo y sin el tegmen fusionado a la testa (tipo llu) (rango de 17,8% a 32,0%), posiblemente por un estado de desarrollo más avanzado de los tejidos protectores. La ausencia de endospermo en los piñones de *P. pinea* (tipo ll) puede asociarse con la alimentación de *L. occidentalis* antes de la activación de los precursores que inician la síntesis de las células de reserva (Bates et al., 2001), inhibiendo, por lo tanto, la producción de endospermo. En la meseta Norte, la acumulación de sustancias de reserva en el endospermo comienza, junto con la lignificación de la testa, durante la segunda quincena de julio (Mutke, 2000), cuando la alimentación de *L. occidentalis* se

asocia con daños en el endospermo en otras semillas de coníferas (Koerber, 1963; Strong, 2006).

La apariencia externa de los piñones con el endospermo dañado (tipo I) es similar a la descrita por Farinha et al. (2018a) (Figura 28) y, su proporción, como en el caso de *P. contorta* (Connelly y Schowalter, 1991), aumenta tras el inicio de la acumulación de las sustancias de reserva (Bates et al., 2001). La proporción de piñones de *P. pinea* con el endospermo totalmente dañado (It), en las piñas embolsadas con dos hembras, fue significativamente superior a la de los controles (0,3%) en los tratamientos realizados desde la segunda quincena de junio (2,1%) hasta la primera quincena de agosto (rango de 2,4% a 4,0%), tras el inicio del endurecimiento de la esclerotesta en la meseta Norte (Mutke, 2000). *Leptoglossus occidentalis* puede ser el factor causante de este tipo de daño porque es capaz de atravesar los tejidos protectores de los piñones con su probóscide (Farinha et al., 2017, 2018a). La proporción de piñones con el endospermo parcialmente dañado (Ip) no fue significativamente diferente respecto a los controles (3,2%) en ninguno de los tratamientos, aunque su proporción aumentó durante la primera quincena de los meses de agosto (4,1%) y septiembre (4,5%). El aumento de la proporción de piñones con el endospermo parcialmente dañado (Ip) y la reducción de la proporción de piñones con el endospermo totalmente dañado (It: 1,0%) al final de la temporada, puede ser un indicador de que los piñones de *P. pinea* son capaces de seguir sintetizando lípidos y proteínas tras la alimentación de *L. occidentalis*, como es el caso de *P. menziesii* y, por lo tanto, de seguir aumentando el volumen del endospermo (Bates et al., 2001).

La intensidad de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* depende de su madurez, siendo los adultos más dañinos que las ninfas, y de su sexo (Bates et al., 2000a, 2002a). Las hembras son más dañinas que los machos por sus mayores necesidades fisiológicas, sobre todo en algunos momentos de su ciclo de vida (Bates et al., 2000b; Strong, 2015), como es la época de reproducción, cuando requieren un mayor aporte de nitrógeno para la producción de huevos que, por ejemplo, durante el inicio de la agregación invernal (Bates et al., 2000a, 2001, 2002a; Strong, 2006). Según Lesieur et al. (2014) las hembras pueden llegar a consumir un tercio más del endospermo de las semillas de *P. nigra* y *P. sylvestris* que los machos.

Los ensayos de embolsamientos de piñas con *L. occidentalis*, en un periodo determinado y limitado del desarrollo fenológico de las piñas, permiten definir la tipología de los daños causados por la plaga en ese momento de su desarrollo. Los daños ocasionados, en términos de rendimiento, número de piñones y proporción de piñones dañados, deberían ser mayores en una piña expuesta a la alimentación de la población de *L. occidentalis* a lo largo de todo su desarrollo fenológico que en una piña expuesta a la alimentación de un número limitado de individuos durante un periodo de tiempo también limitado.

La comparación de los daños definidos en el ensayo de embolsamiento de piñas con insectos con aquellos observados en el ensayo de exclusión de la alimentación de la población de *L. occidentalis* durante todo el desarrollo fenológico de las piñas en el banco clonal, permiten estimar el impacto causado por las poblaciones de *L. occidentalis* en las cosechas de piñón blanco, y su relación con el “síndrome de la piña seca”. Sin embargo, el umbral de daño económico de *L. occidentalis* en las piñas de *P. pinea* no se ha definido por el desconocimiento de la densidad de población de *L. occidentalis* en el banco clonal, aunque el elevado coste del piñón blanco implica que este umbral tiene que ser bajo (Farinha et al., 2018b).

La proporción de mortalidad de las piñas inmaduras no protegidas (61,7%) es similar a la registrada por de la Mata et al. (2019) en Cataluña (60,0%) en un ensayo de exclusión con piñas de *P. pinea*. La alimentación de la población de *L. occidentalis* puede relacionarse con la mortalidad de las piñas de primer año no protegidas porque su proporción (18,1%) fue significativamente mayor en comparación con el de las protegidas (0,7%). Sin embargo, la baja proporción de mortalidad de las piñas no protegidas, en comparación con la registrada en las piñas embolsadas con ninfas (rango de 40,0% a 100,0%, en julio), sugiere que la población de *L. occidentalis* es atraída, o tiene una mayor preferencia, por las piñas de segundo y tercer año de desarrollo, ya sea por sus cualidades nutricionales o por su mayor visibilidad. Las piñas de primer año son mucho más pequeñas y, generalmente, están rodeadas de acículas (Figura 9b). La mortalidad de las piñas de segundo año puede asociarse con la alimentación de la población de *L. occidentalis* porque el porcentaje de mortalidad de las piñas protegidas de segundo año (2,7%) fue significativamente inferior al de las piñas no protegidas

(43,6%), encontrándose este valor dentro del rango de mortalidad definido en los ensayos de embolsamiento de piñas de segundo año con hembras (rango de 40,0% a 100,0%, excepto a principios de agosto), de acuerdo con el ensayo de Farinha et al. (2018b), en el que la proporción de la mortalidad de las piñas de segundo año de *P. pinea* no protegidas (30,0%) fue seis veces superior respecto a las protegidas. Durante el último año de desarrollo de las piñas, el porcentaje de mortalidad fue similar en las piñas protegidas (8,2%) y no protegidas (8,7%), siendo el doble en comparación con los resultados obtenidos por Farinha et al. (2018b) en las piñas no protegidas (4,3%). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados del ensayo de embolsamiento de piñas de tercer año con hembras (rango de 28,6% a 90,0%, entre abril y mayo), la alimentación de la población de *L. occidentalis* no puede relacionarse con la mortalidad de las piñas de tercer año.

El número de piñones fue significativamente menor en las piñas no protegidas ( $80,2 \pm 2,8$ ) que en las protegidas ( $105,3 \pm 1,6$ ), relacionándose con la alimentación de la población de *L. occidentalis* a lo largo de todo el desarrollo fenológico de las piñas. Esta tendencia también se observó en el ensayo de Farinha et al. (2018b) con piñas de *P. pinea*, siendo el número de piñones de las piñas no protegidas y protegidas, 80,4 y 88,8, respectivamente; y en Norteamérica en piñas de *P. contorta* var. *latifolia* (protegidas: 58,0 - 75,0; no protegidas: 13,0 - 47,0), *P. ponderosa* y *P. contorta* (Pasek y Dix, 1988; Strong, 2015; Strong et al., 2001; Woods et al., 2015). Sin embargo, la reducción del número de piñones por la alimentación de *L. occidentalis* no fue un daño característico en los ensayos de embolsamiento de piñas con ninfas o hembras durante un máximo de dos semanas, por lo que, este tipo de daño está relacionado con el periodo de exposición de las piñas a la alimentación de *L. occidentalis*, que en el caso de las piñas no protegidas del ensayo de exclusión abarcó todo su desarrollo fenológico.

El porcentaje total de piñones dañados de las piñas protegidas (26,4%) fue significativamente menor en comparación con el de las piñas no protegidas (64,4%), siendo esta última proporción mayor que la registrada en la meseta Norte tras la invasión de *L. occidentalis* (49,2%) (Calama et al., 2020). Por lo que la población de *L. occidentalis* está relacionada con este tipo de daño. En Portugal, la proporción de piñones dañados de las piñas protegidas (6,0%) también fue menor que en las piñas no

protegidas (30,0%) (Farinha et al., 2018b). Sin embargo, ambos valores fueron menores en comparación con los del banco clonal, probablemente por la diferente densidad de las poblaciones de *L. occidentalis*. Este tipo de daño, como la reducción del número de piñones, depende del tiempo de exposición de las piñas, en este caso de tercer año, a la alimentación de la población de *L. occidentalis*. Según Calama et al. (2016a, 2016b), la proporción de piñones dañados en piñas muestreadas en diferentes momentos durante su tercer año de desarrollo aumenta con el avance de la temporada en la meseta Norte, siendo del 5,0% entre mayo y junio; del 20,0% - 30,0% entre la segunda quincena de julio y la primera quincena de agosto; y del 70,0% - 80,0% entre la segunda quincena de agosto y octubre. En el banco clonal, la exposición prolongada de las piñas a la alimentación de la población de *L. occidentalis* dio como resultado un incremento de la proporción de piñones dañados por la acumulación de diferentes tipos de daños y, por lo tanto, a una reducción de la proporción de piñones sanos (piñas protegidas: 73,6%; piñas no protegidas: 35,6%). Esta tendencia también fue observada por Farinha et al. (2018b) en las piñas de *P. pinea* de Portugal (protegidas: 90,0%; no protegidas: 70,0%) y por Lesieur et al. (2014) en piñas de *P. nigra* (protegidas: 60,0%; no protegidas: 1,3% - 8,2%) en Francia.

Una baja proporción de piñones sanos supone un bajo rendimiento de la cosecha. En el banco clonal, el rendimiento de las piñas protegidas (3,8%) fue significativamente superior al de las piñas no protegidas (1,8%), coincidiendo con el valor de rendimiento registrado en la meseta Norte tras la invasión de *L. occidentalis* (1,8%) (Calama et al., 2020). En Norteamérica, Pasek y Dix (1998) también relacionaron la reducción del rendimiento de las piñas de *P. ponderosa* no protegidas (0,0% - 10,9%), respecto a las protegidas (3,4% - 25,9%), con la población de *L. occidentalis*.

La proporción de daños por tipo de piñones, excepto los piñones con el endospermo totalmente dañado (It), fue significativamente superior en las piñas no protegidas (abortados: 19,0%; If: 15,1%; Iu: 17,5%; Ip: 4,2%) que en las protegidas (abortados: 14,5%; If: 4,9%; Iu: 1,8%; Ip: 0,6%). El aumento de la proporción de piñones abortados en las piñas no protegidas, respecto a las protegidas de la población de *L. occidentalis*, también se ha observado en piñas de *P. pinea* en Cataluña (de la Mata et al., 2019) y en piñas de *P. ponderosa* y *P. menziesii* en Norteamérica (Pasek y Dix, 1988; Schowalter,

1994). Sin embargo, Farinha et al. (2018b) solamente registraron un 2,0% de piñones abortados, tanto en las piñas protegidas como en las no protegidas de Portugal. Estos autores designaron a los piñones tipo I como un indicador de la alimentación de la población de *L. occidentalis*, sin embargo, no descartaron la influencia de otros factores abióticos. Los piñones sin endospermo (tipo II) puede relacionarse con la alimentación de *L. occidentalis* en el banco clonal y en Portugal, al ser su proporción significativamente mayor en las piñas no protegidas (España: 7,9%; Portugal: 20,6%) que en las protegidas (España: 3,1%; Portugal: 4,6). Por otro lado, mientras que la fracción de piñones con el endospermo parcialmente dañado (Ip) puede asociarse con la población de *L. occidentalis* en el banco clonal, por ser significativamente superior en las piñas no protegidas (4,2%) que en las protegidas (0,6%), la fracción de piñones con el endospermo totalmente dañado (It) no puede relacionarse con la población de *L. occidentalis* porque su proporción no fue significativamente diferente en las piñas protegidas (2,5%) respecto a las no protegidas (3,7%). Sin embargo, en los ensayos de embolsamientos de piñas de tercer año con hembras no se observaron diferencias significativas en la proporción de piñones con el endospermo parcialmente dañado (Ip) y los controles, mientras que la proporción de piñones con el endospermo totalmente dañado (It) fue significativamente superior en los tratamientos realizados desde mediados de junio hasta mediados de agosto (rango de 2,0% a 4,0%) que en los controles (0,3%). Estas diferencias pueden deberse a la mayor intensidad de alimentación de los insectos embolsados sobre una misma piña (mayor proporción de daños tipo It), en comparación con la población de la parcela, que puede alimentarse de diferentes piñas (mayor proporción de daños tipo Ip) (Strong, 2015).

La coincidencia espacio-temporal de los daños asociados con el “síndrome de la piña seca” y la detección de *L. occidentalis* en la cuenca mediterránea hace sospechar que esta plaga exótica es la responsable del decaimiento del rendimiento de las cosechas de piñón blanco en esta región. Sin embargo, no se puede descartar la influencia de otros factores como son la falta de polinización, la infertilidad, la incompatibilidad de gametos, la fisiología de los pinos, el clima u otros factores bióticos, porque también se ha detectado mortalidad en las piñas inmaduras y piñones dañados en las piñas protegidas de la alimentación de *L. occidentalis* (piñas protegidas del Ensayo de

Exclusión - Controles de los Ensayos 1 y 2) (Blatt, 1997; Blatt y Borden, 1996a; Bustamante et al., 2012a, 2012b, 2014; Calama et al., 2020; Farinha et al., 2018b; Katovich y Kulman, 1987; Pasek y Dix, 1988). Por otro lado, los daños en los piñones de las piñas control, detectados en los ensayos de embolsamiento de piñas de segundo y tercer año con dos hembras, podría deberse a la alimentación de la población de *L. occidentalis* antes de que estas fuesen protegidas (Farinha et al., 2018b). Los resultados obtenidos en el ensayo de exclusión permiten relacionar la alimentación de *L. occidentalis* en las piñas de *P. pinea* con el “síndrome de la piña seca”, ya que la sintomatología asociada a ambos es similar: mortalidad de las piñas inmaduras, reducción del número de piñones y aumento de la proporción de piñones dañados, incluyendo piñones abortados y con el endospermo dañado, con apariencia externa aparentemente sana. Por otro lado, los ensayos de embolsamientos de *L. occidentalis* con piñas de *P. pinea* confirman la relación entre la alimentación de esta plaga y los síntomas observados en las piñas expuestas a la alimentación de la población. Además, los resultados de estos ensayos definen la intensidad de los daños causados por *L. occidentalis* en las piñas y piñones en diferentes momentos del desarrollo fenológico de las piñas, facilitando la toma de decisiones para el manejo de esta plaga en masas o plantaciones de *P. pinea*. Coincidiendo con Bates et al. (2002a), el control de las poblaciones de *L. occidentalis* al inicio de la temporada de desarrollo de las piñas puede evitar daños severos en piñas y piñones. Por lo tanto, los métodos de control deberían aplicarse tras la finalización del letargo invernal de *L. occidentalis*, registrándose en el suroeste de la Península Ibérica en febrero (Mas et al., 2013; Naya y Aguado, 2012), mientras que en el banco clonal los primeros adultos, puestas y ninfas de primer estadio (N1) de *L. occidentalis* comenzaron a detectarse a finales de mayo (Figura 55). Sin embargo, hay que tener en cuenta la posible reinfección de las masas o plantaciones por las poblaciones de *L. occidentalis* de masas adyacentes (Strong et al., 2001), pudiendo ser de especies diferentes a *P. pinea* (Tabla 12), como son, por ejemplo, las masas de *P. pinaster* en la meseta Norte.

La domesticación de *P. pinea*, basada en la transformación del actual modelo de aprovechamiento de las piñas en masas naturales y naturalizadas (Mutke et al., 2000, 2012, 2013) por el aprovechamiento de plantaciones, facilitaría la definición de

programas de MIP contra la población de *L. occidentalis*. Por otro lado, estas plantaciones podrían enfocarse a la producción de piñón blanco mediante su implantación en lugares con características ambientales beneficiosas (Tabla 5), el injerto de los pinos con clones seleccionados o la incorporación de prácticas selvícolas culturales desde su plantación (Afonso et al., 2020; Bono y Aletà, 2003; Calama et al., 2008; Calama et al., 2017; Guadaño y Mutke, 2016; Loewe-Muñoz y González, 2012; Loewe-Muñoz et al., 2020; Mutke et al., 2000, 2005a, 2007, 2013; Prada et al., 1997). Entre las estrategias de control de las poblaciones de *L. occidentalis* en plantaciones productoras de piñón blanco se podrían proponer el trampeo masivo de la población mediante uso de semioquímicos, como es el leptotrieno, potencial feromona de atracción de *L. occidentalis* actualmente en estudio (Blatt y Borden, 1996b; Millar et al., 2022), la aplicación puntual de barreras protectoras como insecticidas o bolsas protectoras (Lesieur y Farinha, 2021) o el control biológico (Roversi et al., 2011b).

La definición y aplicación de estas estrategias requiere del conocimiento de la dinámica poblacional de *L. occidentalis* en la zona de control (Ahmad y Kamarudin, 2011). Sin embargo, no se ha definido ningún método de prospección y monitoreo de las poblaciones de esta plaga diferente al monitoreo visual (Naya y Aguado, 2012; Strong, 2015; Tamburini et al., 2012).

El control biológico se basa en el uso de enemigos naturales para reducir la densidad de población plaga y, por lo tanto, su impacto económico (Batra, 1982; Beddington et al., 1978; Eilenberg et al., 2001; Orr, 2009; Peshin y Dhawan, 2009). *Leptoglossus occidentalis* cuenta con enemigos naturales, tanto dentro como fuera de su área de distribución nativa, entre los que destacan los parasitoides de huevos. La prospección del complejo de parasitoides de huevos de *L. occidentalis* nativos de la meseta Norte ha definido una nueva asociación parasitoide-hospedante entre las especies *O. obscurus* y *L. occidentalis*. Además, se ha encontrado de nuevo a la especie *O. pityocampae* parasitando huevos de *L. occidentalis* (Lesieur y Farinha, 2021; Roversi et al., 2011). Ambas especies son generalistas y nativas de España (Mercet, 1921). Mientras que *O. pityocampae* se ha citado en huevos de 50 especies hospedantes pertenecientes a nueve familias y dos órdenes, *O. obscurus* solamente se ha citado en huevos de cuatro especies hospedantes pertenecientes a cuatro familias y dos órdenes (Huang y Noyes,

1994). Hasta el momento no se ha definido el hospedante principal de esta última especie, aunque en España se ha encontrado parasitando huevos de *Hipparchia statilinus* Hufnagel (Lepidoptera: Nymphalidae) (García-Barros, 1989), mariposa que realiza la oviposición en herbáceas de pinares y encinares (Aguado Martin, 2007). El hospedante principal de *O. pityocampae* es la polilla *T. pityocampa*, pero parasita hospedantes secundarios, como *Carcoporis* spp. (Hemiptera: Pentatomidae) (López-Sebastián, 2014), durante el periodo de tiempo transcurrido desde su emergencia y la de *T. pityocampa*, un mes después (Battisti et al., 1988), a finales de julio en el banco clonal (Ponce-Herrero, L., observación personal).

En Norteamérica, la comunidad de parasitoides de *L. occidentalis* está formada por *A. pearsalli*, *O. johnsoni* y por el especialista de huevos del género *Leptoglossus*, *H. pennsylvanicus* (Bates y Borden, 2004; Maltese et al., 2012). A pesar de que la riqueza del complejo de parasitoides de una plaga suele ser mayor en su área nativa (Cornell y Hawkins, 1993), en Europa se han registrado hasta tres parasitoides de *L. occidentalis* en un mismo hábitat. En las masas costeras de *P. pinaster* y alpinas de *P. nigra* de Italia, el complejo de parasitoides de *L. occidentalis* está formado por una única especie, *A. bifasciatus* (Niccoli et al., 2009), mientras que en masas costeras de *P. pinea* del mismo país, aumenta a tres especies, los generalistas *O. pityocampae* y *A. bifasciatus* y el especialista *B. servadeii* (Roversi et al., 2011a), asociado con el género *Thaumetopoea* (Noyes, 2023). En un pinar de *P. nigra* de Francia también se detectaron tres especies, *A. bifasciatus*, *O. pityocampae* y *O. telenomicida* (Lesieur y Farinha, 2021). El complejo de parasitoides de *L. occidentalis* en Europa es diferente, en función de los hábitats de los lugares de prospección, a pesar de pertenecer a países mediterráneos cercanos. Con el paso del tiempo, y la expansión geográfica de *L. occidentalis*, es probable que la riqueza de parasitoides de huevos nativos de Europa aumente, sin embargo, no se espera un cambio en la proporción de parasitoides generalistas y especialistas que forman el complejo (Cornelius et al., 2016b; Cornell y Hawkins, 1993; Herlihy et al., 2016).

En las prospecciones de parasitoides, la riqueza de especies y los valores de sus índices de parasitismo dependen del tipo de sustrato de oviposición muestreado. En general, el monitoreo de puestas realizadas por la población de campo ofrece mejores resultados

que el uso de puestas centinela de laboratorio (Cornelius et al., 2016a, 2016b; Jones et al., 2014; Lesieur y Farinha, 2021), probablemente porque las señales de atracción captadas por los parasitoides son diferentes. Sin embargo, la detección de las puestas realizadas por la población en campo no suele ser una tarea fácil y, aún menos, en una cantidad suficiente como para determinar el impacto de los parasitoides en la población plaga. Esta afirmación se ve reflejada en el total de puestas de *L. occidentalis* encontradas durante el monitoreo semanal de su población en las dos parcelas del banco clonal durante dos años consecutivos, solamente siete (Figura 55). Una solución intermedia, es la instalación de colonias en campo junto con ramas de *P. pinea*, planta hospedante de las hembras en condiciones naturales. Este método permite la obtención constante de huevos simulando las condiciones naturales de oviposición de las hembras y, por lo tanto, posibilitando la atracción de los parasitoides por señales indirectas (volátiles de los adultos o de las plantas) (Colazza et al., 2004; Cusumano et al., 2012a; Howse et al., 2013; Keeling et al., 2004; Lesieur y Farinha, 2021), como es el caso de *H. pennsylvanicus*, especie atraída por las kairomonas de los adultos de *L. australis* (Yasuda, 1998; Yasuda y Tsurumachi, 1995) o de algunas especies de *Ooencyrtus*, como es el caso de la atracción de *O. telenomicida* por *N. viridula*, o de *O. nezarae* por *R. clavatus* (Battisti, 1989; Leal et al., 1995; Peri et al., 2011; Takasu et al., 2002). Por otro lado, las colonias de campo aseguran la calidad de los huevos, evitando posibles alteraciones por el cambio de las condiciones ambientales de laboratorio a campo, como es la desecación de los huevos (Cornelius et al., 2016a). Por todo ello, se espera que los niveles de parasitismo y riqueza de parasitoides obtenidos en este tipo de puestas sean similares a los de las puestas realizadas por la población. Esta hipótesis no se ha demostrado en este estudio, pero se puede considerar, que los resultados obtenidos utilizando puestas procedentes de colonias de campo son más afines a la realidad en comparación con los obtenidos utilizando puestas centinela de laboratorio (Cusumano et al., 2016a, 2016b; Jones et al., 2014).

Los niveles de parasitismo en la meseta Norte (*índice de eficiencia de descubrimiento*: 9,1% - 26,2%; *porcentaje de parasitismo*: 3,3% - 15,1%) son menores que los encontrados en colonias de campo de *L. occidentalis* en Norteamérica (*porcentaje de parasitismo*: 57,0%), dónde la especie *H. pennsylvanicum* es el principal enemigo

natural de *L. occidentalis* (porcentaje de parasitismo: 44,0% - 87,0%). El porcentaje de parasitismo de las especies generalistas *O. johnsoni* (14,2%), *A. perseally* (8,0% - 12,1%) y *Ooencyrtus* spp. (4,0%) fue, en general, mayor en comparación con ambas especies de *Ooencyrtus* en la meseta Norte (rango de 3,3% a 5,4%) excepto en 2017 en el banco clonal (26,2%). El índice de eficiencia de explotación de las puestas de *H. pennsylvanicus* fue del 90,0% en campo (Maltese et al., 2012) y del 75,0% en laboratorio. Esta especie se caracteriza por parasitar la totalidad o la mayoría de los huevos de una puesta antes comenzar a parasitar otra (Sabbatini Peverieri et al., 2013). En la meseta Norte, el índice de eficiencia de explotación de las puestas de los generalistas *O. obscurus* (rango de 25,1% a 38,8%) y *O. pityocampae* (rango de 6,9% a 20,8%) fue bastante menor.

En Europa, se han realizado dos prospecciones de parasitoides nativos en puestas ovipositadas por la población de *L. occidentalis*. En Italia, no se encontraron puestas parasitadas (Maltese et al., 2011), mientras que, en Francia el índice de eficiencia de descubrimiento del complejo de parasitoides (*A. bifasciatus*, *O. telenomicida* y *O. pityocampae*) fue del 24,8% y del 11,4% en 2016 y 2017, respectivamente, con un porcentaje de parasitismo del 8,2% (2016) y 5,9% (2017) (Lesieur y Farinha, 2021). Ambos índices fueron mayores en las puestas ovipositadas por las hembras de las colonias de campo del banco clonal en 2017 (índice de eficiencia de descubrimiento: 26,2%; porcentaje de parasitismo: 15,1%).

En las prospecciones de parasitoides nativos realizadas en Europa con huevos centinela procedentes de laboratorio, el índice de eficiencia de descubrimiento (2016: 5,6%; 2017: 5,7%) fue menor que en la meseta Norte (rango de 9,1% a 26,2%) con huevos procedentes de colonias de campo. Esta misma tendencia se observó en el porcentaje de parasitismo (Francia; 2016: 1,6%; 2017: 1,3%; meseta Norte: rango de 3,3% a 15,1%). El índice de eficiencia de explotación de las puestas centinela, para el complejo de parasitoides de Francia, fue del 2,0% y 1,3% en 2016 y 2017, respectivamente (Lesieur y Farinha, 2021), menor en comparación con el valor obtenido para *O. obscurus* (rango de 25,1% a 38,8%) y *O. pityocampae* (rango de 2,8% a 20,8%) en las puestas de la colonia de campo en la meseta Norte.

A nivel de especie, la *eficiencia de descubrimiento* de las puestas ovipositadas por la población de *L. occidentalis* en Francia fue del 7,2% para *A. bifasciatus*, siendo menor a la proporción parasitada por *O. obscurus* (rango de 14,0% a 35,7%) y *O. pityocampae* (rango de 2,4% a 7,0%), excepto en el banco clonal en 2017 (18,4%). La *eficiencia de descubrimiento* de *Ooencyrtus* spp. fue del 8,9%, menor en comparación con ambas especies de *Ooencyrtus* de la meseta Norte (rango 9,1% a 26,9%). Comparando el *porcentaje de parasitismo* de las especies de ambos países, *A. bifasciatus* parasitó el 4,8% de los huevos de la población de *L. occidentalis*, proporción menor respecto a *O. obscurus* (rango de 6,2% a 19,6%) y mayor respecto a *O. pityocampae* (rango de 1,0% a 3,7%), excepto en el banco clonal en 2017 (11,5%). El *porcentaje de parasitismo* de *Ooencyrtus* spp. fue del 1,3%, siendo menor respecto a ambas especies de *Ooencyrtus* en la meseta Norte (rango de 3,3% a 15,1%) (Lesieur y Farinha, 2021). En Italia, el nivel de parasitismo detectado en puestas centinela procedentes de laboratorio fue mucho menor que en España y Francia, ya que no emergieron ninfas de *L. occidentalis* en menos del 1,0% de los huevos (Roversi et al., 2011a). Sin embargo, el aborto de las ninfas no puede relacionarse solamente con el parasitismo, también puede deberse a la infertilidad de las hembras o a otros factores abióticos (Bates y Borden, 2005).

La población de *O. obscurus* del banco clonal demostró una mayor habilidad para detectar las puestas (*índice de eficiencia de descubrimiento*: rango de 16,8% a 35,7%) y huevos (*porcentaje de parasitismo*: rango de 6,2% a 19,6%), así como para parasitar un mayor número de huevos dentro de la misma puesta (*eficiencia de explotación de la puesta*: rango de 25,1% a 38,8%) que *O. pityocampae* (*índice de eficiencia de descubrimiento*: rango de 2,4% a 18,4%; *porcentaje de parasitismo*: rango de 1,0% a 11,5%, *eficiencia de explotación de la puesta*: rango de 2,8 % a 20,8%). Aunque los valores de estos índices siguieron siendo mayores para *O. obscurus* en la repoblación, no fueron significativamente diferentes de los de *O. pityocampae*. La diferencia de los niveles de parasitismo entre los dos lugares de experimentación se debe, probablemente, a que se trata de hábitats diferentes (Costi et al., 2018), aunque no se puede descartar la influencia del menor número de puestas ovipositadas por las hembras de las colonias de la repoblación (n = 43) en comparación con las del banco clonal en 2019 (n = 125). Sin embargo, solamente se trata de una suposición porque

no se ha definido la relación de densidad-dependencia (Van den Bosch et al., 1982) entre *L. occidentalis* y las dos especies de parasitoides.

En todos los ensayos, el número de puestas y huevos ovipositados por las hembras de *L. occidentalis* varió semanalmente. A pesar de que se espera una menor mortalidad de la progenie en puestas procedentes de colonias de campo que en puestas centinela procedentes de laboratorio (Cornelius et al., 2016a), la *proporción de huevos no eclosionados* de las colonias de campo del banco clonal (rango de 22,1% a 31,6%) fue mayor que en las puestas centinela procedentes de laboratorio expuestas en Francia (8,4% - 11,3%) (Lesieur y Farinha, 2021) y en la Columbia Británica (2,0% - 16,0%), donde se asoció con la infertilidad de las hembras, la muerte de las ninfas, o con el clima cálido y seco (Bates y Borden, 2005). La elevada *proporción de huevos no eclosionados* registrada en la meseta Norte podría deberse a la infertilidad de las hembras o a la parasitación fallida de los huevos. El aborto del hospedante de los huevos parasitados, en los que no llegan a desarrollarse parasitoides, puede asociarse con daños mecánicos causados por el ovipositor en el ooplasma o el embrión, o por la alteración del ooplasma debido a la introducción de sustancias tóxicas durante la oviposición. El parasitoide *O. telenomicida* inyecta sustancias que alteran el ooplasma de los huevos del hospedante causando la muerte de las ninfas. Estas sustancias también pueden proceder de las glándulas salivares que utilizan algunas especies para identificar los huevos como sustrato de oviposición (Cusumano et al., 2012b). Cuando un huevo es parasitado sin éxito no se observan signos internos (detritus) o externos (stalks) que evidencien el intento de parasitismo. Por lo que, aunque este tipo de huevos tienen una apariencia externa de huevos no fértiles o abortados, son realmente huevos parasitados. La detección de este tipo de huevos evita que se desestime el impacto real de los parasitoides en la población del hospedante (Abram et al., 2016). Teniendo en cuenta que se registraron huevos no eclosionados a lo largo del desarrollo de los ensayos, no concentrándose en los momentos de mayor actividad de los parasitoides en los huevos de *L. occidentalis*, se considera que no se ha desestimado el impacto de los parasitoides nativos al categorizar huevos parasitados como huevos no eclosionados.

Descartando los huevos no viables, es decir, de los que no emerge población de *L. occidentalis* por causas diferentes al parasitismo, el *impacto* causado por *O. obscurus*

(rango de 9,9% a 26,7%) y *O. pityocampae* (rango de 1,3% a 15,8%) fue mayor que el estimado mediante el *porcentaje de parasitismo* (*O. obscurus*: rango de 6,2% a 19,6%; *O. pityocampae*: rango de 1,0% a 11,5%).

El número de huevos parasitados sin orificios de salida de parasitoides varió por especie y ensayo, registrándose la mayor proporción en el banco clonal en 2017 (10,7%), en el que también se registró el mayor *porcentaje de parasitismo* (15,1%). La proporción de este tipo de huevos fue menor en todos los ensayos (rango de 2,8% a 10,7%) en comparación con los valores obtenidos en Norteamérica en huevos procedentes colonias de campo parasitados por el principal enemigo natural de *L. occidentalis*, *H. pennsylvanicus* (13,0%) (Maltese et al., 2012).

En todos los ensayos se detectaron huevos depredados, con una porción del corion mordisqueada (Bates y Borden, 2005), siendo su proporción significativamente mayor en la repoblación que en el banco clonal en 2019, posiblemente por una mayor diversidad de especies de depredadores. Durante el desarrollo de los ensayos no se observó la depredación de los huevos.

Las especies *O. obscurus* y *O. pityocampae* no hibernan en las puestas de *L. occidentalis* en condiciones estándar de laboratorio y fotoperiodo natural y, de acuerdo con Lesieur y Farinha (2021), no parasitan de forma simultánea las puestas de *L. occidentalis*. El sexo de la progenie fue mayoritariamente femenino, tanto para *O. obscurus* (576) como para *O. pityocampae* (259). En todos los ensayos emergieron machos de *O. obscurus* (128), mientras que solamente emergieron machos de *O. pityocampae* en el banco clonal en 2017 y en muy baja proporción (5). Este hecho puede deberse a la estrategia de reproducción asexual por partenogénesis telitóquica de *O. pityocampae*, de cuyos huevos no fecundados emergen solamente hembras diploides (2n) (Heimpel y Boer, 2008; Tunca et al., 2019). No se han encontrado referencias sobre el tipo de reproducción de *O. obscurus*.

La *ratio de emergencia*, o número medio de parasitoides emergidos por cada huevo parasitado con orificios de salida, fue superior a uno para las dos especies (*O. obscurus*: 1,7; *O. pityocampae*: 1,5), emergiendo un máximo de cuatro y cinco parasitoides en un solo huevo parasitado por *O. pityocampae* y *O. obscurus*, respectivamente. Por lo que ambas especies son gregarias (Catalán y Verdú, 2005), a diferencia de *H.*

*pennsylvanicus*, especie solitaria que oviposita un solo huevo en cada huevo del hospedante (Abudulai et al., 2001; Sabbatini Peverieri et al., 2012).

En los tres ensayos desarrollados en el banco clonal, las hembras de *L. occidentalis* comenzaron a ovipositar antes de que se detectara la primera puesta parasitada y, continuaron ovipositando tras detectar la última puesta parasitada, es decir, la disponibilidad de huevos en campo permitió conocer el inicio y el final de la actividad de ambas especies de parasitoides en los huevos de *L. occidentalis*. En este lugar experimental, el inicio del periodo de actividad de *O. obscurus* varió en función del año, registrándose la actividad más temprana durante la primera semana de julio en 2019 y la más tardía durante la primera semana de agosto en 2018. En 2017, se puede confirmar la actividad de *O. obscurus* en campo durante la primera semana de julio por la detección de una hembra sobre una puesta no parasitada de *L. occidentalis*. Los picos de actividad de *O. obscurus* observados en 2017 (primera, cuarta y quinta semanas de agosto) y 2018 (cuarta semana de agosto) sugieren que la máxima actividad de este parasitoide en los huevos de *L. occidentalis* se concentra en agosto. La actividad *O. pityocampae* en el banco clonal se extiende desde la primera semana de julio hasta mediados de septiembre, variando la máxima actividad en función del año, concentrándose en la última quincena de agosto en 2018 y, extendiéndose hasta la primera quincena de septiembre en 2017. Los altos niveles de parasitismo registrados en el año 2017 en el banco clonal, en comparación con el resto de los ensayos (Tabla 21), podría deberse a la dinámica poblacional de los parasitoides o a la ausencia de huevos de sus hospedantes principales. En la repoblación no se puede definir el inicio de la actividad de ambas especies en los huevos de *L. occidentalis* porque la primera puesta de *L. occidentalis* disponible (primera semana de julio) fue parasitada. En este lugar experimental, la máxima actividad de *O. obscurus* se concentró durante la tercera semana de julio y la primera de agosto, mientras que la de *O. pityocampae* se concentró durante la primera semana de julio, a diferencia del banco clonal, donde la actividad de esta especie parece ser más frecuente a partir de agosto. En Francia, como en la meseta Norte, no se detectó actividad de parasitismo en las puestas de *L. occidentalis* antes de julio (Lesieur y Farinha, 2021), posiblemente por la ausencia de los parasitoides en campo o por la disponibilidad de huevos de otras especies hospedantes con las que los

parasitoides han coevolucionado (Cornell y Hawkins, 1993). Para definir la fenología de los parasitoides de huevos de *L. occidentalis* en campo se debería conocer el ciclo de vida de sus principales especies hospedantes y el periodo de actividad de los parasitoides en las puestas de estos hospedantes. Como se ha mencionado previamente, la emergencia de *T. pityocampa* comienza a finales de julio en el banco clonal, por lo que *O. pityocampae* no dispone de huevos de su principal hospedante a partir de este periodo, coincidiendo con los picos de actividad de esta especie en los huevos de *L. occidentalis*.

El éxito de un ACB depende de su sincronización con la fase susceptible del hospedante (Crowder, 2007). Para definir la sincronización entre *L. occidentalis*, *O. obscurus* y *O. pityocampae* (Stiling, 1993) se realizaron monitoreos visuales de la población de *L. occidentalis* en dos parcelas del banco clonal durante dos años consecutivos. A pesar de que los datos obtenidos no se consideran lo suficientemente consistentes como para definir el número de generaciones de *L. occidentalis* y su inicio en la meseta Norte, por la dificultad que conlleva la detección de la población y por el posible movimiento de los adultos entre las propias parcelas del banco clonal y los pinares adyacentes, se puede estimar el periodo de actividad de *L. occidentalis* en el banco clonal. Los primeros adultos post-invernates, puestas y ninfas de primer estadio (N1) se detectaron a finales de mayo y principios de junio. En 2018, se observan dos picos de actividad de los adultos, el primero durante la última semana de julio y la primera de agosto; y el segundo durante la tercera semana de octubre. Es probable que estos picos correspondan con la primera y segunda o, incluso tercera, generación de adultos del banco clonal, coincidiendo con los resultados de Mas et al. (2013) y Naya y Aguado (2012) en el suroeste de España. Los resultados obtenidos en el monitoreo visual del año 2019 no proporcionaron tanta información, aunque también se observa un pico de la actividad de los adultos durante la primera mitad de julio que puede indicar el comienzo de una nueva generación. Considerando esta estimación, junto con la detección de huevos ovipositados por la población durante la última semana de mayo y la quinta semana de agosto, se puede asegurar que el estadio susceptible de *L. occidentalis* al parasitismo de *O. obscurus* y *O. pityocampae* está presente en el banco clonal, por lo menos, desde finales de mayo hasta finales de agosto. Teniendo en cuenta que el periodo de actividad

de ambas especies de parasitoides en los huevos de *L. occidentalis* no se detecta en el banco clonal hasta la primera semana de julio, los huevos ovipositados por la generación post-invernante no pueden ser parasitados por la población autóctona de parasitoides. Por lo tanto, la reducción de la población de *L. occidentalis* en la meseta Norte tras la finalización de la oligopausa, cuando causa una mayor intensidad de daños en las piñas y piñones de *P. pinea*, utilizando como ACB a las especies nativas *O. obscurus* y *O. pityocampae*, requiere de un PCB aumentativo basado en la liberación de parasitoides criados en laboratorio.

El complejo de parasitoides de la meseta Norte, aunque solo está formado por dos especies generalistas, es capaz de reducir la población potencial de las colonias de campo de *L. occidentalis* entre un 3,3% y un 15,1% (*porcentaje de parasitismo*). De forma individual, el *impacto* causado por la especie *O. obscurus* (rango de 9,9% y 26,7%) en la población de *L. occidentalis* es mayor que por la especie *O. pityocampae* (rango de 1,3% a 15,8%). Sin embargo, no se observa sincronización (Crowder, 2007; Stiling, 1993) entre el estadio susceptible de *L. occidentalis* y el complejo de parasitoides hasta el mes de julio. Uno de los parámetros pendientes de definir, es la relación de densidad-dependencia (Van den Bosch et al., 1982) entre la población de *L. occidentalis* y su complejo de parasitoides en la meseta Norte, probablemente similar a la observada en Francia, dónde el nivel de parasitismo aumenta con el número de huevos disponibles de *L. occidentalis* (Lesieur y Farinha, 2021). A pesar de que este parámetro no se ha analizado, se puede apreciar que el *porcentaje de parasitismo* no aumentó con el número de huevos disponibles: 2017 (15,1%; n = 1.256), 2018 (3,3%; n = 1.374), 2019 en el banco clonal (3,8%; n = 611), 2019 en la repoblación (5,4%; n = 218). La capacidad de los enemigos naturales como ACB también se estima mediante la definición de los parámetros de la tabla de vida, de la fecundidad de las hembras a lo largo de su vida y de los parámetros demográficos mediante ensayos de laboratorio (Giovannini et al., 2020). Estos parámetros se han definido para la especie *O. obscurus* por tratarse de la especie con los mayores niveles de parasitismo en campo, y por haber sido descrita por primera vez parasitando huevos de *L. occidentalis*.

Se realizaron dos ensayos previos al ensayo principal (Tercer ensayo), en el que se definieron los parámetros de la tabla de vida, la fecundidad de las hembras a lo largo

de su vida y los parámetros demográficos de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en condiciones estándar de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; HR  $40\% \pm 10\%$ ) y luz blanca (16:8; L:O) (Martel et al., 2019; Sabbatini Peverieri et al., 2012). En el Primer ensayo se determinó la influencia del tamaño de la puesta en el *porcentaje de parasitismo*, la *ratio de emergencia* y la *sex ratio (% hembras)* de la progenie, mientras que en el Segundo ensayo se definió la estrategia de reproducción de *O. obscurus*. El tamaño de la puesta no influyó significativamente en el *porcentaje de parasitismo*, de acuerdo con los resultados obtenidos para *O. pityocampae* en huevos de *H. halys* (Tunca et al., 2019), en la *sex ratio (% hembras)* ni en la *ratio de emergencia*. La estrategia de reproducción asexual de *O. obscurus* es la partenogénesis pseudo-arrenotóquica, es decir, mientras que la progenie de huevos fecundados puede estar formada por machos o hembras, la de los huevos no fecundados está formada exclusivamente por machos uniparentales y haploides (n) (Frank y Gillett-Kaufman, 2006; Heimpel y De Boer, 2008).

La baja proporción de hembras que ovipositaron al menos un huevo de *L. occidentalis*, tanto emparejadas (Primer ensayo: 35,2%; Tercer ensayo: 67,5%) como no emparejadas (Segundo ensayo: 30,0%), en comparación con otras especies de parasitoides como son *Ooencyrtus gonoceri* Viggiani (Hymenoptera: Encyrtidae) (86,7%) o *H. pennsylvanicus* (100,0%) (Giovannini et al., 2020; Sabbatini Peverieri et al., 2012), no ha podido ser relacionada con la infertilidad de las hembras porque éstas no se diseccionaron. Heimpel y Rosenheim (1998) asociaron la infertilidad de las hembras de *Aphytis aonidiae* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) emergidas en laboratorio con un patógeno, mientras que Martel et al. (2019) sugieren que los machos pueden interrumpir la oviposición de las hembras. Esta última hipótesis no es válida para las hembras de *O. obscurus* porque la fecundidad de las hembras no emparejadas (3,2 parasitoides/hembra) fue menor que la de las hembras emparejadas del Primer (6,1 parasitoides/hembra) y Tercer ensayo (7,7 parasitoides/hembra). Por lo tanto, no se ha determinado el factor causante de la baja proporción de hembras que ovipositaron, aunque podría estar relacionado con señales indirectas empleadas por los parasitoides para aceptar el sustrato de oviposición, como son las feromonas emitidas por los adultos de los hospedantes o los volátiles emitidos por los pinos por la alimentación u oviposición de los adultos en los ramillos (Colazza et al., 2004; Cusumano et al., 2012a),

o incluso con las “señales de impresión” que utilizan algunos parasitoides para reconocer los sustratos de oviposición. Esta teoría sugiere que algunas especies son capaces de identificar olores a los que estuvieron expuestos durante su desarrollo larvario y, que son indicadores del sustrato de oviposición (Howse et al., 2013). Si esta hipótesis es aplicable a *O. obscurus*, no demostrado en este ensayo, puede que parte de las hembras no parasitasen ningún huevo porque fueron expuestas, accidentalmente, a olores durante su desarrollo que después no asociaron con las puestas de *L. occidentalis* ofrecidas como sustrato de oviposición.

El *porcentaje de parasitismo* es uno de los parámetros que define el éxito de un parasitoide como ACB. A pesar de que el *porcentaje de parasitismo* del Tercer ensayo (2,8%) fue mucho menor que el registrado en campo (rango de 7,8% a 19,6%) y el obtenido en el Primer (34,0%) y Segundo (37,7%) ensayo, la *fecundidad* de las hembras del Tercer ensayo (67,5%) fue mucho mayor que la de las hembras del Primer (35,2%) y Segundo (30,0%) ensayo. En este caso, el *porcentaje de parasitismo* del Tercer ensayo está enmascarando el potencial de *O. obscurus* como ACB de *L. occidentalis*, pudiendo relacionarse con el elevado número de huevos expuestos ( $n = 4.476$ ) al parasitismo de las 27 hembras que ovipositaron al menos un huevo a lo largo de toda su vida, considerando su corto periodo de oviposición (2,3 días) y su extenso periodo post-reproductivo (10,6 días), durante el cual se siguieron ofreciendo huevos. Mientras que el número de huevos expuestos en el Primer ( $n$  hembras = 19;  $n$  huevos = 188) y Tercer ensayo ( $n$  hembras = 9;  $n$  huevos = 77) fue bastante menor, consistiendo en un único grupo de huevos.

Se espera que el impacto de los enemigos naturales de una plaga exótica sea menor (Cornell y Hawkins, 1993) en comparación con el causado por los enemigos naturales que han coevolucionado con ésta en su área nativa. *Hadronotus pennsylvanicus* y *O. obscurus* son un claro ejemplo de esta premisa, mientras *H. pennsylvanicus* es capaz de parasitar el entre el 71,8% y el 87,0% de los huevos de *L. occidentalis* en laboratorio (Roversi et al., 2011b; Sabbatini Peverieri et al., 2012), el porcentaje máximo registrado en los tres ensayos realizados con *O. obscurus* en laboratorio fue del 37,7%. Sin embargo, diferentes especies de parasitoides que no han coevolucionado con un hospedante plaga son capaces de parasitar sus huevos en elevadas proporciones, como

es el caso de *Ooencyrtus lucidus* Triapitsyn & Ganjisaffar (Hymenoptera: Encyrtidae) en huevos de *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Hemiptera: Pentatomidae) (rango de 42,2% a 89,9%) (Ganjisaffar y Perring, 2020); *O. gonoceri* en huevos de *H. halys* (206,8 huevos parasitados/por hembra) (Giovannini et al., 2020), *O. pityocampae* en huevos de *H. halys* (rango de 34,2% a 62,7%) (Tunca et al., 2019) y *L. occidentalis* (rango de 2,5 a 5,7 huevos/hembra) (Binazzi et al., 2013), siendo de 3,4 a 4,5 la media de huevos parasitados por cada hembra de *O. obscurus*.

Los PCB clásicos consisten en la introducción de uno o varios enemigos naturales de una plaga no autóctonos del lugar de aplicación del programa. Los enemigos naturales pueden haber coevolucionado o no con la plaga, pero en ambos casos, el enemigo natural tiene un alto impacto sobre su población, al menos en condiciones de laboratorio (Martel et al., 2019; Power, 2020; Sabbatini Peverieri et al., 2012). La introducción del nuevo organismo tiene como objetivo equilibrar la densidad de la población plaga situándola por debajo del umbral de daño económico (Eilenberg et al., 2001). *Hadronotus pennsylvanicus* fue propuesto como ACB de *L. occidentalis* en Europa tras definir sus parámetros biológicos y reproductivos el laboratorio (Sabbatini Peverieri et al., 2012). El porcentaje de parasitismo de *H. pennsylvanicus* (n = 40; 5 - 7 huevos; 2 horas de exposición) (71,8%) fue más del doble que el obtenido para *O. obscurus* en el Primer ensayo (34,0%) (n = 19; 5-13 huevos; 96 horas de exposición). La comparación de los parámetros de la tabla de vida de *O. obscurus* y *H. pennsylvanicus* favorecen la selección de este último como ACB de *L. occidentalis*. La longevidad de las hembras de *H. pennsylvanicus* (40,2 días) fue más del doble en comparación con *O. obscurus* (16,9 días), siendo su *ratio de fecundidad* (144,5 progenie/hembra) casi veinte veces superior (7,7 progenie/hembra), parámetro influido por el *periodo medio de oviposición*, diez veces mayor para *H. pennsylvanicus* (23,0 días) que para *O. obscurus* (2,3 días). La *supervivencia pre-imaginal* fue alta para ambas especies (*H. pennsylvanicus*: 99,1%; *O. obscurus*: 96,7%), con un *periodo de desarrollo pre-imaginal* medio mayor para las hembras que para los machos (*H. pennsylvanicus*, hembras: 18,2 días, machos: 18,1 días; *O. obscurus*, hembras: 21,6 días, machos: 20,6 días), ventaja evolutiva para los machos, ya que aumenta su probabilidad de fecundar hembras recién emergidas (Ganjisaffar y Perring, 2020; Martel et al., 2019). La *ratio de emergencia* define el

carácter gregario o solitario de los parasitoides. *Hadronotus pennsylvanicus* es una especie solitaria porque su progenie consiste en un solo individuo por huevo parasitado (Abudulai et al., 2001; Sabbatini Peverieri et al., 2012), mientras que, como es típico del género *Ooencyrtus* (Nechols et al., 1989), *O. obscurus* es gregario (*ratio de emergencia*: 1,7 progenie/huevo). Por ello, las hembras de *O. obscurus* necesitan menos huevos de *L. occidentalis* para ovipositar su reserva de huevos que una hembra de *H. pennsylvanicus*, la que necesita un huevo de *L. occidentalis* por cada huevo ovipositado. Por lo que se espera que el impacto causado por *H. pennsylvanicus* en la población de *L. occidentalis* sea mayor que el causado por *O. obscurus* (Cornelius et al., 2018). Sin embargo, *H. pennsylvanicus* se caracteriza por parasitar todos o la mayoría de los huevos de una puesta antes de buscar una nueva, posiblemente limitando su capacidad dispersión, requisito necesario para su introducción como ACB (Eilenberg et al., 2001). La *sex ratio* (% hembras) fue mayor para *H. pennsylvanicus* (72,45%) que para *O. obscurus* (41,2%), aunque la progenie de los huevos no fértiles de ambas especies está formada por machos uniparentales y haploides (n) (Frank y Gillett-Kaufman, 2006; Heimpel y De Boer, 2008; Nechols et al., 1989). En este sentido, *O. pityocampae* cuenta con la ventaja de reproducirse asexualmente por telitoquía (Ceballo y Walter, 2004; Frank y Gillett-Kaufman, 2006) produciendo solamente hembras diploides (2n) (Tunca et al., 2019).

En el gráfico que relaciona la longevidad de las hembras y su fecundidad vitalicia (Figura 57), la supervivencia de las hembras suele decrecer paulatinamente con el paso de los días, por lo que la reducción progresiva de la longevidad de las hembras de *O. obscurus* con el paso de tiempo es un indicador de que las condiciones de desarrollo de los ensayos fueron las adecuadas. La fecundidad varía con el tiempo en función del comportamiento reproductivo de la especie. Las hembras de *H. pennsylvanicus* y *O. obscurus* pueden comenzar a ovipositar tras emerger, aunque por su carácter débilmente sinovigénico (*índice de ovigénia*; *H. pennsylvanicus*: < 0,18, *O. obscurus*: 0,27) la mayoría de sus huevos siguen inmaduros y las hembras necesitan alimentarse para completar la maduración de los huevos, por lo que la oviposición diaria depende de las capacidades fisiológicas de las hembras (Fernando y Walter, 1999; Jervis et al., 2001). La distribución de la oviposición a lo largo de la vida de *H. pennsylvanicus* (Figura

33) y *O. obscurus* (Figura 57) sigue una tendencia escalonada y progresiva (Figura 34), es decir, la disponibilidad de huevos maduros decrece con la oviposición y aumenta con la maduración de huevos (Heimpel y Rosenheim, 1996). Los huevos de las hembras de *O. obscurus* maduran antes que los de *H. pennsylvanicus*, ya que el 50,0% de los huevos fueron ovipositados durante su segundo y sexto día de vida, y el 90,0% al onceavo y quinceavo día, respectivamente. Sin embargo, la dinámica de maduración de los huevos de *O. obscurus* tiene que ser definida mediante la disección de hembras de diferentes edades (Aung et al., 2010).

La *sex ratio* (% hembras) de la progenie de *O. obscurus* no fue influida por el tamaño de la puesta y aumentó de forma significativa con la edad (Figura 56). En general, la proporción de machos de la progenie aumenta con la edad de la hembra por el agotamiento del esperma almacenado, como es el caso de *H. pennsylvanicus*, especie que se aparea una sola vez tras la emergencia (Ganjisaffar y Perring, 2020; Sabbatini Peverieri et al., 2012). La tendencia de la *sex ratio* de la progenie de *O. obscurus* puede indicar que las hembras copulan varias veces a lo largo de su vida.

Tras definir la longevidad y la fecundidad de las hembras a lo largo de su vida (Figura 57) se pueden definir sus parámetros demográficos, que son aquellos que indican la dinámica poblacional futura. La comparación de los parámetros demográficos de *O. obscurus* y *H. pennsylvanicus* también favorecen la selección de este último como ACB de *L. occidentalis*. La tasa bruta de reproducción (*GRR*) define el crecimiento potencial de la población sin tener en cuenta límites ecológicos, es decir, es el límite poblacional máximo de crecimiento poblacional, siendo el valor real inferior ( $R_0$ ) al tratarse de un parámetro difícil de conseguir en condiciones naturales. Este parámetro es mucho mayor para *H. pennsylvanicus* (144,46 hembras/hembra/generación) que para *O. obscurus* (3,55 hembras/hembra/generación). La tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) o el ratio de reemplazamiento, define la progenie media producida por una sola hembra a lo largo de toda su vida teniendo en cuenta la mortalidad. Ese parámetro fue menor que la *GRR* en ambas especies, y siguió siendo mucho mayor para *H. pennsylvanicus* (101,86 hembras/hembra/generación) que para *O. obscurus* (3,19 hembras/hembra/generación). El ritmo de incremento de la población de *H. pennsylvanicus* es mucho mayor respecto al de *O. obscurus* para un tiempo

generacional ( $T$ ) similar (*H. pennsylvanicus*: 22,48 días; *O. obscurus*: 23,96 días). La tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ) define el crecimiento potencial diario de una población. Siguiendo la misma tendencia que  $R_0$ , fue mucho mayor para *H. pennsylvanicus* ( $r_m$ : 0,203 hembras/hembra/día) que para *O. obscurus* ( $r_m$ : 0,05 hembras/hembra/día). En ambas especies, la población aumenta porque el número de individuos aumenta diariamente ( $R_m > 1$ ) y el número de individuos que constituye la nueva generación es mayor que el número de individuos de la población anterior ( $R_0 > 1$ ). El menor ritmo de crecimiento diario de la población de *O. obscurus* influyó en su periodo de duplicación de la población ( $T_d$ ), siendo mucho mayor (14,34 días) respecto al de *H. pennsylvanicus* (3,37 días).

Tras la comparación de los parámetros de la tabla de vida y los parámetros demográficos de *O. obscurus* y *H. pennsylvanicus* en huevos de *L. occidentalis*, y tomando como referencia los valores de algunos de estos parámetros para otras especies de parasitoides de la familia Encyrtidae y Scelionidae criados en huevos de especies con las que han coevolucionado o no (Tabla 26), no se puede concluir que *O. obscurus* sea un buen candidato como ACB nativo de *L. occidentalis* a pesar de sus aceptables niveles de parasitismo en campo. Sin embargo, su uso como ACB simplifica la evaluación de riesgos que supondría su liberación, en comparación con la liberación de especies exóticas (Roversi et al., 2017). A pesar de que la especie exótica *H. pennsylvanicus* fue propuesta como ACB de *L. occidentalis* en Europa, por los resultados obtenidos en laboratorio y su bajo impacto sobre especies no objetivo presentes en Italia (Roversi et al., 2014), es necesaria la evaluación de su comportamiento en los ecosistemas europeos (Sabbatini Peverieri et al., 2012; Cornelius et al., 2018; Martel et al., 2019), de su capacidad de adaptación a los nuevos hábitats y fuentes de alimento que aseguren su longevidad y maduración de los huevos, de su éxito reproductivo en campo y de su capacidad de establecimiento y dispersión (Ceballo y Walker, 2004; Chailleux et al., 2012; Desneux, et al., 2007; Eilenberg et al., 2001; Martel et al., 2019; Sabbatini Peverieri et al., 2012; Stiling, 1993). Además, sería conveniente realizar una nueva evaluación de los riesgos asociados con su introducción (Van Lenteren et al., 2003) en especies no objetivo susceptibles de ser parasitadas diferentes a las evaluadas en Italia, debido al amplio rango de distribución de *L. occidentalis* en Europa (Binazzi et al., 2016;

Roversi et al., 2013). Por otro lado, no puede descartarse que esta especie sea introducida de forma accidental en Europa, como ha ocurrido recientemente en Japón (Komeda et al., 2020).

La gran diferencia entre los valores de los parámetros demográficos de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* en comparación con aquellos obtenidos con otros parasitoides en huevos de especies con las que han coevolucionado o no (Tabla 26) puede hacer sospechar que las condiciones de desarrollo de los ensayos no fueran las adecuadas, ya que se realizaron en condiciones de laboratorio sin controlar la temperatura y ni la humedad, como suele hacerse en este tipo de ensayos. Martel et al. (2019) también definieron los parámetros demográficos de *G. gonikopalense* en huevos de *B. hilaris* en condiciones de laboratorio, siendo sus valores de tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ), tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_d$ ) menores respecto al resto de los ensayos realizados en condiciones controladas (Tabla 26). Por lo que no hay que descartar que los valores demográficos de *O. obscurus* en huevos de *L. occidentalis* mejorasen si los ensayos se desarrollasen en condiciones controladas de temperatura y humedad.

El género *Ooencyrtus* ha sido previamente utilizado con éxito como ACB en PCB (Huang y Noyes, 1994; Noyes, 1980; Noyes y Hayat, 1994), por lo que no hay que descartar el uso de especies europeas de este género, como son *O. obscurus*, *O. pityocampae* y *O. telenomicida*, como ACB de *L. occidentalis*. La combinación de estas especies podría aumentar su impacto en la población de *L. occidentalis* por adición de sus ventajas, como es el carácter débilmente sinovigénico y la capacidad de *O. obscurus* y *O. pityocampae* para parasitar huevos de *L. occidentalis* en avanzado estado de desarrollo, incrementando las probabilidades de realizar la oviposición sin necesidad de gastar recursos buscando huevos recién ovipositados, el carácter telitóquico de *O. pityocampae* o la amplia distribución de su hospedante principal, *T. pityocampa* (Binazzi et al., 2013; Martel et al., 2019; Power et al., 2020; Sabbatini Peverieri et al., 2013; Straser et al., 2022; Tunca et al., 2022).

El control biológico con ACB nativos permite equilibrar la densidad de la población plaga a la vez que se asegura la conservación de la biodiversidad, sin embargo, las especies de parasitoides de huevos de *L. occidentalis* nativas de Europa no son tan buenas

candidatas como ACB en comparación con el principal parasitoide de huevos en su área nativa, *H. pennsylvanicus*. En cualquier caso, el uso de parasitoides de huevos como ACB, para reducir los daños causados por *L. occidentalis* en piñas y piñones de *P. pinea*, requiere de sueltas tras la finalización de la oligopausa de esta especie, cuando ocasiona los daños más severos en las cosechas de piñón blanco.

**Tabla 26. Comparación de algunos parámetros de la tabla de vida y demográficos de varios parasitoides de huevos y plagas.** C: Coreidae P: Pentatomidae; A: reproducción arrenotóquica; <sup>1</sup>sex ratio (machos/hembras); <sup>2</sup>sex ratio (% hembras) (Catalán y Verdú, 2005; Ganjisaffar y Perring, 2020; Giovannini et al., 2020; Martel et al., 2019; Mohammadpour et al., 2018; Nechols et al., 1989; Power, 2020; Roversi et al., 2017; Sabbatini Peverieri et al., 2012; Straser et al., 2022; Tunca et al., 2019).

Familia	Especie parasitoide	Especie hospedante	Familia del hospedante	Coevolución parasitoide-hospedante	Longevidad de las hembras (días)	Periodo de oviposición (días)	Fecundidad (progenie/hembra)	Sex ratio	Reproducción	Tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ) (hembras/hembra/día)	Tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) (hembras/hembra/generación)	Duración media de una generación ( $T_d$ ) (días)	Tiempo de duplicación de la población ( $T_d$ ) (días)
Encyrtidae	<i>O. obscurus</i>	<i>L. occidentalis</i>	C	No	16,9	2,3	7,7	41,2 <sup>2</sup>	A	0,05	3,19	23,96	14,34
	<i>O. anasae</i>	<i>A. tristis</i>	C	Si	40,2	7,1	32,2	81,0 <sup>2</sup>	A	1,160	23,9	19,9	4,3
	<i>O. pityocampae</i>	<i>B. signatum</i>	P	Si	9,0	14,5	122,5	1:4,2 <sup>1</sup>	T	-	-	-	-
	<i>O. telenomicida</i>	<i>G. lineatum</i>	P	Si	45,9	20,4	94,6	71,2 <sup>1</sup>	A	1,154	52,96	25,87	4,52
	<i>O. telenomicida</i>	<i>N. viridula</i>	P	No	25,3	30,9	120,9	0,42 <sup>1</sup>	A	-	-	-	-
	<i>O. pityocampae</i>	<i>B. hilaris</i>	P	No	42,6	18,8	42,7	100,0 <sup>1</sup>	T	-	-	-	-
	<i>O. lucidus</i>	<i>B. hilaris</i>	P	No	70,8	37,3	227,3	-	A	0,171	103,8	27,1	4,0
	<i>O. mirus</i>	<i>B. hilaris</i>	P	No	58,1	40,4	118,0	80,5 <sup>2</sup>	A	0,175	106,2	26,7	4,0
	<i>O. gonoceri</i>	<i>G. italicum italicum</i>	P	No	46,6	38,2	173,8	35,2 <sup>2</sup>	-	0,168	48,37	23,02	4,11
	Scelionidae	<i>H. pennsylvanicus</i>	<i>L. occidentalis</i>	C	Si	40,3	23,0	144,6	72,5 <sup>2</sup>	A	0,206	101,86	22,48
<i>H. pennsylvanicus</i>		<i>L. zonatus</i>	C	Si	30,6	10,1	39,7	92,8 <sup>1</sup>	A	0,22	35,70	17,0	3,68
<i>H. pennsylvanicus</i>		<i>A. tristis</i>	C	Si	39,2	22,0	80,7	78,0 <sup>2</sup>	A	0,195	57,8	20,8	3,5
<i>G. gonikopalense</i>		<i>B. hilaris</i>	P	No	31,9	-	59,2	46,3 <sup>1</sup>	-	0,094	26,4	27,6	6,67

## 6. Conclusiones

Las conclusiones extraídas de los resultados de los ensayos desarrollados para dar respuesta a los objetivos definidos en esta tesis se enumeran a continuación:

- (I) *Leptoglossus occidentalis* es uno de los factores responsables del decaimiento de la cosecha de piñón blanco, conocido como “síndrome de la piña seca”, ya que los daños causados por su alimentación son similares a los síntomas asociados con dicho síndrome. Sin embargo, los daños detectados en piñas protegidas de la plaga desde su polinización indican la existencia de otros factores, internos o externos, relacionados con el decaimiento de la cosecha de piñón blanco.
- (II) La severidad de los daños causados por la alimentación de *L. occidentalis* varía en función del momento del desarrollo fenológico de las piñas y piñones en la que se produce, reduciéndose con el avance del desarrollo. La mortalidad de las piñas durante su primer y tercer año de desarrollo sigue una tendencia estacional, reduciéndose con la lignificación de las brácteas; mientras que la mortalidad de las piñas de segundo año es elevada a lo largo de toda la temporada. El rendimiento y la proporción de piñones sanos aumenta de forma progresiva con la maduración de los piñones, mientras que la severidad de los daños en los piñones disminuye siguiendo la siguiente secuencia: piñones abortados, piñones sin endospermo con el tegmen fusionado (Ilf) o no fusionado a la testa (Ilu) y piñones con el endospermo total (It) o parcialmente dañado (Ip).
- (III) La población de *L. occidentalis* es responsable de la mortalidad de las piñas inmaduras, de la reducción del número de piñones por piña, del rendimiento y de la proporción de piñones sanos y del aumento de la proporción de piñones dañados.
- (IV) La comunidad de parasitoides nativos de huevos de *L. occidentalis* en la meseta Norte está formada por las especies generalistas *O. pityocampae* y *O. obscurus*. La última especie no ha sido citada previamente parasitando huevos de *L. occidentalis*, por lo que se trata de una nueva relación parasitoide-hospedante.

- (V) La especie *O. obscurus* presenta una mayor aptitud para parasitar puestas y huevos de *L. occidentalis* en campo en comparación con *O. pityocampae*. El valor del índice de eficiencia de descubrimiento de las puestas, del porcentaje de parasitismo, del impacto sobre la población de *L. occidentalis* y del índice de eficiencia de explotación de las puestas es mayor para *O. obscurus* en los dos hábitats en los que se desarrollan los ensayos y a lo largo de tres años en uno de los hábitats.
- (VI) El periodo máximo de actividad de los parasitoides nativos en los huevos de *L. occidentalis* abarca desde la primera semana de julio hasta la segunda semana de septiembre, no solapándose con el comienzo de la actividad de *L. occidentalis* a finales de mayo.
- (VII) El tamaño de la puesta de *L. occidentalis* no influye en la probabilidad de que *O. obscurus* parasite los huevos, en la ratio de emergencia de los parasitoides ni en la *sex ratio* de la progenie.
- (VIII) La estrategia de reproducción asexual de *O. obscurus* es la partenogénesis *pseudo-arrenotóquica*. La progenie de los huevos fecundados puede estar formada por machos o hembras, mientras que la de los huevos no fecundados está formada exclusivamente por machos uniparentales y haploides (n).
- (IX) Los parámetros demográficos, de la tabla de vida y la relación entre la fecundidad y longevidad de las hembras sugieren que la capacidad de *O. obscurus* como agente de control biológico de *L. occidentalis*, en condiciones estándar de laboratorio, es menor que la definida para su principal enemigo natural, *H. pennsylvanicus* en Norteamérica. Sin embargo, el carácter nativo de *O. obscurus* lo hace un buen candidato como ACB.
- (X) La apariencia externa de los huevos de *L. occidentalis* parasitados por *O. obscurus* varía con el tiempo: la primera señal de parasitismo que se observa es la presencia de stalks sobre el corion del huevo, a los 3,9 días de media se comienzan a distinguir puntos o líneas oscuras bajo el corion, a los 8,5 días se comienza a detectar el detritus de la larva y, finalmente, a los 21,0 días comienzan a emerger los parasitoides.

## Referencias

- Abellanas, B. 1990. Estudios básicos para la mejora genética del pino piñonero (*Pinus pinea* L.): comportamiento reproductivo. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Abellanas, B., Pardos, J.A., 1989. Seasonal development of female strobilus of stone pine (*Pinus pinea* L.). Ann. For. Sci. 46, 51s-53s. <https://doi.org/10.1051/forest:19890508>
- Abram, P.K., Brodeur, J., Burte, V., Boivin, G. 2016. Parasitoid-induced host egg abortion: an underappreciated component of biological control services provided by egg parasitoids. Biol. Control, 98, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.002>
- Abudulai, M., Shepard, B.M., Mitchell, P.L. 2001. Parasitism and predation on eggs of *Leptoglossus phyllopus* (L.)(Hemiptera: Coreidae) in cowpea: impact of endosulfan sprays. J. Agric. Urban Entomol., 18, 105-115.
- Afonso, A., Gonçalves, A.C., Pereira, D.G. 2020. *Pinus pinea* (L.) nut and kernel productivity in relation to cone, tree and stand characteristics. Agrofor. Syst., 94, 2065-2079. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00523-4>
- Aguado Martín, O.L. 2007. Las mariposas diurnas de Castilla y León-I (Lepidópteros Ropalóceros). Especies, biología, distribución y conservación. Junta de Castilla y León: Conserjería de Medio Ambiente, Fundación Patrimonio Natural.
- Ahmad, S.N., Kamarudin, N. 2011. Pheromone trapping in controlling key insect pests: progress and prospects. PORIM Bulletin, 62, 12-24.
- 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, 281-284.  
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.04.001>

Allen, R.C. 1969. A revision of the genus *Leptoglossus* Guerin (Hemiptera: Coreidae). Entomol. Amer. Vol. 45, 35-140.

Anderson, J.F., Kaya, H.K. 1974. Diapause induction by photoperiod and temperature in the elm spanworm egg parasitoid, *Ooencyrtus* sp. Ann. Entomol. Soc. Am., 67, 845–849.  
<https://doi.org/10.1093/aesa/67.6.845>

Anderson, J.F., Kaya, H.K. 1975. Influence of temperature on diapause termination in *Ooencyrtus ennomus*, an elm spanworm egg parasitoid. Ann. Entomol. Soc. Am., 68, 671-672. <https://doi.org/10.1093/aesa/68.4.671>

Anderton, L.K., Jenkins, M.J. 2001. Cone entomofauna of whitebark pine and alpine larch (Pinaceae): potential impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) and a new record of *Strobilomyia macalpinei* (Diptera: Anthomyiidae). Can. Entomol., 133, 399-406. <https://doi.org/10.4039/Ent133399-3>

Antor, R.J. 2010. Catálogo de los artrópodos del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. Natural de Aragón: revista trimestral del Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón, 39, 24-25.

Aukema, B. 2008. De invasieve Noord-Amerikaanse wants *Leptoglossus occidentalis* bereikt ook Nederland (Heteroptera: Coreidae). Nederlandse Faunistische Mededelingen, 29, 78-80.

Aukema, B., Libeer, R. 2007. Eerste waarneming van *Leptoglossus occidentalis* in België (Heteroptera: Coreidae). Bull. Soc. R. Belg. Entomol. 143, 92–93.

Aung, K.S.D., Takasu, K., Ueno, T., Takagi, M. 2010. Effect of temperature on egg maturation and longevity of the egg parasitoids *Ooencyrtus nezarae* (Ishii)(Hymenoptera: Encyrtidae). J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 55, 87-89. <https://doi.org/10.5109/17807>

Awan, H.U.M., Pettenella, D. 2017. Pine nuts: a review of recent sanitary conditions and market development. Forests, 8, 367. <https://doi.org/10.3390/f8100367>

Barclay, M., Nikolaeva, S. 2018. Arrival in Kazakhstan of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae); a North American invasive species expands 2,500 kilometres to the east. Klapalekiana, 54, 1-3.

Barta, M. 2009. New facts about distribution and host spectrum of the invasive Nearctic conifer pest, *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in south-western Slovakia. Folia faun. Slov., 14, 139-142.

Barta, M. 2010a. Pathogenicity assessment of entomopathogenic fungi infecting *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae). Czech Mycol., 62, 67-78.

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

Barta, M. 2016. Biology and temperature requirements of the invasive seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Europe. J. Pest. Sci., 89, 31-44. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0673-z>

Bates, S.L. 1999. Impact of feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae), on yield, seed storage reserves and seedling vigour in Douglas-Fir. Tesis doctoral, Simon Fraser University.

Bates, S.L. 2005. Damage to common plumbing materials caused by overwintering *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can. Entomol.*, 137, 492-496. <https://doi.org/10.4039/n05-005>

Bates, S.L., Borden, J.H. 2004. Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in British Columbia. *J. Entomol. Soc. B.C.*, 101, 143-144.

Bates, S.L., Borden, J.H. 2005. Life table for *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) and prediction of damage in lodgepole pine seed orchards. *Agric. For. Entomol.*, 7, 145-151. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9555.2005.00254.x>

Bates, S.L., Borden, J.H., Kermode, A.R., Bennett, R.G. 2000a. Impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on Douglas-fir seed production. *J. Econ. Entomol.*, 93, 1444-1451. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.5.1444>

Bates, S.L., Borden, J.H., Savoie, A., Blatt, S.E., Lait, C.G., Kermode, A.R., Bennett, R.G. 2000b. Impact of feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on the major storage reserves of mature Douglas-fir (Pinaceae) seeds. *Can. Entomol.*, 132, 91-102. <https://doi.org/10.4039/Ent13291-1>

Bates, S.L., Lait, C.G., Borden, J.H., Kermode, A.R. 2001. Effect of feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*, on the major storage reserves of developing seeds and on seedling vigor of Douglas-fir. *Tree Physiol.*, 21, 481-487. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.7.481>

Bates, S.L., Lait, C.G., Borden, J.H., Kermode, A.R. 2002a. Measuring the impact of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) on seed production in lodgepole pine using an antibody-based assay. *J. Econ. Entomol.*, 95, 770-777. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.4.770>

Bates, S.L., Strong, W.B., Borden, J.H. 2002b. Abortion and seed set in lodgepole and western white pine conelets following feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera:

Coreidae). J. Econ. Entomol., 31, 1023-1029. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.6.1023>

Batra, S.W. 1982. Biological control in agroecosystems. Science, 215, 134-139. Doi: [10.1126/science.215.4529.134](https://doi.org/10.1126/science.215.4529.134)

Battisti, A. 1988. Host-plant relationships and population dynamics of the Pine Processionary Caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermuller). J. Appl. Entomol., 105, 393-402. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1988.tb00202.x>

Battisti, A. 1989. Field studies on the behaviour of two egg parasitoids of the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa*. Entomophaga, 34, 29–38. <https://doi.org/10.1007/bf02372584>

Beddington, J.R., Free, C.A., Lawton, J.H. 1978. Characteristics of successful natural enemies in models of biological control of insect pests. Nature. 273, 513–519. <https://doi.org/10.1038/273513a0>.

Ben Jamâa, M.L., Mejri, M., Naves, P., Sousa, E. 2013. Detection of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) in Tunisia. Afr. Entomol., 21, 165-167.

Benelli, G., Canale, A., Santini, L., Lucchi, A. 2014. Scent gland apparatus in the Western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae). Entomol. Sci., 17, 336-341. <https://doi.org/10.1111/ens.12063>

Beránek, J. 2007. First records of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Pentatomorpha: Coreidae) in the Czech Republic. Plant Prot. Sci., 43, 165. doi:[10.17221/2242-PPS](https://doi.org/10.17221/2242-PPS)

Bernardinelli, I., Rovato, M., Zandigiacomo, P. 2006. Life history and laboratory rearing of *Leptoglossus occidentalis*. IUFRO Working Party 7.03.10, Proceedings of the Workshop. Gmunden, Austria. September 11–14.

Binazzi, F., Benassai, D., Peverieri, G.S., Roversi, P.F. 2013. Effects of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera Coreidae) egg age on the indigenous parasitoid *Ooencyrtus pityocampae* Mercet (Hymenoptera Encyrtidae). *Redia*, 96, 79–84.

Binazzi, F., Peverieri, G.S., Roversi, P.F. 2016. Pre-release risk assessment for classical biological control of harmful alien species. *Energia, ambiente e innovazione*, 3, 22-25. Doi:10.12910/EAI2016-038

Blatt, S.E. 1994. An unusually large aggregation of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae), in a man-made structure. *J. Entomol. Soc. B.C.*, 91, 71-72.

Blatt, S.E. 1997. Host selection, impact and chemical ecology of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). Tesis doctoral. Simon Fraser University.

Blatt, S.E., Borden, J.H. 1996a. Distribution and impact of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) in seed orchards in British Columbia. *Can. Entomol.*, 128, 1065-1076. <https://doi.org/10.4039/Ent1281065-6>

Blatt, S.E., Borden, J.H. 1996b. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). *Can. Entomol.*, 128, 777-778. <https://doi.org/10.4039/Ent128777-4>

Blatt, S.E., Borden, J.H. 1998. Interactions between the Douglas-fir seed chalcid, *Megastigmus spermotrophus* (Hymenoptera: Torymidae), and the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can. Entomol.*, 130, 775-782. <https://doi.org/10.4039/Ent130775-6>

Blatt, S.E., Borden, J.H., Pierce, H.D., Gries, R., Gries, G. 1998. Alarm pheromone system of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*. J. Chem. Ecol., 24, 1013-1031. <https://doi.org/10.1023/A:1022350402535>

Bono, D., Aletà, N. 2013. Cone yield evaluation of a grafted *Pinus pinea* L. trial, in: Mutke S., Piqué M., Calama R. (Eds.), Mediterranean stone pine for agroforestry. CIHEAM/FAO/INIA/IRTA/CESEFOR/CTFC (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 105), Zaragoza, 35-41.

Bracalini, M., Benedettelli, S., Croci, F., Terreni, P., Tiberi, R., Panzavolta, T. 2013. Cone and seed pests of *Pinus pinea*: assessment and characterization of damage. J. Econ. Entomol., 106, 229-234. <https://doi.org/10.1603/EC12293>

Buhl, O., Stephensen, B.K. 2009. 'Western Conifer Seed Bug' Vestlig Nåletræs-frøtæge *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann, 1910) - ny art i Danmark. Meddelelser fra Entomologisk Selskab for Fyn, 41, 13-16

Bustamante-García, V., Prieto-Ruíz, J.A., Álvarez-Zagoya, R., Carrillo-Parra, A., Corral-Rivas, J.J., Merlín-Bermudes, E. 2012a. Factors affecting seed production of *Pinus engelmannii* Carr in seed stands in Durango State, Mexico. Southwest. Entomol., 37, 351-359. <https://doi.org/10.3958/059.037.0311>

Bustamante-García, V., Prieto-Ruíz, J.Á., Carrillo-Parra, A., Alvarez-Zagoya, R., González-Rodríguez, H., Corral-Rivas, J.J. 2014. Seed production and quality of *Pinus durangensis* Mart., from seed areas and a seed stand in Durango, Mexico. Pak. J. Bot., 46, 1197-1202.

Bustamante-García, V., Prieto-Ruíz, J.Á., Merlín-Bermudes, E., Álvarez-Zagoya, R., Carrillo-Parra, A., Hernández-Díaz, J.C. 2012b. Potencial y eficiencia de producción de semilla de *Pinus engelmannii* Carr., en tres rodales semilleros del estado de Durango, México. Madera y bosques, 18, 7-21.

Byeon, D.H., Jung, J.M., Jung,S., Lee, W.H. 2021. Distribution analysis of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in South Korea using climate and host plant ensemble maps. J. Asia Pac. Entomol., 24, 1077-1086. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.10.003>

Calama, R., Fortin, M., Pardos, M. Manso, R. 2017. Modelling spatiotemporal dynamics of *Pinus pinea* cone infestation by *Dioryctria mendacella*. For. Ecol. Manag., 389, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.12.015>

Calama, R., Gordo, J., Madrigal, G., Mutke, S., Conde, M., Montero, G., Pardos, M. 2016a. Enhanced tools for predicting annual stone pine (*Pinus pinea* L.) cone production at tree and forest scale in Inner Spain. For. Syst., 25, e079-e079. <https://doi.org/10.5424/fs/2016253-09671>

Calama, R., Gordo, J., Mutke, S., Conde, M., Madrigal, G., Garriga, E., Arias, M. J., Piqué, M., Gandía, R., Montero, G., Pardos, M. 2020. Decline in commercial pine nut and kernel yield in Mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.) in Spain. Iforest, 13, 251–260. <https://doi.org/10.3832/ifor3180-013>

Calama, R., Gordo, F.J., Mutke, S., Montero, G. 2008. An empirical ecological-type model for predicting stone pine (*Pinus pinea* L.) cone production in the Northern Plateau (Spain). For. Ecol. Manag., 255, 660-673. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.079>

Calama, R., Gordo, J., Raposo, R., Elvira, M., Mutke, S., Pascual, S., Pardos, M. 2016b. Evolución de daños en piña inmadura de *Pinus pinea* L. Jornada final del proyecto PROPINEA. Pedrajas de San Esteban (Valladolid). 29 febrero.

Calama, R., Montero, G. 2007. Cone and seed production from stone pine (*Pinus pinea* L.) stands in Central Range (Spain). Eur. J. For. Res., 126, 23-35. <https://doi.org/10.1007/s10342-005-0100-8>

Calama, R., Mutke, S., Pardos, M., Morales, L., Gordo, F.J., Montero, G., Finat, L. 2012. La producción de piña y piñón de *Pinus pinea* L. en la Meseta Norte. En: Gordo, J., Calama, R., Pardos, M., Bravo, F., Montero, G. (Eds.). La regeneración natural de los pinares en los arenales de la Meseta Castellana. Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (Universidad de Valladolid-INIA). Valladolid.

Calama, R., Mutke, S., Tomé, J., Gordo, J., Montero, G., Tomé, M. 2011. Modelling spatial and temporal variability in a zero-inflated variable: the case of stone pine (*Pinus pinea* L.) cone production. *Ecol Modell.*, 222, 606-618. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.09.020>

Calama, R., Pardos, M., Conde, M., Madrigal, G., Mutke, S., Montero, G., Gordo, F.J. 2015. Pérdidas de rendimiento en piñón en piñas de *Pinus pinea* L.: análisis interregional. Reunión Científica de Sanidad Forestal SECF. Madrid, 7-8 octubre.

Campbell, B.C., Shea, P.J. 1990. A simple staining technique for assessing feeding damage by *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) on cones. *Can. Entomol.*, 122, 963-968. <https://doi.org/10.4039/Ent122963-9>

Carmona García, A. 2013. Pinos y arte: ensayo de contextualización en la naturaleza desde el Paleolítico a Roma. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Catalán, J., Verdú, M.J. 2005. Evaluación de dos parasitoides de huevos de *Nezara viridula*. *Bol. Sanid. Veg. Plagas*, 31, 187-198.

Ceballo, F.A., Walter, G.H. 2004. Life history parameters and biocontrol potential of the mealybug parasitoid *Coccidoxenoides peregrinus* (Timberlake)(Hymenoptera: Encyrtidae): asexuality, fecundity and ovipositional patterns. *Biol. Control*, 29, 235-244. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00151-8)

Chailleux, A., Desneux, N., Seguret, J., Do Thi Khanh, H., Maignet, P., Tabone, E. 2012. Assessing European egg parasitoids as a mean of controlling the invasive South

American tomato pinworm *Tuta absoluta*. PloS one, 7, e48068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048068>

Cibrián-Tovar, D., Ebel, B.H., Yates III, H.O., Méndez-Montiel, J.T. 1986. Cone and seed insects of the Mexican conifers, vol. 40. General Technical Report, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, South-eastern Forest Experiment Station, Asheville, NC, USA.

Colazza, S., Bin, F. 1995. Efficiency of *Trissolcus basalís* (Hymenoptera: Scelionidae) as an egg parasitoid of *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) in central Italy. Environ. Entomol., 24, 1703-1707. <https://doi.org/10.1093/ee/24.6.1703>

Colazza, S., Fucarino, A., Peri, E., Salerno, G., Conti, E., Bin, F. 2004. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. J. Exp. Biol., 207, 47-53. <https://doi.org/10.1242/jeb.00732>

Colombi, L., Brunetti, R. 2002. Rapporto del Servizio fitosanitario del cantone Ticino. Servizio Fitosanitario, Bellinzona.

Connelly, A.E., Schowalter, T.D. 1991. Seed losses to feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) during two periods of second-year cone development in western white pine. J. Econ. Entomol., 85, 215–217. <https://doi.org/10.1093/jee/84.1.215>

Cornelius, M.L., Buffington, M.L., Talamas, E.J., Gates, M.W. 2016a. Impact of the egg parasitoid, *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera: Scelionidae), on sentinel and wild egg masses of the squash bug (Hemiptera: Coreidae) in Maryland. Environ. Entomol., 45, 367-375. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv228>

Cornelius, M.L., Dieckhoff, C., Hoelmer, K.A., Olsen, R.T., Weber, D.C., Herlihy, M.V., Talamas, E.J., Vinyard, B.T., Greenstone, M.H. 2016b. Biological control of sentinel egg masses of the exotic invasive stink bug *Halyomorpha halys* (Stål) in Mid-Atlantic USA

ornamental landscapes. Biol. Control, 103, 11-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.011>

Cornell, H.V., Hawkins, B.A. 1993. Accumulation of native parasitoid species on introduced herbivores: a comparison of hosts as natives and hosts as invaders. Am. Nat., 141, 847-865. <https://doi.org/10.1086/285512>

Costi, E., Haye, T., Maistrello, L. 2018. Surveying native egg parasitoids and predators of the invasive *Halyomorpha halys* in Northern Italy. J. Appl. Entomol., 143, 299-307. <https://doi.org/10.1111/jen.12590>

Crowder, D.W. 2007. Impact of release rates on the effectiveness of augmentative biological control agents. J. Insect Sci., 7, 15. <https://doi.org/10.1673/031.007.1501>

Cusumano, A., Peri, E., Boivin, G., Colazza, S. 2015. Fitness costs of intrinsic competition in two egg parasitoids of a true bug. J. Insect Physiol., 81, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.003>

Cusumano, A., Peri, E., Bradleigh Vinson, S., Colazza, S. 2012a. Interspecific extrinsic and intrinsic competitive interactions in egg parasitoids. BioControl, 57, 719-734. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9451-5>

Cusumano, A., Peri, E., Vinson, S.B., Colazza, S. 2012b. The ovipositing female of *Ooencyrtus telenomicida* relies on physiological mechanisms to mediate intrinsic competition with *Trissolcus basalus*. Entomol. Exp. Appl., 143, 155-163. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01236.x>

Dale, J.W., Schenk, J.A. 1978. Cone production and insect caused seed losses of ponderosa pine in Idaho and adjacent Washington and Montana. University of Idaho, College of Forestry, Wildlife and Range Science Bulletin, 24.

Dapporto, L., Baracchi, D., Benassai, D., Capretti, P., Roversi, P.F., Turillazzi, S. 2013. Major changes in the sex differences in cuticular chemical profiles of the western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis*) after laboratory rearing. *J. Insect Physio.*, 59, 738-744. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.012>

de la Mata, R., Teixidó Companyó, A., Aletà Soler, N., Torrell Sorio, A., Ros Ballester, L., Segarra Trepas, M. 2019. La producció de pinyons en plantacions empeltades. Resultats dels assaigs instal·lats a l'IRTA. En: Tusell, J. M.; Beltrán, M. (Coords.). 2019. XXXVI Jornades Tècniques Silvícules Emili Garolera. Consorci Forestal de Catalunya. Santa Coloma de Farners.

Derjanschi, V. 2010. Additional data to the fauna of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) from the Republic of Moldova. *Oltenia, Studii și comunicări, Științele Naturii*, 26, 109-110.

Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

Dusoulier, F., Lupoli, R., Aberlenc, H.P., Streito, J.C. 2007. The eastern invasion of *Leptoglossus occidentalis* (Coreidae) in France, *L'Entomologiste*, 63, 303-308.

Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46, 387-400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>

Eski, A., Biryol, S., Acici, O., Demir, İ. 2022. Biocontrol of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) using indigenous entomopathogenic fungi. *Egypt. J. Biol. Pest Control.*, 32, 140. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00641-4>

España. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. Boletín Oficial del Estado, 14 de septiembre de 2012, núm. 223, pp. 1 a 52.

Evaristo, I.N. 2016. Características nutricionais do pinhão Pinhão de *Pinus pinea* L. versus pinhão asiático. Vida Rural, 40-41.

Evaristo, I., Batista, D., Correia, I., Correia, P., Costa, R. 2010. Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* L. nuts. J. Sci. Food Agric., 90, 1041-1049. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3914>

Elvira-Recuenco, M., Sánchez-Moreno, J., Calama, R., Pardos, M., Mutke, S., Gordo, F. J., Pascual, S., Raposo, R. 2016. Damage assessment in pine nuts from stone pine caused by *Leptoglossus occidentalis* and pathogenic agents. In Conference Wild Forest Products in Europe. Barcelona, October 13-14.

EPPO. 2023. *Leptoglossus occidentalis* (LEPLOC). Distribution. EPPO Global Database (Online). <https://gd.eppo.int/taxon/LEPLOC/distribution> [Fecha de acceso: 24 de mayo de 2023].

FAFCYLE. 2023. Mejoras e innovación en la producción de Piñón nacional (Online). <https://www.fafcyle.es/project/go-pinea/> [Fecha de acceso: 14 de agosto de 2023].

FAO. 2023. Manejo integrado de plagas y plaguicidas. Manejo integrado de plagas (Online). <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/es/> [Fecha de acceso: 8 de agosto de 2023].

Farinha, A.O.; Branco, M., Courtin, C.; Lesieur, V., Gallego, D., Sanchez-Garcia, F.J., Sousa, E., Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Bras, A. 2023. Another Chapter in the History of the European Invasion by the Western Conifer Seed Bug, *Leptoglossus occidentalis*: The Iberian Peninsula. Diversity, 15, 64. <https://doi.org/10.3390/d15010064>

Farinha, A.O., Branco, M., Pereira, M.F., Auger-Rozenberg, M.A., Maurício, A., Yart, A., Guerreiro, V., Sousa, E.M.R., Roques, A. 2017. Micro X-ray computed tomography suggests cooperative feeding among adult invasive bugs *Leptoglossus occidentalis* on mature seeds of stone pine *Pinus pinea*. *Agric. For. Entomol.*, 20, 18-27. <https://doi.org/10.1111/afe.12225>

Farinha, A.O., Carvalho, C., Correia, A.C., Branco, M. 2021. Impact assessment of *Leptoglossus occidentalis* in *Pinus pinea*: Integrating population density and seed loss. *For. Ecol. Manag.*, 496, 119422. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119422>

Farinha, A.O., Durpoix, C., Valente, S., Sousa, E., Roques, A., Branco, M. 2018a. The stone pine, *Pinus pinea* L., a new highly rewarding host for the invasive *Leptoglossus occidentalis*. *NeoBiota*, 41, 1-18. doi: 10.3897/neobiota.41.30041

Farinha, A.C.O., Silva, J.E.P., Correia, A.C., Sousa, E.M.R., Roques, A., Branco, M. 2018b. Is *Leptoglossus occidentalis* entirely responsible for the high damage observed on cones and seeds of *Pinus pinea*? Results from a fertirrigation trial in Portugal. *For. Ecol. Manag.*, 429, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.07.014>

Faúndez, E.I., Rocca, J.R., Villablanca, J. 2017. Detection of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae: Coreinae) in Chile. *Arq. entomol.*, 17, 317-320.

Faúndez, E.I., Silvera, M. 2019. Sobre la presencia de la chinche de las coníferas occidental *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) en Uruguay. *Rev. chil. entomol.*, 45, 549-551.

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, 72-80.

Fernando, L.C.P., Walter, G.H. 1999. Activity patterns and oviposition rates of *Aphytis lingnanensis* females, a parasitoid of California red scale *Aonidiella aurantii*: implications for successful biological control. *Environ. Entomol.*, 24, 416-425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.1999.00216.x>

Flores, J.D.F., Nájera, J.A., Quiñones, L.M. 2014. Principales plagas de los pinos piñoneros en el sur de Coahuila, en: Resúmenes del IV Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Foley, S., McCormack, S. 2013 *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera, Coreidae) new to Ireland. *Ir. Nat.' J.*, 33, 66-67.

Franco-Archundia, S.L., Gonzaga-Segura, A.J., Jiménez-Pérez, A., Castrejón-Gómez, V.R. 2018. Behavioral response of *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae) to stimuli based on colors and its aggregation pheromone. *Insects*, 9, 91. <https://doi.org/10.3390/insects9030091>

Frank, J.H., Gillett-Kaufman, J.L., 2006. Glossary of Expressions in Biological Control: IPM-143/IN673, 8/2006. EDIS, 200615. <https://doi.org/10.32473/edis-in673-2006>.

Gall, W.K., 1992. Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae): well-documented dispersal of a household nuisance. *Gt. Lakes Entomol.*, 25, 159-171. <https://doi.org/10.1134/S001387381302005X>

Gallego, D., Mas, 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-Gasteiz, 10-14 junio.

Ganjisaffar, F., Perring, T.M. 2020. Life history evaluation of *Ooencyrtus lucidus*, a newly described egg parasitoid of *Bagrada hilaris*. *Insects*, 11, 292. <https://doi.org/10.3390/insects11050292>

Gapon, D.A. 2013. First records of the western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heid.(Heteroptera, Coreidae) from Russia and Ukraine, regularities in its distribution and possibilities of its range expansion in the Palaearctic region. Entomol. Rev., 93, 174-181.

Gapon, D.A. 2015. First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Morocco. Heteropterus Rev. Entomol., 15, 161-163.

García-Barros, E. 1989. Estudio comparativo de los caracteres biológicos de dos satirinos *Hipparcha statilinus* (Hufnagel, 1766) e *H. semele* (L., 1758) (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae). Misc. Zool., 13, 85-96.

Gibbs, M., Schönrogge, K., Alma, A., Melika, G., Quacchia, A., Stone, G.N., Aebi, A. 2011. *Torymus sinensis*: a viable management option for the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Europe?. BioControl, 56, 527-538. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9364-8>

Giovannini, L., Mazza, G., Binazzi, F., Simom, S., Marianelli, L., Guerrieri, E., Roversi, P.F., Peverieri, G. S. 2020. Biological parameters of the egg parasitoid *Ooencyrtus gonoceri*. Bull. Insectol, 73, 313-319.

Gogala, A. 2003: A leaf-footed conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis*) in Slovenia already (Heteroptera: Coreidae). Acta Entomologica Slovenica 11, 189-190.

Grosso-Silva, J.M. 2010. The North American western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae), new to Portugal. Arq. entomol., 37-38.

Guadaño, C., Mutke, S. (coord.). 2016. Establecimiento de plantaciones clonales de *Pinus pinea* para la producción de piñón mediterráneo. Monografías INIA: Serie Forestal N° 28. INIA, Madrid.

Guarino, S., De Pasquale, C., Peri, E., Alonzo, G., Colazza, S. 2008. Role of volatile and contact pheromones in the mating behaviour of *Bagrada hilaris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Eur. J. Entomol.*, 105, 613.

Halperin, J. 1990. Natural enemies of *Thaumetopoea* spp.(Lep., Thaumetopoeidae) in Israel 1. *J. Appl. Entomol.*, 109, 425-435. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1990.tb00073.x>

Handal, E., Qumsiyeh, M. 2019. First record of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae), from Palestine. *Jordan J. Biol. Sci.*, 12, 657-658.

Harmat, B., Kondorosy, E., Rédei, D. 2006. First occurrence of the western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann) in Hungary (Heteroptera: Coreidae). *Növényvédelem*, 42, 491-494.

Heidemann, O. 1910. New species of *Leptoglossus* from North America. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 12, 191–197.

Heimpel, G.E., de Boer, J.G. 2008. Sex determination in the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093441>

Heimpel, G.E., Rosenheim, J.A. 1998. Egg limitation in parasitoids: a review of the evidence and a case study. *Biol. Control*, 11, 160-168. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0587>

Herlihy, M.V., Talamas, E.J., Weber, D.C. 2016. Attack and success of native and exotic parasitoids on eggs of *Halyomorpha halys* in three Maryland habitats. *PLoS One*, 11, e0150275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150275>

Howse, P., Stevens, J.M., Jones, O.T. 2013. Insect pheromones and their use in pest management. Springer Science & Business Media.

Hradil, K. 2008. *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae), a new alien species in Montenegro. Acta Entomol. Serbica, 13, 77-79.

Huang, D.W., Noyes, J.S. 1994. A revision of the Indo-Pacific Species of *Ooencyrtus* (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitoids of the immature stages of economically important insect species (mainly Hemiptera and Lepidoptera). Bulletin of Natural History Museum (Entomology Series), 63, 30.

Hulting, F.L., Orr, D.B., Obrycki, J.J. 1990. A computer program for calculation and statistical comparison of intrinsic rates of increase and associated life table parameters. Fla. Entomol., 601-612. <https://doi.org/10.2307/3495274>

INC. 2019. Pine nuts technical information. International Nut and Dried Fruit Council (Online) <https://inc.nutfruit.org/publications/> [Fecha de acceso: 19 de julio de 2023].

INC. 2020. Nuts & dried fruits statistical yearbook 2019/2020 (Online) [https://inc.nutfruit.org/wp-content/uploads/2021/09/1594640174\\_INC\\_Statistical\\_Yearbook\\_2019-2020.pdf](https://inc.nutfruit.org/wp-content/uploads/2021/09/1594640174_INC_Statistical_Yearbook_2019-2020.pdf) [Fecha de acceso: 19 de julio de 2023].

Ishikawa, T., Kikuhara, Y. 2009. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae), a presumable recent invader to Japan. Jpn. J. Appl. Entomol., 12, 115-116.

Jervis, M.A. (Ed.). 2007. Insects as natural enemies: a practical perspective. Springer Science & Business Media.

Jervis, M.A., Copland, M.J., Harvey, J.A. 2005. The life-cycle. Insects as natural enemies: a practical perspective, 73-165.

Jervis, M.A., Heimpel, G.E., Ferns, P.N., Harvey, J.A., Kidd, N.A. 2001. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. J. Anim. Ecol., 70, 442-458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2001.00507.x>

Jones, A.L., Jennings, D.E., Hooks, C.R., Shrewsbury, P.M. 2014. Sentinel eggs underestimate rates of parasitism of the exotic brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. Biol. Control, 78, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.011>

Jung, J.M., Byeon, D.H., Lee, D.H., Nam, Y., Jung, S., Lee, W.H. 2023. Spatial analysis of the occurrence of the western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Europe based on multiple environmental variables. Ecol. Evol., 13, e10104. <https://doi.org/10.1002/ece3.10104>

Junta de Castilla y León. 2023. Operadores del sector de piñas y piñones en Castilla y León. (Online) [http://datosabiertos.jcyl.es/web/jcyl/set/es/medio-rural-pesca/operadores\\_pi%C3%B1as/1284271043904](http://datosabiertos.jcyl.es/web/jcyl/set/es/medio-rural-pesca/operadores_pi%C3%B1as/1284271043904) [Fecha de acceso: 19 de julio de 2023].

Kalashian, M.Y., Ghrejyan, T.L., Karagyan, G.H. 2021. First finding of Western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heid.(Heteroptera, Coreidae) in Armenia. Russ. J. Biol. Invasions, 12, 274-276. <https://doi.org/10.1134/S2075111721030073>

Karalius, S., Karaliūtė, A. 2019. First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae) in Lithuania. Lietuvos entomologų draugijos darbai, 3, 17-18.

Katovich, S.A., Kulman, H.M. 1987. *Leptoglossus corculus* and *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) attacking red pine, *Pinus resinosa*, cones in Wisconsin and Minnesota. Gt. Lakes Entomol., 20, 2.

Keeling, C.I., Plettner, E., Slessor, K.N. 2004. Hymenopteran semiochemicals. Top. Curr. Chem., 239, 133–177. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Doi:10.1007/b95452

Kegley, S., Sturdevant, N., Stein, J., Willhite, B., Flanagan, P., Weatherby, J., Marsden, M. 2001. Cone and seed insects and their impact on whitebark pine. Forest Health Protection Report—Northern Region, USDA Forest Service.

Keita, Y.F., Sissoko, S.M., Diawara, M.O., Dembele, B., Traore, A., Ly, B., Assogba, R.R., Sodio, B.A., Yaro, A.S. 2023. Entomofaunal Diversity of the Upper Senegal River Basin in Mali. *Am. Entomol.*, 7, 13-22. doi: 10.11648/j.aje.20230701.13

Kim, D.E., Lee, H., Kim, M.J., Ban, Y.G., Kim, D. 2020. *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) occurrence, potential habitats, and COI diversity in South Korea. *J. Asia Pac. Biodivers.*, 13, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2019.11.002>

Kment, P., Baňář, P. 2008. Additional records of the invasive Nearctic bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Croatia. *Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici*, 17, 141-147.

Koerber, T.W. 1963. *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a newly discovered pest of coniferous seed. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 56, 229-234. <https://doi.org/10.1093/aesa/56.2.229>

Komeda, Y., Mita, T., Hirose, Y., Yamagishi, K. 2020. Taxonomic revision of charon-, floridanum-and muscaeforme-groups of *Gryon Haliday, 1833* (Hymenoptera, Scelionidae) from Japan, with descriptions of two new species and host information. *J. Hymenopt. Res.*, 80, 99-135. doi: 10.3897/jhr.80.56178

Konopka, J.K., Poinapen, D., Garipey, T., Holdsworth, D.W., McNeil, J.N. 2020. Timing of failed parasitoid development in *Halyomorpha halys* eggs. *Biol. Control*, 141, 104124. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104124>

Krugman, S.L., Koerber, T.W. 1969. Effect of cone feeding by *Leptoglossus occidentalis* on ponderosa pine seed development. *For. Sci.*, 15, 104-111. <https://doi.org/10.1093/forestscience/15.1.104>

Kulijer, D. 2016. *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), two new invasive alien species for insect fauna of Macedonia. *Ecol. Montenegrina*, 5, 22-25.

Kulijer, D., Ibrahim, H. 2017. First report of invasive species *Leptoglossus occidentalis* in Kosovo (Heteroptera: Coreidae). *Acta Entomologica Slovenica*, 25, 115–118.

Kun, M.E., Masciocchi, M. 2019. First detection of the cosmopolitan invader *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Argentina. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180493>

Lait, C.G., Bates, S.L., Kermode, A.R., Morrissette, K.K., Borden, J.H. 2001a. Specific biochemical marker-based techniques for the identification of damage to Douglas-fir seed resulting from feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31, 739-746. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00176-4)

Lait, C.G., Bates, S.L., Morrissette, K.K., Borden, J.H., Kermode, A.R. 2001b. Biochemical assays for identifying seeds of lodgepole pine and other conifers fed on by *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). *Canad. J. Bot.*, 79, 1349-1357. <https://doi.org/10.1139/b01-119>

Lait, C.G., Miller, D.R., Bates, S.L., Borden, J.H., Kermode, A.R. 2003. Biochemical assay detects feeding damage to loblolly pine seeds caused by the leaf-footed pine seed bug (Hemiptera: Coreidae). *Entomol. Sci.*, 38, 644-653. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-38.4.644>

Landis, T.D., Dumroese, R.K., 2014. Integrated pest management-an overview and update. Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. *FNN*. 34, 16–26.

Leal, W.S., Higuchi, H., Mizutani, N., Nakamori, H., Kadosawa, T., Ono, M. 1995. Multifunctional communication in *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae): Conspecific nymphs and egg parasitoid *Ooencyrtus nezarae* use the same adult attractant pheromone as chemical cue. *J. Chem. Ecol.*, 21, 973–985. <https://doi.org/10.1007/bf02033802>

Lee, S.C. 1979. Evaluation of *Ooencyrtus Submetallicus* (Howard) and *Trissolcus Basalis* (Wollaston) as Egg Parasites of *Nezara Viridula* (Linnaeus). Tesis doctoral. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.

Lee, J.W., Huh, M.J., Nam, I., Park, J.H., Lee, D.H., Lee, M.W., Park, I.K. 2023. Morphological and biological characteristics of the Korean population of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae), an invasive insect pest of conifer cones. *J. Asia Pac. Entomol.*, 26, 102057. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102057>

Lesieur, V., Farinha, A.O. 2021. Responses of native egg parasitoids to the invasive seed bug *Leptoglossus occidentalis*. *Agric. For. Entomol.*, 23, 323-333. <https://doi.org/10.1111/afe.12434>

Lesieur, V., Lombaert, E., Guillemaud, T., Courtial, B., Strong, W., Roques, A., Auger-Rozenberg, M. A. 2018. The rapid spread of *Leptoglossus occidentalis* in Europe: a bridgehead invasion. *J. Pest Sci.*, 92, 189-200. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0993-x>

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, 1833-1849. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0630-9>

Lindelöw, Å., Bergsten, J. 2012. The invasive western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae), established in Sweden. Entomol. Tidskr., 133, 55-58.

Lis, J.A., Lis, B., Gubernator, J. 2008. Will the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) seize all of Europe? Zootaxa 1740, 66-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1740.1.8>

Loewe-Muñoz, V., del Río, R., Delard, C., Balzarini, M. 2023. Effect of fertilization on *Pinus pinea* cone to seed and kernel yields. For. Ecol. Manag., 545, 121249. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.121249>

Loewe-Muñoz, V., Delard, C., Del Río, R., Balzarini, M. 2020. Long-term effect of fertilization on stone pine growth and cone production. Ann. For. Sci., 77, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13595-020-00978-6>

Loewe-Muñoz, V., Delard, C., Del Río, R., Balzarini, M. 2021. Western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis*) challenging stone pine cropping in the Southern Hemisphere. For. Ecol. Manag., 496, 119434. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119434>

Loewe-Muñoz, V.F., González, M.V.G. 2012. Apuntes sobre una gira de estudio sobre el Piñón del Pino piñonero (*Pinus pinea*) a Italia, España y Portugal. Ciencia & Investigación Forestal, 18, 77-92.

López González, G. 2007. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares (especies silvestres y las cultivadas más comunes). Tercera edición. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa.

López-Sebastián, E. 2014. Estudio de la dinámica poblacional del lepidóptero *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller, 1775) en la provincia de Valencia. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Luchi, N., Mancini, V., Feducci, M., Santini, A., Capretti, P. 2012. *Leptoglossus occidentalis* and *Diplodia pinea*: a new insect-fungus association in Mediterranean forests. For. Pathol., 42, 246-251. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00750.x>

Majzlan, O., Roháčová, M. 2007. Faunistické správy zo Slovenska. Naturae tutela, 11, 199-200.

Maltese, M., Caleca, V., Carapezza, A. 2009. Primi reperti in Sicilia su diffusione e biologia di *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae), cimice americana dei semi delle conifere. Atti del 3. Congresso Nazionale di Selvicoltura, Vol. 3: 1413-1418. Taormina (ME), Sicilia. Accademia Italiana di Scienze Forestali; Firenze.

Maltese, M., Caleca, V., Guerrieri, E., Strong, W.B. 2012. Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) recovered in western North America and first record of its egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead)(Hymenoptera: Platygastridae) in California. Pan-Pac. Entomol., 88, 347-355. <https://doi.org/10.3956/2012-23.1>

Maltese, M., Caleca, V., Strong, W., Guerrieri, E., Roversi, P. 2011. I parassitoidi di *Leptoglossus occidentalis* in Sicilia e nel suo areale di origine nordamericano. In Proceedings XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (Genovaltaly), 13-16 Giugno.

Malumphy, C., Botting, J., Bantock, C., Reid, S. 2008. Influx of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Coreidae) in England. HetNews, 12, 7-9.

Manastyrski, D. 2010. Western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis*); Cone and seed insect pest leaflet. Forest Genetics Council of British Columbia, 4, 1-9.

MAPA. 2021. Guía de Gestión Integrada de Plagas. Coníferas. (Online) <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad->

vegetal/coniferas\_web\_metadatos\_protegida\_tcm30-582459.pdf [Fecha de acceso: 12 de noviembre de 2023].

MAPA. 2023a. Guías de Gestión Integrada de Plagas. (Online) <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/guias-gestion-plagas/> [Fecha de acceso: 12 de noviembre de 2023].

MAPA. 2023b. Registro Oficial de Productos Fitosanitarios. (Online) <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb#> [Fecha de acceso: 12 de noviembre de 2023].  
Maple, J.D. 1947. The eggs and first instar larvae of Encyrtidae and their morphological adaptations for respiration. University of California Publications in Entomology, 8, 25–117.

Martel, G., Augé, M., Talamas, E., Roche, M., Smith, L., Sforza, R.F.H. 2019. First laboratory evaluation of *Gryon gonikopalense* (Hymenoptera: Scelionidae), as potential biological control agent of *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae). Biol. Control, 135, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.014>

Mas, H., Naya, M., Pérez-Laorga, E., Aguado, A., Marco, M., Aragoneses, J., Rodrigo, E. 2013. Estudio del ciclo biológico de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae) en la Comunitat Valenciana. 6º Congreso Forestal Español. Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio.

McPherson, J.E., Packauskas, R.J., Taylor, S.J., O'brien, M.F. 1990. Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America north of Mexico (Heteroptera: Coreidae). Gt. Lakes Entomol., 23, 99-104.

Mercet, R.G. 1921. Fauna Ibérica Himenópteros Fam. Encírtidos. Museo Nacional de Ciencias Naturales. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16110>

Messing, R.H., Wright, M.G. 2006. Biological control of invasive species: solution or pollution?. *Front. Ecol. Environ.*, 4, 132-140. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2006\)004\[0132:BCOISS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0132:BCOISS]2.0.CO;2)

Millar, J.G., Zou, Y., Hall, D.R., Halloran, S., Pajares, J.A., Ponce-Herrero, L., Shates, T., Wilson, H., Daane, K.M. 2022. Identification and synthesis of leptotriene, a unique sesquiterpene hydrocarbon from males of the leafhopper bugs *Leptoglossus zonatus* and *J. Nat. Prod.*, 85, 2062-2070. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00470>

Mills, N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. En: Consoli, F.L., Parra, J.R., Zucchi, R.A. (Eds.). *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. Volume 9. SSBM.

MITECO. 2020. Anuario de Estadística Forestal 2020. (Online) [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/anuario\\_ef2020\\_tcm30-559705.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/anuario_ef2020_tcm30-559705.pdf) [Fecha de acceso: 19 de julio de 2023].

MITECO. 2021. Avance Estadística Forestal 2021. (Online) [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/avance\\_aef\\_2021\\_web\\_tcm30-561531.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/avance_aef_2021_web_tcm30-561531.pdf) [Fecha de acceso: 19 de julio de 2023].

MITECO. 2023a. Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras - Artrópodos no crustáceos. (Online) [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-exoticas-invasoras/ce\\_eei\\_artropodos\\_nc.html](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-exoticas-invasoras/ce_eei_artropodos_nc.html) [Fecha de acceso: 5 de agosto de 2023].

MITECO. 2023b. Cuarto Inventario Forestal Nacional. Publicaciones. (Online) <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-forestal-nacional/publicaciones.aspx> [Fecha de acceso: 25 de julio de 2023].

MITECO. 2023c. Tercer Inventario Forestal Nacional. Publicación de resultados. Publicación en formato PDF. (Online) [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/publicacion\\_pdf\\_ifn3.aspx](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/publicacion_pdf_ifn3.aspx) [Fecha de acceso: 25 de julio de 2023].

Mjøs, A.T., Nielsen, T.R., Ødegaard, F. 2010. The western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910)(Hemiptera, Coreidae) found in SW Norway. *Nor. J. Entomol.*, 57, 20-22.

Mohammadpour, M., Jalali, M.A., Ziaaddini, M., Hashemirad, H. 2018. Some biological characteristics of *Ooencyrtus pityocampae* Mercet parasitoid of *Brachynema signatum* Jakovlev under laboratory conditions. *PHJ*, 1, 20-25. Doi:10.22123/PHJ.2017.54296

Musolin, D.L. 2007. Insects in a warmer world: ecological, physiological and life-history responses of true bugs (Heteroptera) to climate change. *Glob. Chang. Biol.*, 13, 1565-1585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01395.x>

Mutke, S. 2000. Fenología de *Pinus pinea* L. en un banco clonal (Valladolid). Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Valladolid.

Mutke, S. 2022. Producción y comercio de piñones comestibles en el mundo. *Revista Montes*, 147, 40-43.

Mutke, S., Calama, R., González-Martínez, S. C., Montero, G., Javier Gordo, F., Bono, D., Gil, L. 2012. mediterranean stone pine: Botany and horticulture. *Hortic Rev.*, 39, 153-201. DOI: 10.1002/9781118100592.ch4

Mutke, S., Calama, R., Gordo, J., Nicolas, J.L., Herrero, N., Roques, A. 2015a. Pérdida del rendimiento en piñón blanco de *Pinus pinea* en fábrica - *Leptoglossus* y la seca de la piña. III Reunión Científica de Sanidad Forestal de la SECF. Madrid, 7-8 octubre. pp. 54.

Mutke, S., Calama, R., Montero, G. 2015b. Pine nut production from forests and agroforestry systems around the Mediterranean - a short overview. Workshop and MC Meeting. Zagreb, February 18-20.

Mutke, S., Calama, R., Nasrallah Neaymeh, E., Roques, A., 2017. Impact of the Dry Cone Syndrome on commercial kernel yield of stone pine cones, in: Mutke S., Piqué M., Calama R. (Eds.), Mediterranean pine nuts from forests and plantations. CIHEAM (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 122), Zaragoza,

Mutke, S., Gordo, J., Climent, J., Gil, L. 2003. Shoot growth and phenology modelling of grafted Stone pine (*Pinus pinea* L.) in Inner Spain. Ann. For. Sci., 60, 527-537. DOI: 10.1051/forest:2003046

Mutke, S., Gordo, J., Gil, L. 2000. The stone pine (*Pinus pinea* L.) breeding programme in Castile-Leon (Central Spain), FAO-CIHEAM NUCIS-Newsletter 9, 50-55.

Mutke, S., Gordo, J., Gil, L. 2001. Fenología de *Pinus pinea* L. en un banco clonal (Valladolid). Tercer Congreso Forestal Español. Granada, 25-28 septiembre.

Mutke, S., Gordo, J., Gil, L. 2005a. Cone yield characterization of a stone pine (*Pinus pinea* L.) clone bank. Silvae Genet., 54, 189-196. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0028>

Mutke, S., Gordo, J., Gil, L. 2005b. Variability of Mediterranean Stone pine cone production: Yield loss as response to climate change. Agric. For. Meteorol., 132, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2005.08.002>

Mutke, S., Iglesias, S., Gil, L. 2007. Selección de clones de pino piñonero sobresalientes en la producción de piña. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, 16, 39-51.

Mutke, S., Martínez, J., Gordo, J., Nicolas, J. L., Herrero, N., Pastor, A., Calama, R. 2014. Severe seed yield loss in Mediterranean Stone pine cones. 5<sup>th</sup> International Conference on Mediterranean Pines (Medpine5). Lleida, September 24-26.

Mutke, S., Pastor, A., Picardo, A., 2013. Toward a traceability of European pine nuts “from forest to fork”, in: Mutke S., Piqué M., Calama R. (Eds.), Mediterranean stone pine for agroforestry. CIHEAM/AO/INIA /IRTA/CESEFOR/CTFC (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 105), Zaragoza, pp. 105-109

Mutke, S., Sievänen, R., Nikinmaa, E., Perttunen, J., Gil, L. 2005c. Crown architecture of grafted Stone pine (*Pinus pinea* L.): shoot growth and bud differentiation. *Trees*, 19, 15-25. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0346-7>

Moulet, P. 2006. Un nouveau Coréide en France: *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera Coreidae). *L'Entomologiste*, 62, 183-184.

Naya, M., Aguado, A. 2012. Seguimiento de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann durante la anualidad 2011 en el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales “Alaquàs”-Valencia. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid (España). *Bol. San. Veg. Plagas*, 38, 125-132.

Nechols, J.R., Tracy, J.L., Vogt, E.A. 1989. Comparative ecological studies of indigenous egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae; Encyrtidae) of the squash bug, *Anasa tristis* (Hemiptera: Coreidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, 177-188.

Negron, J.F. 1995. Cone and seed insects associated with piñon pine, 97-106. En: Shaw, D.W., Aldon, E.F., Losapio, C. (eds.): Desired future conditions for piñon-juniper ecosystems. Proceedings of the Symposium 1994 August 8-12, Flagstaff, AZ. Gen. Tech. Rep. RM-258. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest

Nemer, N., El Khoury, Y., Noujeim, E., Zgheib, Y., Tarasco, E., van der Heyden, T. 2019. First records of the invasive species *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) on different coniferous species including the cedars of Lebanon. *Rev. chil. entomol.*, 45, 507-513. <https://doi.org/10.35249/rche.45.4.19.01>

Niccoli, A., Benassai, D., Croci, F., Roversi, P.F., 2009. *Anastatus Bifasciatus* ooparassitoide di *Leptoglossus occidentalis*. Proceedings XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Ancona, 15-18 Giugno.

Noyes, J.S. 1981. On the types of the species of Encyrtidae described by R. Garcia Mercet (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Eos*, 55/56, 165–189.

Noyes, J.S. 2023. Universal Chalcidoidea Database. (Online) <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> [Fecha de acceso: 10 de septiembre de 2023].

Noyes, J.S., Hayat, M. 1994. Oriental mealybug parasitoids of the Anagyrini (Hymenoptera: Encyrtidae). UK, CAB International, The London Natural History Museum.

Olivera, L., Minghetti, E., Montemayor, S.I. 2021. Ecological niche modeling (ENM) of *Leptoglossus clypealis* a new potential global invader: following in the footsteps of *Leptoglossus occidentalis*?. *Bull. Entomol. Res.*, 111, 289-300. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000656>

ORDEN FYM/905/2014 de 9 de octubre de 2014 [Boletín Oficial de Castilla y León]. Por la que se regula el aprovechamiento de piña cerrada de *Pinus Pinea* L. (Pino Piñonero). 29 de octubre de 2014.

Orr, D. 2009. Biological control and integrated pest management. En: R. Peshin, A.K. Dhawan (Eds.), *Integrated pest management: Innovation-development*. Springer Science+Business Media BV. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3_9)

Pagola-Cardé, S. 2009. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae), chinche invasora en la cornisa cantábrica ibérica. *Heteropterus Rev. Entomol.*, 9, 175-178.

Panizzi, A.R.; Grazia, J. 2015. True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. *Entomology in Focus*. Volume 2. The Netherlands. Springer: Dordrecht.

Parlak, S. 2017. An invasive species: *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann) how does it affect forestry activities?. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 17, 531-542. <https://doi.org/10.17475/kastorman.292220>

Pasalodos-Tato, M., Pukkala, T., Calama, R., Cañellas, I., Sánchez-González, M. 2016. Optimal management of *Pinus pinea* stands when cone and timber production are considered. *Eur. J. For. Res.*, 135, 607-619. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0958-7>

Pasek, J.E., Ellen Dix, M. 1988. Insect damage to conelets, second-year cones, and seeds of ponderosa pine in southeastern Nebraska. *J. Econ. Entomol.*, 81, 1681–1690. <https://doi.org/10.1093/jee/81.6.1681>

Pérez Hidalgo, N. 2012. Primera cita de la chinche americana del pino, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae), en la provincia de León (España). *Boletín de la SEA*, 51, 311-312.

Peri, E., Cusumano, A., Agrò, A., Colazza, S. 2011. Behavioral response of the egg parasitoid *Ooencyrtus telenomicida* to host-related chemical cues in a tritrophic perspective. *BioControl*, 56, 163-171. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9323-9>

Peshin, R., Dhawan, A.K. 2009. Integrated pest management: volume 1: innovation-development process. Volume 1. Springer Science & Business Media.

Petrakis, P.V. 2011. First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Greece. Entomol. Hell., 20, 83-93. <https://doi.org/10.12681/eh.11512>

Pijls, J.W., van Steenberg, H.J., van Alphen, J.J. 1996. Asexuality cured: the relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversicornis*. Heredity, 76, 506-513. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.73>

Ponce-Herrero, L.; Rodríguez García, N.; Ponce Díaz, A.; Pando Fernández V.; Pajares Alonso, J.A. 2017. Influencia de la alimentación sobre distintas especies de pinos en la progenie del chinche de las piñas *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). 7º Congreso Forestal Español. Plasencia, 26-30 junio.

Power, N.R., 2020. Evaluation of the Parasitoid *Ooencyrtus mirus* (Hymenoptera: Encyrtidae) as a Potential Biological Control Agent of *Bagrada hilaris* (Heteroptera: Pentatomidae). Tesis doctoral. University of California.

Prada, M.A., Gordo, J., de Miguel, J., Mutke, S., Catalán-Bachiller, G., Iglesias, S., Gil, L. 1997. Las regiones de procedencia de *Pinus pinea* L. en España. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Madrid.

Prokopy, R., Kogan, M. 2009. Integrated pest management. En: Resh, V.H., Cardé R.T. (Eds.). Encyclopedia of Insects. San Diego. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00148-X>

Protic, L. 2008. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Serbia. Acta entomol. serbica, 13, 81-84

Protic, L., Stanković, M. 2015. New research on the fauna of Heteroptera in Bosnia-Herzegovina. Acta Entomol. Serbica, 20, 13-28.

Quacchia, A., Moriya, S., Bosio, G., Scapin, I., Alma, A. 2008. Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *BioControl*, 53, 829-839. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9139-4>

Rabitsch, W. 2008. Alien true bugs of Europe (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zootaxa*, 1827,1, 1-44. doi: 10.11646/ZOOTAXA.1827.1.1

Rabitsch, W. 2010. True Bugs (Hemiptera, Heteroptera). Chapter 9.1. *BioRisk*, 4, 407-433. doi: 10.3897/biorisk.4.44

Rabitsch, W., Heiss, E. 2005. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, eine amerikanische Adventivart auch in Österreich aufgefunden (Heteroptera: Coreidae). *Ber. nat.-med. Verein Innsbruck*, 92, 131-135.

Rappaport, N.G., Haverty, M.I., Shea, P.J., Sandquist, R.E. 1994. Efficacy of esfenvalerate for control of insects harmful to seed production in disease-resistant western white pines. *Can. Entomol.*, 126, 1-5. DOI: <https://doi.org/10.4039/Ent1261-1>

Ribes, J., Escolá, O. 2005. *Leptoglossus occidentalis* Heidemann., 1910, hemípter neàrtic trobat a Catalunya (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae). *Ses. Entom. ICHN-SCL*, 13, 47-50.

Ribes, J., Goula, M.G., Pagola-Cardé, S., Solé, F.G., Español, E.R. 2008. Addicions i correccions al catàleg dels heteròpters de Catalunya (Insecta, Hemiptera, Heteroptera). *Ses. Entom. ICHN-SCL*, 13-14, 107-165.

Ribes, J., Serra, A., Goula, M. 2004. Catàleg dels heteròpters de Catalunya (Insecta, Hemiptera, Heteroptera). *ICHN/Sec. Ciénc. Biol. Inst. Est. Cat.*, 1-128.

Ricarte, A., Fidalgo, P.Á., Fidalgo, M.Á. 2020. Distribución actualizada y fenología de *Trichopoda pennipes* (Fabricius, 1781)(Diptera: Tachinidae) en la Península Ibérica. *Graellsia*, 76, e116-e116. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2020.v76.271>

Rice, R., Uyemoto, J., Ogawa, J., Pemberton, W. 1985. New findings on pistachio problems. *Calif. Agric.*, 39, 15-18.

Richardson, T.A. 2014. Host colonization patterns, cues mediating host selection and calibration of field surveys with estimates of population abundance of *Leptoglossus occidentalis* in a seed orchard. Tesis doctoral, University of Northern British Columbia.

Richardson, T.A., Strong, W.B., Aukema, B.H., Takács, S., Zahradnik, T., Lindgren, B.S. 2016. Assessment of cues potentially mediating host selection of *Leptoglossus occidentalis* on *Pinus contorta*. *Agric. For. Entomol.*, 19, 245-256. <https://doi.org/10.1111/afe.12203>

Ridge-O'Connor, G.E. 2001. Distribution of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Connecticut and parasitism by a tachinid fly, *Trichopoda pennipes* (F.)(Diptera: Tachinidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 103, 364-366.

Rijal, J.P., Joyce, A.L., Gyawaly, S. 2021. Biology, ecology, and management of hemipteran pests in almond orchards in the United States. *J. Integr. Pest Manag.*, 12, 24. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmab018>

Roversi, P.F. 2009. Adattamento di specie neo-introdotte, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. En: Jucker, C., Barbagallo, S., Roversi, P.F., Colombo, M. (eds.). *Insetti esotici e tutela ambientale*. Cermenate, Italy. Arti Grafiche Maspero Fontana.

Roversi, P.F., Maltese, M., Simoni, S., Cascone, P., Binazzi, F., Strangi, A., Sabbatini Peverieri, G., Guerrieri, E. 2017. *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae): a

suitable host for mass rearing *Ooencyrtus telenomicida* (Hymenoptera: Encyrtidae). Int. J. Pest Manag., 64, 294-302. <https://doi.org/10.1080/09670874.2017.1403059>

Roversi, P.F., Peverieri, G.S., Maltese, M., Furlan, P., Strong, W.B., Caleca, V. 2013. Pre-release risk assessment of the egg-parasitoid *Gryon pennsylvanicum* for classical biological control of *Leptoglossus occidentalis*. J. Appl. Entomol., 138, 27–35. <https://doi.org/10.1111/jen.12062>

Roversi, P.F., Santini, L., Rossi, E., Loni, A. 2011a. Ooparassitoidi di *Leptoglossus occidentalis* in Toscana. In Atti XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Genova, 13-16 Giugno.

Roversi, P.F., Strong, W.B., Caleca, V., Maltese, M., Sabbatini Peverieri, G., Marianelli, L., Marziali, L., Strangi, A. 2011b. Introduction into Italy of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), an egg parasitoid of the alien invasive bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Bull. OEPP, 41, 72-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02439.x>

Ruicănescu, A. 2009 *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera:Coreidae) în România, 153-154. In: Rákossy, L. and Momeu, L. (eds.). Neobiota din România. Presa Universitară Clujeană. Cluj-Napoca.

Sabbatini Peverieri, G., Furlan, P., Benassai, D., Caradonna, S., Strong, W.B., Roversi, P. F., 2013. Host egg age of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae) and parasitism by *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera, Platygasteridae). J. Econ. Entomol. 106, 633–640. <https://doi.org/10.1603/ec12344>.

Sabbatini Peverieri, G., Furlan, P., Simoni, S., Strong, W.B., Roversi, P.F. 2012. Laboratory evaluation of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae) as a biological control agent of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae). Biol. Control, 61, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.005>

Sánchez, G., Herrero, N., Aguado, A., León, D., Pérez, F., González. 2013. Seguimiento de *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann, 1910) en la Red de Centros Nacionales de Recursos Genéticos Forestales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 6º Congreso Forestal Español, Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio.

Schaffner, J.C. 1967. The occurrence of *Theognis occidentalis* in the midwestern United States (Heteroptera: Coreidae). J. Kans. Entomol., 40, 141-142.

Schneider, N. 2010. Découverte de *Leptoglossus occidentalis* HEIDEMANN, 1910 et redécouverte de *Lygaeus equestris* (L., 1758) au Luxembourg (Insecta, Hemiptera, Heteroptera). Bull. Soc. Nat. luxemb, 111, 115-116.

Schoettle, A.W., Negron, J. F. 2001. First report of two cone and seed insects on *Pinus flexilis*. West. N. Am. Nat., 61, 252-254.

Schowalter, T.D. 1994. Cone and seed insect phrenology in a Douglas-fir seed orchard during three years in Western Oregon. J. Econ. Entomol., 87, 758-765. <https://doi.org/10.1093/jee/87.3.758>

Schowalter, T.D., Sexton, J.M. 1990. Effect of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) on seed development of Douglas-fir at different times during the growing season in western Oregon. J. Econ. Entomol., 83, 1485-1486. <https://doi.org/10.1093/jee/83.4.1485>

Sciberras, A., Sciberras, J. 2010 Additions to the Heteroptera Fauna of the Maltese Islands (Hemiptera, Heteroptera, Coreidae). The Central Mediterranean Naturalist, 5, 50-54.

Shin, E., Kim, J., Park, C.G. 2017. Identification and laboratory behavioral test of the alarm pheromone of *Acanthocoris sordidus* Thunberg (Hemiptera: Coreidae). Entomol. Res., 47, 101-106. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12204>

SIG-FOREST. 2023. Sistema de Información de Especies Forestales. SIG Especies forestales en España. *Pinus pinea*. (Online) <http://ciforgis.inia.es/portal/apps/webappviewer/index.html?id=09c56a10c78d47259c2d8d6a20ff8a7f> [Fecha de acceso: 24 de julio de 2023].

Simov, N. 2008. Western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) already in Bulgaria. *Hist. Nat. Bulg.*, 19, 179-180.

Sousa, E., Ferreira, C., Pimpão, M., Naves, P., Valdivieso, T. 2012. Sanidade dos povoamentos de pinheiro manso em Portugal. Seminario Valorização da Fileira da Pihna/Pinhão. 18 de Setembro de 2012. Alcárcer do Sal, Portugal.

Stiling, P. 1993. Why do natural enemies fail in classical biological control programs?. *Am. Entomol.*, 39, 31-37. <https://doi.org/10.1093/ae/39.1.31>

Straser, R.K., Daane, K.M., Talamas, E., Wilson, H. 2022. Evaluation of egg parasitoid *Hadronotus pennsylvanicus* as a prospective biocontrol agent of the leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus*. *BioControl*, 67, 123-133. <https://doi.org/10.1007/s10526-022-10131-z>

Strong, W.B. 2006. Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can. Entomol.*, 138, 888-896. <https://doi.org/10.4039/n05-092>

Strong, W.B. 2015. Lodgepole pine seedset increase by mesh bagging is due to *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) exclusion. *J. Entomol. Soc. B.C.*, 112, 3-18.

Strong, W.B., Bates, S.L., Stoehr, M.U. 2001. Feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) reduces seed set in lodgepole pine (Pinaceae). *Can. Entomol.*, 133, 857-865. <https://doi.org/10.4039/Ent133857-6>

Summers, D., Ruth, D.S. 1987. Effect of diatomaceous earth, malathion, dimethoate and permethrin on *Leploglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae), a pest of conifer seed. J. Entomol. Soc. B.C., 84, 33-38.

Takács, S., Bottomley, H., Andreller, I., Zaradnik, 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: Biol. Sci., 276, 649-655. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0742>

Takasu, K., Hirose, Y. 1988. Host discrimination in the parasitoid *Ooencyrtus nezarae*: the role of the egg stalk as an external marker. Entomol. Exp. Appl., 47, 45-48. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1988.tb02280.x>

Takasu, K., Hirose, Y. 1993. Host acceptance behavior by the host-feeding egg parasitoid, *Ooencyrtus nezarae* (Hymenoptera: Encyrtidae): host age effects. Ann. Entomol. Soc. Am., 86, 117-121. <https://doi.org/10.1093/aesa/86.1.117>

Takasu, K., Takenaka, I., Sasaki, M. 2002. Physical factors affecting external host recognition by the polyphagous egg parasitoid *Ooencyrtus nezarae* (Hymenoptera: Encyrtidae). J. Insect Behav., 15, 851-858. DOI: 0892-7553/02/1100-0851/0

Talamas, E.J., Herlihy, M.V., Dieckhoff, C., Hoelmer, K.A., Buffington, M., Bon, M.C., eber, D.C. 2015. *Trissolcus japonicus* (Ashmead)(Hymenoptera, Scelionidae) emerges in North America. J. Hymenopt. Res., 43, 119-128. doi: 10.3897/JHR.43.4661

Tamburini, M., Maresi, G., Salvadori, C., Battisti, A., Zottele, F., Pedrazzoli, F. 2012. Adaptation of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* to Trentino, an alpine region (Italy). Bull. Insectology, 65, 161-170.

Tapias, R., Gil, L., Fuentes-Utrilla, P., Pardos, J.A. 2001. Canopy seed banks in Mediterranean pines of south-eastern Spain: a comparison between *Pinus halepensis*

Mill., *P. pinaster* Ait., *P. nigra* Arn. and *P. pinea* L. J. Ecol., 629-638.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00575.x>

Taylor, S.J., Tescari, G., Villa, M. 2001. A Nearctic pest of Pinaceae accidentally introduced into Europe: *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in northern Italy. Ent. News, 112, 101-103.

Tescari, G. 2001. *Leptoglossus occidentalis*, Coreide neartico rinvenuto in Italia (Heteroptera, Coreidae). Lavori Societa Veneziana di Scienze Naturali 26, 3-5.

Tescari, G. 2004. First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Croatia. Entomol. Croat. 8, 73-75.

Tiberi, R. 2007a. Danni alla fruttificazione del pino domestico: indagine sulle cause e sulle perdite di produzione. Unpublished report. ARSIA Toscana, Firenze.

Tiberi, R. 2007b. Progetto territoriale: Danni alla fruttificazione del Pino Domestico: Indagine sulle cause e sulle perdite di produzione. Arsia, Regione Toscana & Universitas Florentina, 19.

Tracy, J.L. 1987. Biological comparisons between the squash bug egg parasitoids, *Ooencyrtus anasae* (Ashmead) and *O. sp.*(Hymenoptera: Encyrtidae): a laboratory assessment. Tesis doctoral. B.S., Texas A&M University.

Tracy, J.L., Nechols, J.R. 1987. Comparisons between the squash bug egg parasitoids *Ooencyrtus anasae* and *O. sp.*(Hymenoptera: Encyrtidae): development, survival, and sex ratio in relation to temperature. Environ. Entomol., 16, 1324-1329.  
<https://doi.org/10.1093/ee/16.6.1324>

Tunca, H., Buradino, M., Colombel, E.A., Tabone, E. 2016. Tendency and consequences of superparasitism for the parasitoid *Ooencyrtus pityocampae* (Hymenoptera:

Encyrtidae) in parasitizing a new laboratory host, *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae) Eur. J. Entomol., 113, 51-59. DOI: 10.14411/eje.2016.006

Tunca, H., Colombel, E.A., Ben Soussan, T., Buradino, M., Galio, F., Tabone, E. 2015. Optimal biological parameters for rearing *Ooencyrtus pityocampae* on the new laboratory host *Philosamia ricini*. J. Appl. Entomol., 140, 527-535. <https://doi.org/10.1111/jen.12282>

Tunca, H., Colombel, E.A., Venard, M., Tabone, E. 2017. Incidence of superparasitism in the egg parasitoid, *Ooencyrtus kuvanae* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae). Biocontrol Sci. Technol., 27, 796-808. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1342765>

Tunca H., Tabone, E., Çaycı, D., Cosic, B., Toprak, Ö., Emin, A. 2022. *Ooencyrtus pityocampae* Mercet (Hymenoptera: Encyrtidae): a potential biocontrol agent of the seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae). Egypt. J. Biol. Pest Control, 32, 117. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00615-6>

Tunca, H., Venard, M., Colombel, E.A., Capelli, M., Tabone, E., 2019. Life history traits of *Ooencyrtus pityocampae* (Hymenoptera: Encyrtidae) reared on *Halyomorpha halys* eggs (Hemiptera: Pentatomidae). Entomol. Gen. 39, 93–101. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0761>

Uyemoto, J.K., Ogawa, J.M., Rice, R.E., Teranishi, H.R., Bostock, R.M., Pemberton, W.M. 1986. Role of several true bugs (Hemiptera) on incidence and seasonal development of pistachio fruit epicarp lesion disorder. J. Econ. Entomol., 79, 395-399. <https://doi.org/10.1093/jee/79.2.395>

Vaccino, P., Guidone, L., Corbellini, M., Tavella, L. 2008. Detection of damage due to bug feeding on hazelnut and wheat by biochemical techniques. Bull. Insectology, 61, 189-190.

Valcárcel, J., Portillo, P. 2009. Primer registro de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae) para Murcia (SE de la Península Ibérica). Arq. entomol., 2, 5.

Valcárcel, J., Prieto, F. 2010a. La contribución de registros fotográficos en internet para estudios faunísticos: el caso de la expansión iberoblear de la especie invasora *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae). Arq. entomol., 4, 45-52.

Valcárcel, J., Prieto, F. 2010b. Primeros registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hem., Coreidae) para Galicia (NO Península Ibérica). Arq. entomol., 4, 26.

Valdivieso, T., Pimpão, M., Trindade, C. S., Varela, M. C. 2017. Reproductive phenology of *Pinus pinea* in: Mutke S., Piqué M., Calama R. (Eds.), Mediterranean pine nuts from forests and plantations. CIHEAM (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 122), Zaragoza, pp. 63-68.

Van den Bosch, R., Messenger, P.S., Gutierrez, A.P. 1982. The ecological basis for biological control. An Introduction to Biological Control. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9162-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9162-4_2)

Van der Heyden, T. 2018a. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini) in Albania. Rev. chil. entomol., 44, 355-356.

Van der Heyden, T. 2018b. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini) in the Golan Heights. Revta. gad. Entom., 1, 1-3.

Van der Heyden, T. 2018c. New data on the distribution of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini), including the first record of the species in Georgia. *Rev. chil. entomol.*, 44, 433-435.

Van der Heyden, T. 2019a. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini) in Algeria. *Revta. gad. Entom.*, 10, 159-161.

Van der Heyden, T. 2019b. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini) in Costa Rica. *Rev. chil. Entomol.*, 45, 51-53.

Van der Heyden, T. 2019c. Summarized data on the European distribution of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini). *Rev. chil. Entomol.*, 45, 499-502.

Van der Heyden, T. 2020a. First records of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae:Coreinae: Anisoscelini) in Andorra. *Rev. chil. entomol.*, 22, 377-378.

Van der Heyden, T. 2020b. First records of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae:Coreinae: Anisoscelini) in Finland. *Rev. chil. entomol.*, 46, 73-74.  
<https://doi.org/10.35249/rche.46.1.20.09>

Van der Heyden, T. 2020c. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 in Guatemala (Hemiptera, Heteroptera, Coreidae). *Bol. Asoc. Esp. Entomol.*, 44, 213-214.

Van der Heyden, T. 2021. First records of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) in Estonia and Belarus. *Heteroptera Poloniae – Acta Faunistica*, 15, 5–6.

Van der Heyden, T., Faúndez, E.I. 2020. Primeros registros de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera:Heteroptera: Coreidae) en Brasil y Sudáfrica. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Parag., 24, 0-100.

Van der Heyden, T., Piterans, U. 2021. First records of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) in Latvia. Heteroptera Poloniae – Acta Faunistica, 15, 129-130. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5172913>

Van der Heyden, T., Zettel, H. 2019. First record of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) from Cyprus. Z. Arbeitsgem. Oesterr. Entomol., 71, 177-178.

Van Lenteren, J.C., Babendreier, D., Bigler, F., Burgio, G., Hokkanen, H.M.T., Kuske, S., Loomans, A.J.M., Menzler-Hokkanen, I., Van Rijn, P.C.J., Thomas, M.B., Tommasini, M.G. Zeng, Q. 2003. Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. BioControl, 48, 3-38. <https://doi.org/10.1023/A:1021262931608>

Vázquez, M.A., Costas, M., Outerelo, R., Melero-Alcíbar, R. 2009. Una chinche invasora en la Comunidad de Madrid: *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae). Heteropterus Rev. Entomol., 9, 49-51.

Villa, M., Tescari, G., Taylor, S. 2001. Nuovi dati sulla presenza in Italia di *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera Coreidae). Boll. Soc. entomol. Ital., 133, 103-112.

Visor IDECyL. 2023. Junta de Castilla y León (Online) <https://idecyl.jcyl.es/vcig/> [Fecha de acceso: 23 de agosto de 2023].

Wang, Q., Millar, J.G. 2000. Mating behavior and evidence for male-produced sex pheromones in *Leptoglossus clypealis* (Heteroptera: Coreidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 93, 972-976. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[0972:MBAEFM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0972:MBAEFM]2.0.CO;2)

Wazen, N., Fady, B. 2015. Geographic distribution of 24 major tree species in the Mediterranean and their genetic resources. FFEM project: maximize the production of goods and services by Mediterranean forests in a context of global changes. INRA-URFM, Avignon.

Werner, D.J. 2011. Die amerikanische Koniferen-Samen-Wanze *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) als Neozoon in Europa und in Deutschland: Ausbreitung und Biologie. Entomologie heute, 23, 31-68.

Wilson, F., Woolcock, L.T. 1960. Temperature Determination of sex in a parthenogenetic parasite. *Ooencyrtus submetallicus* (Howard)(Hymenoptera: Encyrtidae). Aust. J. Zool., 8, 153-169. <https://doi.org/10.1071/Z09600153>

Wolff, R.L., Bayard, C.C. 1995. Fatty acid composition of some pine seed oils. JAOCs, 72, 1043-1046. <https://doi.org/10.1007/BF02660719>

Woods, J., Strong, W., Carlson, M. 2015. Impact of Matador on lodgepole pine filled seed production in southern interior BC seed orchards: 2014 trial.

Yasuda, K. 1998. Function of the male pheromone of the leaf-footed plant bug, *Leptoglossus australis* (Fabricius)(Heteroptera: Coreidae) and its kairomonal effect. JARQ, 32, 161-166.

Yasuda, K., Tsurumachi, M. 1995. Influence of male adults of the leaf-footed plant bug, *Leptoglossus australis* (Fabricius)(Heteroptera: Coreidae), on host-searching of the egg parasitoid, *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead)(Hymenoptera: Scelionidae). Appl. Entomol. Zool., 30, 139-144. <https://doi.org/10.1303/aez.30.139>

Zahradnik, T.D. 2012. Exploitation of electromagnetic radiation as a foraging cue by conophagous insects. Tesis doctoral, Simon Fraser University.

Zhu, W. 2010. Exotic coreid bugs introduced into China. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> meeting of the International Heteropterist's Society. Nankai University, Tianjin, China, July 12–17, 2010. Nankai University, Tianjin, 73.

Zhu, G.P., Rédei, D., Kment, P., Bu, W.J. 2014. Effect of geographic background and equilibrium state on niche model transferability: predicting areas of invasion of *Leptoglossus occidentalis*. *Biol. Invasions*, 16, 1069-1081. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0559-z>

## Agradecimientos

Esta tesis está dedicada al Dr. Juan Alberto Pajares Alonso, quien me brindó la oportunidad de dedicarme a la investigación por un periodo de mi vida. Gracias Juan.

Agradezco a mis directores, Dr. Fernando M. Alves y Dr. Valentín Pando, todo el apoyo recibido para la realización y finalización de esta tesis. Desde el primer momento en el que comenzar a formar parte de ella se han mostrado muy atentos y me han ayudado con todo lo que he necesitado eficaz y rápidamente. También me gustaría agradecer a Dr. Pablo Martín, Dr. Felipe Bravo, Dr. Julio J. Díez Casero, Dr. Jorge Martín García y, en especial, a Dr. David Hall y a Juan Carlos Domínguez Alonso por la orientación cuando Juan se marchó. Sin olvidarme de la Dra. Rosario Sierra de Grado, quién me ayudó a entender aspectos biológicos de *O. obscurus*.

Esta tesis ha sido respaldada económicamente por la Junta de Castilla y León, a través del “Convenio de colaboración entre la Consejería de Fomento y Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León y la Universidad de Valladolid para la realización de un estudio sobre plagas de perforadores de piñas en *Pinus pinea* L.”, y por el Fondo Social Europeo y la Consejería de Educación de Castilla y León (JCyL) (ORDEN EDU/1100/2017). Agradezco a la Junta de Castilla y León destinar recursos a la investigación forestal, como es el estudio de *L. occidentalis*.

La colonia de *L. occidentalis* mantenida en laboratorio ha sido revitalizada anualmente por los Agentes Medioambientales de la Junta de Castilla y León, quienes han dedicado tiempo y esfuerzo en buscar y/o enviar insectos al Centro de Sanidad de Calabazanos, que, posteriormente han cedido a la Universidad de Valladolid. La colonia ha podido mantenerse en el laboratorio gracias a la predisposición de Mariano Rodríguez para facilitar plántulas en cualquier momento, incluso en los meses más restrictivos de pandemia. Por otro lado, los ensayos no podrían haberse realizado sin el consentimiento del uso de dos parcelas del banco clonal “El Molinillo” (Tordesillas, Valladolid) por parte del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Valladolid. Gracias a todos.

Finalmente quiero agradecer a Dr. Noyes y al Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, en especial al Dr. Antonio V. Sanz Ros, su colaboración en la identificación morfológica de los parasitoides.

Siempre he tenido curiosidad por el mundo de la investigación, sobre todo después de la primera clase de Plagas y Enfermedades Forestales de Grado, cuando Juan y Julio nos explicaron los trabajos de investigación de los que formaban parte pensé “quiero hacer eso” y, una cosa llevo a la otra. Ese mismo año tuve la oportunidad de realizar las prácticas de empresa en el Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, y en el último curso no dudé en apuntarme al resto de asignaturas relacionadas con las plagas forestales, en las que nos enseñaron lo que significan las palabras Manejo Integrado y, aprendí que las plagas y enfermedades forestales pueden manejarse de forma sostenible. Cuando finalicé el Grado surgió la oportunidad de formar parte del grupo de investigación de Juan, en ese momento comenzó a materializarse el contenido de esta tesis y otros cuantos ensayos. Me parece increíble que desde entonces hayan pasado ocho años, ha sido un periodo largo con momentos tristes y duros, como la repentina ida de Juan, o de derrota, por el fracaso de algunos ensayos o por el largo proceso de publicación de artículos en revistas de impacto. Sin embargo, también hubo momentos de satisfacción, como conseguir criar un montón de parasitoides en laboratorio después de dos años de intentos fallidos o la publicación del primer artículo. Durante todo este periodo he conocido a diferentes compañeros y compañeras, siempre dispuestos a ayudarme o de ofrecerme palabras de ánimo, como Jordán, Cristina, Abdullah, Irene, Álvaro, Sergio o Jonathan, quién me ha sacado más de una sonrisa por su miedo a los *Leptoglossus*. Estoy segura de que faltan personas, pero soy un poco “despistada” con las relaciones sociales. No puedo dejar de mencionar a compañeras de otras salas con los que he tenido conversaciones de ánimo y desánimo sobre la investigación, como son Sara, Daphne, Marina o Silvia. Y, por supuesto, no me puedo olvidar de mis compañeras de faena en campo y laboratorio, Ana, Ana Farinha, Tamara, María y Patricia. Al principio, “el equipo *Leptoglossus*” estaba formado por Ana, gran trabajadora empeñada en sacar los ensayos siempre a delante y a la perfección. En 2017 se unió Ana Farinha durante su estancia internacional, gran conocedora de la problemática de *L. occidentalis*, siempre que lo he necesitado me ha aconsejado muy cordialmente, muchas gracias Ana. En 2018 se unió Tamara, con la que he pasado muchas horas mirando larvas de *D. mendacella* en laboratorio y huevos de *L. occidentalis* en campo y, por supuesto buscando “bichos” en Tordesillas. Tamara ha sido una gran compañera, muy eficaz y estoy segura de que es capaz de conseguir todo lo que se proponga. Gracias por todo el

empeño dedicado en sacar adelante los ensayos. Por supuesto, no me puedo olvidar del integrante del grupo de plagas más importante en mi vida, Alberto, siempre dispuesto a ayudarme en cualquier tarea, aunque no fuese su cometido y, el que con gran paciencia ha soportado las últimas semanas de redacción de la tesis, que han sido bastante duras para los tres. Con tres me refiero a nuestro pequeño bicho, Héctor, quién llegó a nuestras vidas hace ya cuatro años y quién nos ha hecho y nos hará vivir momentos inimaginables. Desde pequeño ha visitado la colonia de *Leptoglossus* sin dudar en coger alguno para observarlo de cerca, es un gran amante de los animales y tiene una capacidad enorme para encontrar y toquetear insectos. La primavera pasada nos sorprendió diciendo que de mayor quiere trabajar con bichos, aunque sabemos que su pasión son los animales marinos. A nivel personal tengo que agradecer a Alberto todo lo que ha hecho mí, apoyándome en todo, ofreciéndome consejos, insistiendo en que siempre “hay que hacer una repetición más” y, sobre todo regalándome su tiempo. Aunque sé que siempre vas a estar ahí, no me faltes nunca. Por su puesto, a mis padres, que siento como dos montañas enormes a mis espaldas, les que agradezco toda la seguridad que me han ofrecido para poder llegar hasta este momento, tanto a nivel personal como formativo. Una vez mi madre dijo que “nada es imposible” y, en parte tiene razón, porque, aunque han sido varias las ocasiones en las que he sentido que la tesis podría conmigo, poquito a poquito la he ido dejando atrás y, aquí estoy concluyendo con este periodo de mi vida para comenzar otro nuevo con ilusión, fortaleza y, sobre todo, con el apoyo de mis personas más queridas. GRACIAS DE NUEVO.

Laura P.

*No importa lo lento que vayas mientras que no te pares*

*Confucio*



