



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

Campus  
de Excelencia  
Internacional

Selección y mejora genética de  
caracteres biológicos de interés  
en *Orius laevigatus* (Fieber)  
(Hemiptera: Anthocoridae)  
para incrementar su eficacia en el  
control de plagas

Técnicas Avanzadas en Investigación y  
Desarrollo Agrario y Alimentario



José Enrique Mendoza Rivas

Cartagena (2021)

Selection and genetic improvement  
of relevant biological traits in  
*Orius laevigatus* (Fieber)  
(Hemiptera: Anthocoridae)  
to increase its effectiveness in  
pest control

PhD Thesis

Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo  
Agrario y Alimentario

Autor: José Enrique Mendoza Rivas

Director: Dr. Pablo Bielza Lino

Cartagena (2021)



J. E. Mendoza, 2021. Selección y mejora genética de caracteres biológicos de interés en *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) para incrementar su eficacia en el control de plagas.

Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Cartagena, España

Ilustraciones de la portada y del Capítulo 1: Verónica Melguizo Reyes (@veroka66)

La investigación contenida en esta tesis doctoral ha contado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación, los fondos europeos FEDER (AGL2017-89600-R) y el Programa Regional de Fomento de la Investigación (Plan de Acción 2019) de la Fundación Séneca (Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, España) (20791/PI/18). El autor de esta tesis doctoral disfrutó de una beca de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de Universidades (FPU/1402932).



*Nos encontramos en los comienzos mismos de la era de la raza humana. No es ilógico que tengamos o que tropecemos con problemas, pero hay decenas de miles de años en el futuro. Es responsabilidad nuestra hacer lo que podamos, aprender lo que podamos, mejorar las soluciones y transmitir las a nuestra descendencia. Es responsabilidad nuestra dejar las manos libres a las generaciones futuras.*

Richard Feynman

*A ese punto en el mar oscuro donde la luz se acurruca*



## Agradecimientos

Homenajeando a una de mis películas favoritas, llegar hasta aquí era *Una cuestión de tiempo*. Parecía un camino irremediable, pero lo que podría interpretarse desde fuera como una línea muy dilatada en el tiempo, tiene sin embargo que ver más con un complejo entramado de experiencias que me han convertido en un hombre completamente diferente y desconocido para mí mismo: más sosegado y responsable, más realista y eficiente, y al mismo tiempo más satisfecho con la vida y con la gente que me rodea y, por tanto, más agradecido a todos:

A mi director de tesis, Pablo, por haberme permitido disfrutar de hacer ciencia, pero sobre todo por mostrarme el valor de transmitirla a los demás, y no hay mayor muestra de humildad que esa. A mis compañeros del grupo de Protección de Cultivos, como Dina, Josefina, Mari Ángeles, Carolina, Inma, Nerea, Juan, Mari Carmen, Fran, Javi, Amador, María José, María Garre, Edo, Ely, Mariela o María Inglés, entre otros. Todos ellos han sido fundamentales en el desarrollo de esta tesis. Pero sobre todo, es a Virginia a quien debo gran parte de los momentos felices que rodean a esta tesis. Ella formará parte para siempre de mi círculo más cercano porque, si algo se me ha dado bien alguna vez es detectar el talento, y esa honestidad involuntaria tan preciosa como insólita no se aprende, sino que se nace con ella. Por otra parte, nada de lo que he conseguido a la finalización de esta tesis habría sido posible sin ella. No quiero olvidarme tampoco de mis alumnos de primero de ESO del Colegio Ana María Matute, en Murcia, porque ha sido su entusiasmo por la Biología y por aprender lo que más me ha hecho disfrutar de mi primer año como profesor de instituto. Nada me haría más feliz que seguir haciendo ciencia con vosotros el próximo curso, porque estoy seguro de que no encontraré mejor recompensa en otro sitio que el futuro tan brillante que veo en vosotros.

Por supuesto, quiero dar las gracias a toda mi familia (mis padres, abuelos, hermanos, cuñados, sobrinos y más) y a mis amigos (Christian, Julia, Alejandro, Juan, Antoñico, Almudena, Fran, Rocío, Amparo, Silvia, Vero, Irene, las Miriams, Hanah y los demás), por inspirarme y apoyarme en mi amor por la ciencia y por soportar mi volatilidad y, pese a todo, estar siempre ahí cuando los necesito. Me gustaría hacer mención especial a Vero por aceptar ilustrar esta tesis. Tus manos le han dado un toque muy original a mi trabajo, y me ha hecho una ilusión muy especial que puedas contribuir con tu talento. Desde el primer día de carrera, en aquella bancada de la parte de arriba de nuestra clase, hasta el final de mi formación, juntos, codo con codo, entregados a la Entomología. Pero sobre todo quiero darte las gracias a ti, el orden de mi vida en el caos; siempre sobrevolando mis horas bajas. Dentro de esta selva en la que mi débil voluntad pelea, haces que parezca tan sencilla la tarea... No me imagino mejor acompañante en este viaje del cual se cierra ahora una etapa inolvidable.

Pero además de para dar las gracias, quisiera aprovechar este espacio de mi tesis para hablar de lo que ha significado para mí la ciencia. Hasta el momento en el que me encuentro hoy, a punto de poner fin a mi tesis doctoral, he pasado toda mi vida ansiando la habilidad de viajar al pasado para poner remedio a cada momento de desatino, a cada situación de desconcierto, a cada periodo de

apatía o desesperanza. Al fin y al cabo, la posibilidad de curar, de revertir el daño, de retroceder en el tiempo, es muy tentadora. Ese deseo se volvió especialmente recurrente durante los últimos años, en los cuales se enmarca esta tesis. Ante todo, quiero hacer hincapié en lo extraordinarios que han sido estos años, llenos de desafíos, de aprendizaje continuo, y de saborear un éxito que va mucho más allá que el reconocimiento: la posibilidad de hacer realidad un sueño de niño. Siempre quise ser científico. Quién sabe si por haber crecido rodeado de animales, o quizá desde aquella maqueta de *Triceratops* debajo del árbol de Navidad o el fósil de trilobites de mi estantería, o desde mi lectura de *El origen de las especies* y más adelante con Stephen Jay Gould o Richard Dawkins. El caso es que disfrutaba viajando mentalmente al futuro, y me imaginaba escudriñando el comportamiento animal, descubriendo y clasificando especies, diseñando bioensayos, refutando hipótesis, investigando. Estos años han supuesto un regalo inimaginable que siempre voy a llevar conmigo. Pero disfrutar no era suficiente. Yo quería hacer las cosas más rápido; ser más eficiente para así llegar más lejos; progresar sin cometer errores. Y resulta que, por un lado, el tiempo se lleva todavía peor con la ciencia que conmigo, y por otro, el error es un mal necesario pues confiere robustez al descubrimiento. Aprender a convivir con ellos se convirtió, así, en una obligación.

Sin embargo, a la conclusión de esta tesis termina una etapa en la que he mirado al pasado demasiadas veces buscando el impulso imposible. Y termina no porque tire la toalla (nada más lejos de la realidad), sino porque pronto empezará otra en la que los logros personales perderán relevancia para mí, ya que me dispongo a dar forma a la mayor ilusión de toda mi vida. Carol me dijo una vez que cuando nace un hijo, el centro de gravedad se traslada como por arte de magia desde uno mismo hacia esa nueva persona recién llegada. Pues bien, quizás sea porque empiezo a sentir la ingravidez que me he dado cuenta de que con el final de esta tesis se queda no mi amor por la ciencia, ni mucho menos, sino la posibilidad de deshacer el tiempo, si es que en algún momento de mi imaginación fue posible. Y es que si la fuerza, la suerte y sobre todo la ciencia me acompañan, no pasará mucho tiempo antes de que empiece a sentir que cada nuevo día de mi vida es irrepetible, y que no querré cambiarlo por nada. Por eso, a ese porvenir al que, a buen seguro, intentaré transmitir la importancia de jugar, la capacidad de soñar y viajar en el tiempo, la curiosidad por lo desconocido, la fascinación por lo diferente, la belleza de la incertidumbre, la preocupación por los problemas del mundo y, especialmente, cómo la ciencia contribuye a todo eso; a ese futuro que cierra la posibilidad de cualquier línea de tiempo alternativa y al que espero con el corazón y los brazos abiertos, van dedicados mis mejores días de entrega a la ciencia y, por tanto, esta tesis doctoral. Voy a confiar en el tiempo y en la ciencia, pues *suelen dar dulces salidas a muchas amargas dificultades*. Estoy seguro de que ambos me regalarán el mejor de los futuros posibles.

## Resumen

A principios de la década de los noventa, el cultivo de pimiento dulce de invernadero del Campo de Cartagena atravesaba una situación fitosanitaria insostenible, con dificultades en el control químico del trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), vector del virus del bronceado del tomate, que ponía en peligro la rentabilidad de este cultivo. En un intento de revertir la situación, se iniciaron una serie de bioensayos con base en el control biológico aumentativo, que culminaron con un cambio total en la estrategia de control, mejorando la situación fitosanitaria de todo el agroecosistema de la región. Uno de los principales contribuyentes a este cambio fue el chinche depredador *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae), un enemigo natural de gran éxito en el cultivo de varias especies vegetales, incluyendo el pimiento de invernadero, siendo esencial para el control del trips. Sin embargo, al igual que ocurre con otros agentes de control biológico, su establecimiento en los cultivos, y por tanto su eficacia en el control de la plaga, se ven limitados en ocasiones por algunos factores, como la escasez de presas, las bajas temperaturas o el efecto nocivo de los tratamientos fitosanitarios. En el desarrollo de agentes de control biológico, los esfuerzos se han centrado tradicionalmente en la búsqueda de nuevas especies de enemigos naturales más eficaces. Sin embargo, la acción beneficiosa de las especies autóctonas puede optimizarse mediante la mejora genética, explotando la variabilidad intraespecífica de aquellos rasgos que dificultan el establecimiento a largo plazo del depredador en el cultivo. Así, en esta tesis doctoral se desarrollan dos razas de *O. laevigatus* genéticamente mejoradas con un rendimiento superior en condiciones de alimentación óptima (mayor tamaño corporal) y subóptima (mayor tolerancia al polen), evaluando su eficacia antes de su uso en la protección de cultivos.

Diferentes características de los enemigos naturales pueden afectar a su rendimiento en los programas de control biológico. Entre ellas, el tamaño del cuerpo puede desempeñar un papel decisivo, ya que se ha asociado a un mayor rendimiento ecológico. No existen en la bibliografía estudios específicos sobre el tamaño del cuerpo en ninguna especie de *Orius* previo a esta tesis doctoral. Así pues, uno de los objetivos de este trabajo consistió en estudiar la variación del tamaño corporal en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*, así como seleccionar artificialmente una cepa con mayor tamaño corporal. A continuación, se estimaron los parámetros de la tabla de vida en comparación con los de una serie de poblaciones con un rango amplio de tamaños diferentes. En primer lugar, encontramos una variabilidad significativa en el tamaño corporal entre las poblaciones silvestres de *O. laevigatus*, con las poblaciones comerciales situadas dentro del rango natural de la propia especie. Sobre la base de esta variación, iniciamos un exhaustivo programa de mejora genética, obteniendo con éxito una cepa con un tamaño corporal significativamente mayor. Además, esta línea seleccionada mostró una mayor fecundidad cuando se le suministró un alimento nutricionalmente superior (huevos de *Ephestia*), así como una mayor fecundidad y longevidad con una dieta más pobre (polen de abeja). A pesar de presentar un tiempo de desarrollo ligeramente más corto, el potencial reproductivo general fue similar o incluso superior al de las poblaciones comerciales y sin seleccionar. Nuestra hipótesis es que las

características mejoradas de la cepa seleccionada de gran tamaño se basan en una capacidad superior para explotar los recursos nutricionales, lo que le confiere una mayor capacidad de recuperación en situaciones de estrés (baja calidad o cantidad de alimento) típicas de los ecosistemas agrícolas, mejorando su rendimiento como agente de control biológico.

A pesar de que esta cepa de gran tamaño mostró una aptitud reproductiva superior, la selección continuada hacia un carácter específico puede tener como consecuencia el coste negativo de una reducción de la capacidad depredadora, lo que a su vez afectaría a la eficacia del control biológico. Por ello, pusimos a prueba la capacidad depredadora de nuestra línea de gran tamaño antes de su utilización en programas de control biológico. Paralelamente, un mayor tamaño corporal puede desembocar en una ampliación del rango de presas, incluyendo a especies de mayor tamaño o a diferentes estadios de vida de las presas. En este sentido, nuestra cepa de mayor tamaño de *O. laevigatus* podría tener una tasa de depredación y un rango de presas superiores a los de las poblaciones comerciales y silvestres. Para comprobar ambas cuestiones, se estudió la respuesta funcional a diferentes densidades de *Frankliniella occidentalis* (adultos y larvas) y *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (ninfas) en nuestra variedad de *O. laevigatus* de gran tamaño, en comparación con una población comercial. Como resultado, el tamaño del depredador estaba significativamente relacionado con los parámetros de la respuesta funcional (tasa de ataque y tiempo de manipulación). La población mejorada genéticamente para un tamaño corporal más grande mostró una capacidad de depredación notablemente superior tanto sobre las larvas de trips como especialmente sobre los trips adultos, aunque no sobre los pulgones. Por tanto, el mayor tamaño corporal de nuestra raza seleccionada le ha permitido aumentar su eficacia como agente de control biológico de los trips.

Por otro lado, en muchos cultivos protegidos, el control biológico aumentativo depende en gran medida de los depredadores generalistas, cuya presencia continua en el cultivo permite una respuesta temprana a la inmigración y los brotes de la plaga. Su persistencia es posible gracias a su capacidad para alimentarse de alimentos alternativos como el polen, ya sea proporcionado por la planta o suplementado artificialmente. Sin embargo, la aptitud de estos depredadores disminuye cuando se alimentan de alimentos alternativos, lo que dificulta su rendimiento sobre la plaga. Este es el caso de *O. laevigatus*. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre diferentes alimentos alternativos y suplementarios. En esta tesis se presenta un nuevo enfoque para hacer frente a este reto: la mejora genética para aumentar el rendimiento con una alimentación subóptima. Así, se planteó un proceso de mejora genética partiendo de la exploración de una amplia variabilidad intraespecífica en cuanto a la fecundidad durante los diez primeros días en los que las hembras alimentaban exclusivamente de polen deshidratado de abeja (14.2 - 37.9 huevos / hembra para treinta poblaciones silvestres y comerciales). Finalmente se compararon los caracteres del ciclo vital entre dos líneas seleccionadas con una elevada tolerancia al polen y tres poblaciones de referencia: una comercial, una de origen silvestre y otra aclimatada al polen pero sin seleccionar, todo ello tanto con una dieta rica (huevos de *Ephestia*) como con una alimentación subóptima (polen). Las líneas seleccionadas mostraron valores considerablemente mejorados en cuanto a longevidad (1.5 veces), fecundidad temprana (1.3 veces) y durante toda la vida (1.9 veces), supervivencia de las ninfas (3.5 veces), tasa intrínseca de incremento natural ( $r_m$ ) (7.3 veces) y tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) (6.7 veces), en comparación con las poblaciones de referencia cuando fueron alimentadas con polen, aunque estos valores aún no alcanzaban a los registrados con la dieta óptima basada en *Ephestia*. Las poblaciones seleccionadas, a pesar que se alimentaron a base de polen, no dieron lugar a ningún coste ecológico cuando se alimentó de la

dieta óptima. Esta mejora adquirida tiene su origen en la ganancia genética y no en la plasticidad fenotípica de la propia especie para tolerar la restricción nutricional.

Una situación de escasez de presas tras la liberación de un enemigo natural o en determinadas condiciones a lo largo del ciclo del cultivo suele afectar negativamente a su establecimiento y, por tanto, perjudica la eficacia del control biológico aumentativo. Los depredadores omnívoros, capaces de alimentarse de una amplia gama de recursos tanto animales como vegetales, constituyen un enfoque adecuado para superar esta situación. Así, una vez demostrado que nuestra línea genética de *O. laevigatus* con una tolerancia superior a la alimentación sin presa presentó registros reproductivos y de longevidad mejorados en condiciones de alimentación restringida, es necesario estudiar las posibles contrapartidas que la selección haya podido llevar aparejadas. Un posible coste ecológico como consecuencia de la adaptación a la restricción nutricional podría ser la reducción de la capacidad depredadora del insecto sobre sus presas naturales, lo que podría perjudicar a su eficacia de control. Sin embargo, su rendimiento superior con una dieta subóptima podría derivarse de una capacidad superior para explotar cualquier recurso nutricional disponible, lo que proveería a este depredador de un rango más amplio de presas. Para dilucidar estas cuestiones, se examinó la tasa de depredación y la amplitud del rango de presas de nuestra población tolerante al polen antes de su uso potencial en programas de control biológico de plagas. Para ello, se estudió la respuesta funcional a diferentes densidades de *F. occidentalis* (adultos y larvas) y *M. persicae* (ninfas) en nuestra cepa mejorada de *O. laevigatus* en comparación con una población comercial. Así pues, no se observó coste ecológico alguno en las tasas de depredación sobre los adultos o sobre las larvas del trips en nuestra población tolerante al polen. Y lo que es más importante, esta línea mejorada también mostró una mayor capacidad de depredación sobre las ninfas de pulgón, demostrando así un rango de presas ampliado y, por tanto, una capacidad superior para explotar recursos de calidad subóptima.

Los depredadores omnívoros obtienen sus recursos de más de niveles tróficos diferentes, y eligen su alimento en función de la cantidad y la calidad de estos recursos. Por ello, suelen entablar relaciones de depredación intragremial cuando las presas se vuelven escasas. *O. laevigatus*, por ejemplo, se comporta normalmente como depredador omnívoro, pero se convierte en depredador superior del ácaro depredador *Amblyseius swirskii* Athias-Henriott (Acari: Phytoseiidae) cuando se libera en un sistema combinado con niveles bajos de su presa preferida, el trips *F. occidentalis*. En esta tesis hemos ensayado nuestras dos poblaciones de *O. laevigatus* mejoradas genéticamente para un mayor tamaño y para una mejor aptitud reproductiva con polen (para las cuales hemos demostrado una mayor diversificación en la dieta) con el fin de dilucidar los efectos potenciales de la especialización trófica en la preferencia de presas y en la depredación intragremial sobre el ácaro depredador, todo ello en comparación con una población comercial. Para ello, se registró la tasa de depredación sobre fitoseidos adultos, ya sea solos o en una situación de elección con diferentes ratios de disponibilidad de trips adultos, en condiciones de laboratorio. También se examinó el efecto de la adición de polen como alimento suplementario sobre la depredación intragremial y la preferencia de presas. Así, encontramos que las dos líneas mejoradas mataban hasta un 9% menos de ácaros depredadores y se alimentaban sobre todo de trips adultos, en comparación con la población disponible comercialmente. Concretamente, mientras que la población con un tamaño corporal más grande mostró una tasa de depredación total significativamente mayor, matando hasta un 150% más de trips adultos de lo esperado como consecuencia del mayor tamaño adquirido, la línea más tolerante al polen se ha definido como un eficaz explotador de recursos, dado que su capacidad para alternar eficazmente entre diferentes

presas y el polen le permite someter al trips adulto sin apenas necesidad de incurrir en la depredación intragremial. Por otro lado, la suplementación con polen tuvo un efecto significativo en la reducción de la depredación intragremial, pero sólo en el caso de la población tolerante al polen el efecto sobre la preferencia de presas fue significativo. Asimismo, se discute en esta tesis la teoría de la depredación intragremial y el impacto de la alternancia de presas en las redes tróficas y en las estrategias de control biológico.

Finalmente, y para ambas poblaciones mejoradas, ya sea en condiciones de alimentación óptima (tamaño más grande) como con una dieta subóptima (tolerancia superior a la alimentación sin presa), se discuten en esta tesis las implicaciones de la mejora en el desempeño de *O. laevigatus* como depredador generalista en cuanto a la dependencia de la densidad de su presa favorita, el trips de las flores, así como los posibles beneficios y aplicaciones agronómicas e industriales que éstas líneas mejoradas pueden presentar.

## Abstract

In the early nineties, the greenhouse sweet-pepper crops of Campo de Cartagena were going through an unsustainable phytosanitary situation, with difficulties in the chemical control of the thrips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), vector of the tomato spotted wilt virus, which endangered the profitability of this crop. In an attempt to reverse this situation, a series of augmentative biocontrol-based surveys were launched, resulting in a total change in the control strategy which improved the phytosanitary situation of the entire agro-ecosystem in the area. One of the main contributors to this change was the predatory bug *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae), a successful natural enemy in several crop species, including greenhouse sweet-pepper, being essential for thrips control. However, as with other biological control agents, its establishment in crops, and therefore its effectiveness in pest control, is sometimes limited by some factors, such as prey shortage, low temperatures or the harmful effect of phytosanitary treatments. In the development of biocontrol agents, efforts have traditionally focused on the search for new and more effective natural enemy species. However, the beneficial action of native species can be optimized by genetic improvement, exploiting the intraspecific variability of those traits that hamper the long-term establishment of the predator in the crop. Thus, in this PhD thesis, two genetically improved *O. laevigatus* strains with superior performance under optimal (larger body size) and suboptimal (higher pollen tolerance) feeding conditions are developed and tested prior to their use in crop protection.

A number of different characteristics of natural enemies can affect their performance in biological control programs. Among them, body size can play a key role, as it has been associated with higher ecological performance. No specific studies on body size in any *Orius* species prior to this PhD thesis exist in the literature. Thus, one of the goals of this work was to study body size variation in wild and commercial *O. laevigatus* populations, as well as to artificially select a strain with larger body size. We then examined their life table parameters in comparison with a series of populations exhibiting a range of body sizes. First, we found significant variability in body size among wild *O. laevigatus* populations, with commercial strains falling within the natural range of the species. Based on this variation, we launched a comprehensive selective breeding program, successfully obtaining a strain with significantly larger body size. In addition, this improved genetic line showed higher fecundity when fed a nutritionally superior food (*Ephestia* eggs), as well as higher fecundity and longevity when fed an inferior diet (honey bee dehydrated pollen). Despite a slightly slower development time, overall reproductive potential was similar or even superior to that of the commercial and unselected populations. We hypothesize that the improved characteristics of the large selected strain are based on a superior ability to exploit nutritional resources, giving it a higher resilience under stressful situations (low food quality or quantity) typical of agricultural ecosystems, improving its performance as a biological control agent.

Although this large strain showed superior reproductive fitness, continued selection for a specific trait may result in the cost of reduced predatory fitness, which in turn would affect the efficacy of biological control. Therefore, the predatory ability of our bigger line was tested prior to its use in biological control programs. In parallel, a larger body size can lead to a broadening of the prey range, including larger species or different life stages of prey. Thus, our larger *O. laevigatus* strain could have a higher predation rate and prey range than commercial and wild populations. In order to elucidate both issues, the functional response to different densities of *F. occidentalis* (adults and larvae) and *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (nymphs) was studied in our larger *O. laevigatus* strain compared to a commercial population. As a result, predator size was significantly related to functional response parameters (attack rate and handling time). The population genetically improved for larger body size showed a markedly superior predation ability, both on thrips larvae and especially on adult thrips, although not on aphids. Therefore, the larger body size of our selected strain may increase its efficacy as a biological control agent for thrips.

On the other hand, in many protected crops, augmentative biological control heavily relies on generalist predators, whose continued presence in the crop allows an early response to pest immigration and outbreaks. Their persistence is made possible by their ability to feed on alternative foods such as pollen, either provided by the plant or artificially supplemented. However, the fitness of these predators decreases when they feed on alternative foods, thus hindering their performance on the pest. This is the case of *O. laevigatus*. Extensive research has been carried out on different alternative and supplementary foods. In this thesis, a new approach to cope with this challenge is presented: genetic improvement to increase efficiency under suboptimal nutrition. Therefore, a genetic breeding process is proposed based on the exploration of a wide intraspecific variability in terms of fecundity during the first ten days feeding with pollen (14.2 - 37.9 eggs/female for thirty wild and commercial populations). Finally, life history traits were compared between two selected lines with high pollen tolerance and three reference populations: one commercial, one with a wild origin and one acclimated to pollen feeding but unselected, on both rich (*Ephestia* eggs) and suboptimal (pollen) diets. The selected lines showed considerably enhanced scores for longevity (1.5-fold), early (1.3-fold) and lifetime fecundity (1.9-fold), nymph survival (3.5-fold), intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) (7.3-fold) and net reproductive rate ( $R_0$ ) (6.7-fold), compared to the reference populations, when fed with pollen, although these values still did not reach those recorded with the optimal *Ephestia* eggs-based diet. The selected populations, although having been fed on pollen, did not give rise to any ecological cost when fed the optimal diet. This acquired improvement is due to genetic gain and not to the phenotypic plasticity of the species itself to tolerate nutritional restriction.

A situation of prey scarcity after the release of a natural enemy or under certain conditions throughout the crop cycle often negatively affects its establishment. Omnivorous predators, capable of feeding on a wide range of both animal and plant resources, are a suitable approach to overcome this situation. Thus, having demonstrated that our genetic line of *O. laevigatus* with superior tolerance to non-prey feeding exhibited improved reproductive and longevity records under restricted feeding conditions, it is necessary to study the potential trade-offs that selection may have brought. A possible fitness cost of adaptation to nutritional restriction could be the reduction of the insect's predatory capacity on its natural prey, which could be detrimental to its control efficiency. However, the superior performance observed in our selected strain with a suboptimal diet could derive from a superior ability to exploit any available nutritional resource, which would provide this predator with a wider range of prey. To elucidate these inquiries, we examined

predation rate and prey range extent of our pollen-tolerant population. To this end, the functional response to different densities of *F. occidentalis* (adults and larvae) and *M. persicae* (nymphs) was studied in our pollen-tolerant improved population of *O. laevigatus* compared to a commercial population. Hence, no trade-offs were observed in predation rates on either thrips adults or larvae in our pollen-tolerant strain. More importantly, it also showed a higher predation capacity on aphid nymphs, thus demonstrating an expanded prey range and thus a superior ability to exploit suboptimal quality resources.

Omnivorous predators obtain their resources from more than one trophic level, and choose their food based on the quantity and quality of these resources. Therefore, they often engage in intraguild predation relationships when prey become scarce. *O. laevigatus*, for example, typically behaves as an omnivorous predator, but becomes a top predator of the predatory mite *Amblyseius swirskii* Athias-Henriott (Acari: Phytoseiidae) when released into a combined system with low levels of its preferred prey, *F. occidentalis* thrips. In this thesis we have tested our two *O. laevigatus* populations genetically enhanced with larger body size and improved reproductive fitness on pollen (for which we have already demonstrated an increased dietary diversification), in order to elucidate the potential effects of trophic specialization on prey preference and intraguild predation on the phytoseiid, as compared to a commercial population. For this purpose, predation rate on adult phytoseiids, either alone or in a choice situation with different adult thrips availability ratios, was recorded under laboratory conditions. We also examined the effect of the supplementary food addition of pollen on intraguild predation and prey switching. Thus, we found that both improved lines killed up to 9% fewer predatory mites and fed mostly on adult thrips compared to the commercially available population. Specifically, while the population with a larger body size showed a significantly higher total predation rate, killing up to 150% more adult thrips than expected as a consequence of the larger body size acquired, the line with higher pollen tolerance has been defined as an efficient resource exploiter, since its ability to switch efficiently between different prey and pollen enables it to evade adult thrips defenses with little need to engage in intraguild predation. Pollen supplementation had a significant effect on reducing intraguild predation, but only in the case of the pollen-tolerant population the effect on prey preference was significant. The theory of intraguild predation and the impact of prey switching on food webs and biological control strategies are also discussed in this thesis.

Finally, for both genetically improved strains, either under optimal feeding conditions (larger body size) or with a suboptimal diet (superior tolerance to non-prey feeding), the implications of the improved performance of *O. laevigatus* as a generalist predator in terms of density dependence on its preferred prey, western flower thrips are discussed in this thesis, as well as the possible benefits and agronomic and industrial applications that these improved lines may present.

# Índice general

Capítulo 1: Introducción y planteamiento de tesis.....	19
ORIGEN Y DESARROLLO DEL CONTROL BIOLÓGICO EN EL PIMIENTO DE INVERNADERO EN LA REGIÓN DE MURCIA. 20	
El sistema combinado <i>Orius laevigatus</i> – <i>Amblyseius swirskii</i> .....	23
ORIOUS LAEVIGATUS: CUALIDADES Y LIMITACIONES COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO .....	24
<i>Orius laevigatus</i> como depredador generalista y omnívoro .....	27
Acción depredadora: la suelta inoculativa .....	28
Principales limitaciones para su establecimiento a largo plazo en el cultivo .....	29
HACIA UNA NUEVA ERA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS: SELECCIÓN Y MEJORA GENÉTICA DE ENEMIGOS NATURALES .....	31
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE TESIS .....	34
Objetivos de tesis .....	35
THESIS OUTLINE AND OBJECTIVES .....	36
Thesis objectives .....	37
REFERENCIAS .....	38
Capítulo 2: Selección para un tamaño corporal superior en <i>Orius laevigatus</i> : variabilidad intraespecífica e incidencia en sus parámetros reproductivos .....	47
MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
Variación intraespecífica .....	49
Selección para un tamaño más grande.....	50
Características del ciclo vital .....	52
Análisis estadístico.....	52
RESULTADOS .....	53
Variación intraespecífica .....	53
Selección para un tamaño más grande.....	54
Características del ciclo vital .....	55
DISCUSIÓN .....	58
REFERENCIAS .....	62
Capítulo 3: Selección de una línea de <i>Orius laevigatus</i> con una eficacia mejorada en la alimentación con polen .....	66

MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
Variabilidad intraespecífica .....	69
Selección para una mayor tolerancia al polen .....	69
Características del ciclo vital .....	70
Análisis estadístico .....	71
RESULTADOS .....	72
Variación intraespecífica .....	72
Selección para una mayor tolerancia al polen .....	72
Características del ciclo vital .....	75
DISCUSIÓN .....	78
REFERENCIAS .....	84
Capítulo 4: Respuesta funcional mejorada sobre larvas y adultos de <i>Frankliniella occidentalis</i> en una línea de <i>Orius laevigatus</i> seleccionada artificialmente para un tamaño más grande .....	89
MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
Cría de insectos .....	91
Capacidad depredadora y respuesta funcional .....	91
Análisis estadístico .....	92
RESULTADOS .....	93
DISCUSIÓN .....	97
REFERENCIAS .....	102
Capítulo 5: Evaluación de la respuesta funcional en una población de <i>Orius laevigatus</i> seleccionada artificialmente para una mayor tolerancia a la alimentación con polen .....	108
MATERIALES Y MÉTODOS .....	110
Cría de insectos .....	110
Capacidad depredadora y respuesta funcional .....	111
Análisis estadístico .....	111
RESULTADOS .....	113
DISCUSIÓN .....	116
REFERENCIAS .....	122
Capítulo 6: Importancia de la diversificación de la dieta en la coexistencia entre <i>Orius laevigatus</i> y <i>Amblyseius swirskii</i> : alternancia de presas y depredación intragremial .....	130
MATERIALES Y MÉTODOS .....	132
Cría de insectos y ácaros depredadores .....	132
Bioensayos sin elección de presa .....	133

Bioensayos de alternancia de presas .....	133
Análisis estadístico .....	133
RESULTADOS .....	135
Bioensayos sin elección de presa .....	135
Bioensayos de alternancia de presas .....	135
DISCUSIÓN .....	137
REFERENCIAS .....	145
Capitulo 7: Discusión general y conclusiones .....	151
CONCLUSIONES .....	154
CONCLUSIONS.....	157
REFERENCIAS .....	160

## Índice de Figuras

Figura 1.1. Ciclo biológico de <i>Frankliniella occidentalis</i> .....	20
Figura 1.2. <i>Orius laevigatus</i> . Adulto depredando al trips <i>Frankliniella occidentalis</i> .....	22
Figura 1.3. Dinámica poblacional de <i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Neoseiulus cucumeris</i> y <i>Orius laevigatus</i> en un cultivo de pimiento de invernadero en el Campo de Cartagena .....	22
Figura 1.4. <i>Amblyseius swirskii</i> .....	24
Figura 1.5. Distribución de <i>Orius laevigatus</i> en Europa .....	24
Figura 1.6. Ciclo biológico de <i>Orius laevigatus</i> .....	25
Figura 1.7. Dimorfismo sexual en <i>Orius laevigatus</i> .....	26
Figura 1.8. Apareamiento en <i>Orius laevigatus</i> .....	26
Figura 1.9. Huevo de <i>Orius laevigatus</i> .....	26
Figura 1.10. Larva del pulgón <i>Myzus persicae</i> .....	27
Figura 1.11. Acción depredadora en <i>Orius laevigatus</i> .....	27
Figura 1.12. Suelta inoculativa de <i>Orius laevigatus</i> en el cultivo .....	29
Figura 1.13. Mejora genética de enemigos naturales. ....	33
Figura 2.1. Distribución geográfica de las poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i> empleadas para iniciar el proceso de selección y mejora genética para un tamaño más grande .....	50
Figura 2.2. Relación entre el peso de los adultos y la anchura del pronoto en 12 poblaciones silvestres y una población comercial.....	53
Figura 2.3. Peso corporal de los adultos a lo largo de los ciclos de selección 1, 8, 15, 22 y 30 y media del 20% de los individuos de mayor tamaño seleccionados en los ciclos de selección 7 a 26, para los machos y las hembras.....	54
Figura 3.1. Supervivencia a lo largo del ciclo vital para las líneas seleccionadas y sin seleccionar de <i>Orius laevigatus</i> con dos dietas diferentes: huevos de <i>Ephestia kuehniella</i> y polen....	75
Figura 3.2. Fecundidad específica para poblaciones seleccionadas y sin seleccionar de <i>Orius laevigatus</i> alimentadas con dos dietas diferentes: huevos de <i>Ephestia kuehniella</i> y una mezcla comercial de polen.....	77
Figura. 3.3. Prueba de regresión entre la fecundidad total durante toda la vida de la hembra y la fecundidad durante los diez primeros días desde la emergencia, usando datos de hembras individuales o los valores medios de cada población .....	78
Figura 4.1. Respuesta funcional de las hembras de <i>Orius laevigatus</i> de Agrobio y BIG30 a diferentes densidades de presa. ....	96
Figure 5.1. Respuesta funcional de las hembras de <i>Orius laevigatus</i> de Agrobio y 2POL-13 a diferentes densidades de presas .....	115
Figura 6.1. Número de adultos de <i>Frankliniella occidentalis</i> y <i>Amblyseius swirskii</i> consumidos por una sola hembra de <i>O. laevigatus</i> de variedades comerciales y seleccionadas en una situación de elección con diferentes proporciones de presas, con o sin polen .....	138
Figura 6.2. Número total de presas consumidas por una sola hembra de <i>Orius laevigatus</i> de las poblaciones Agrobio, BIG30 y 2POL-11 en una situación de elección entre adultos de <i>Frankliniella occidentalis</i> y <i>Amblyseius swirskii</i> , con o sin polen como suplemento .....	140

Figura 6.3. Número de adultos de *Frankliniella occidentalis* y *Amblyseius swirskii* atacados por cada hembra de *Orius laevigatus* de Agrobio, BIG30 y 2POL-11 en situaciones de no elección frente a una situación de alternancia de presas, con o sin polen como alimento suplementario..... 141

## Índice de Tablas

Tabla 2.1. Origen y planta hospedante de las poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i> empleadas para el estudio de la variabilidad intraespecífica .....	49
Tabla 2.2. Poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i> incluidas en la población mezcla de partida, WildMix.....	51
Tabla 2.3. Tiempo de desarrollo (días), eclosión de los huevos (%) y supervivencia (%) de los estadios juveniles de diferentes poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> con diferentes tamaños corporales (en mm) .....	56
Tabla 2.4. Longevidad, fecundidad total y temprana, tiempo para el 50% de fecundidad y anchura del pronoto de la hembra de varias poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> alimentadas con diferentes dietas .....	57
Tabla 2.5. Parámetros de la tabla de vida de varias poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> .....	58
Tabla 3.1. Diferencias entre las poblaciones mediterráneas y comerciales de <i>Orius laevigatus</i> en la fecundidad temprana alimentadas con dos dietas diferentes .....	73
Tabla 3.2. Tiempo medio de desarrollo de los estadios ninfales, supervivencia de huevos a adulto y tamaño del cuerpo de diferentes poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> con dos tratamientos nutricionales diferentes .....	74
Tabla 3.3. Diferencias entre las poblaciones mediterráneas y comerciales de <i>Orius laevigatus</i> en la longevidad, la fecundidad total y temprana y en la supervivencia de las hembras durante los primeros 20 días de oviposición con dos dietas diferentes .....	76
Tabla 3.4. Parámetros de tabla de vida para poblaciones seleccionadas y sin seleccionar de <i>Orius laevigatus</i> alimentadas con dos dietas diferentes .....	77
Tabla 4.1. Número de presas atacadas y consumidas por cada hembra de <i>Orius laevigatus</i> en función de la densidad de diferentes tipos de presa .....	94
Tabla 4.2. Estimaciones de máxima verosimilitud a partir de regresiones logísticas de la proporción de diferentes tipos de presas atacados por hembras de <i>Orius laevigatus</i> en función de la densidad inicial de presas .....	95
Tabla 5.1. Número de presas consumidas por cada hembra de <i>Orius laevigatus</i> en función de la densidad de diferentes tipos de presa .....	113
Tabla 5.2. Estimaciones de máxima verosimilitud a partir de regresiones logísticas de la proporción de distintas presas atacadas por hembras de <i>Orius laevigatus</i> en base a la densidad inicial de presa .....	114
Tabla 5.3. Parámetros de respuesta funcional de <i>Orius laevigatus</i> sobre diferentes presas.....	116
Tabla 6.1. Número de presas consumidas por hembra de <i>Orius laevigatus</i> al alimentarse de varias densidades de <i>Amblyseius swirskii</i> , con o sin polen como suplemento.....	136
Tabla 6.2. Número observado y esperado de adultos de <i>Frankliniella occidentalis</i> consumidos, recuperados tras 24 h de contacto con hembras aisladas de <i>Orius laevigatus</i> , en diferentes proporciones de <i>Frankliniella occidentalis</i> y <i>Amblyseius swirskii</i> , con o sin polen como suplemento .....	139



## Introducción y planteamiento de tesis

At the beginning of the nineties, greenhouse sweet pepper crops in Campo de Cartagena were experiencing an unsustainable phytosanitary situation, with difficulties in the chemical control of the thrips *Frankliniella occidentalis*, vector of the tomato spotted wilt virus, which endangered the profitability of this crop. In an attempt to reverse this situation, a series of bioassays with a basis on augmentative biological control began, which culminated in a complete change in the control strategy, improving the phytosanitary situation of the entire agro-ecosystem in the region. One of the main contributors to this change was the predatory bug *Orius laevigatus*, a successful natural enemy in various crop species, including greenhouse sweet pepper, being essential for the thrips control. However, as with other biocontrol agents, its establishment in crops, and hence its effectiveness in pest control, are sometimes limited by some factors, such as prey shortage, low temperatures or the harmful effect of phytosanitary treatments. In the development of biological control agents, efforts have traditionally focused on finding new, more effective natural enemy species. However, the beneficial action of native species can be optimized through genetic breeding by exploiting intraspecific variability of those traits hindering long-term establishment of the predator in the crop. In this PhD thesis, two genetically enhanced *O. laevigatus* strains with a superior performance under optimal (larger body size) and sub-optimal (higher pollen tolerance) feeding conditions are developed and tested before their use in crop protection.

En abril de 2020 se cumplieron 25 años desde que tuviera lugar la implantación del control biológico a gran escala en el sureste de España a partir de la aparición y la rápida expansión del trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), una plaga clave que puso en jaque la supervivencia del cultivo de pimiento de invernadero a finales del siglo XX. El cambio de paradigma que significó pasar de un manejo tradicional basado en el control químico al empleo de enemigos naturales para controlar a las plagas, se reflejó en un artículo publicado en la revista *Phytoma* bajo el título *Datos preliminares sobre la utilización de Orius laevigatus Fieber en el control de Frankliniella occidentalis Pergande en pimiento en invernadero* (Sánchez *et al* 1995). Pues bien, esta tesis doctoral representa un paso adelante en el progreso del control biológico en general y en el empleo de *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) en el cultivo de pimiento en particular, en tanto que aborda la selección artificial como instrumento para mejorar determinados caracteres de interés agronómico en este enemigo natural. Así, a lo largo de los diferentes capítulos del presente documento se valoran las limitaciones a las que se enfrenta este antocórido a la hora de combatir a las poblaciones de trips y otras plagas en el invernadero, se propone la mejora genética como una herramienta que les permita sortear estas dificultades, y se desarrollan ampliamente dos programas de mejora, para finalmente evaluar las características biológicas y ecológicas de las poblaciones resultantes de dichos programas, así como sobre todo

el rendimiento depredador de estas nuevas razas de insectos, tanto en el momento de enfrentarse a su principal presa como en condiciones de alimentación subóptima.

## Origen y desarrollo del control biológico en el pimiento de invernadero en la Región de Murcia

*F. occidentalis* (Figura 1.1), conocido como el trips occidental de las flores, es una plaga tan polífaga que es capaz de desarrollarse en más de 500 especies vegetales (Lacasa y Sánchez 2002). Su presencia se detectó por primera vez en invernaderos de pimiento del campo de Cartagena en la primavera de 1988 (Lacasa *et al* 1988), siendo éste un cultivo al que afecta gravemente y en el que se manifiesta por los daños directos en forma de punteaduras que causa al alimentarse de los tejidos superficiales de flores, hojas y frutos, inyectando saliva y succionando los jugos celulares. Sin embargo, fue la manifestación del virus del bronceado del tomate (*tomato spotted wilt virus*, TSWV) en la primavera del año siguiente (Cuadrado *et al* 1989), del cual es el trips su principal vector, así como su rápida extensión por numerosos invernaderos de pimiento y por otros cultivos al aire libre en la Región de Murcia y en Almería (Jordá *et al* 1993), lo que a la postre acabó siendo determinante en la implementación del control biológico en estas zonas a finales del siglo XX. La elevada virulencia de esta enfermedad, que ocasiona daños muy graves en los frutos y afecta, por tanto, de forma directa a la producción, así como las dificultades para controlar al vector de forma estable y sostenida, desembocaron en un problema sin precedentes en el sur de la península. No en vano, las condiciones climáticas en esta zona permitían una actividad continua del trips a lo largo de todo el año con máximos de actividad a mediados de la primavera y del otoño, épocas en las que eran capaces de cerrar el ciclo en apenas 7-8 días, llegando a poner cada hembra un total de 200 huevos (Lacasa 2021).

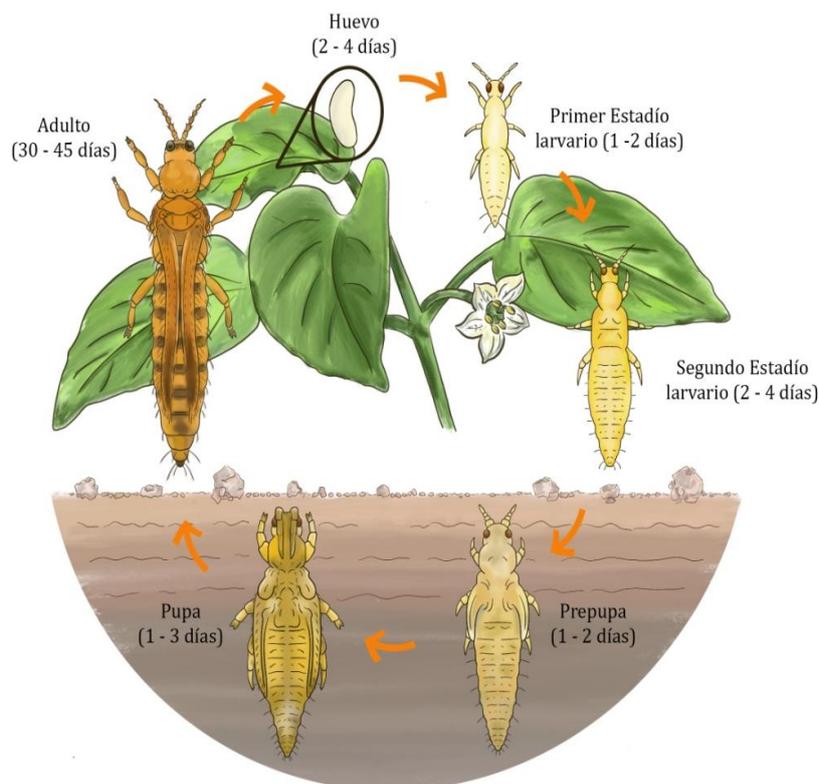


Figura 1.1. Ciclo biológico de *Frankliniella occidentalis*. Datos de longevidad a 26 °C (propios).

El tiempo que transcurría desde que las larvas adquirían el virus hasta que los adultos (que habían superado la fase ninfal en el suelo) lo inoculaban en plantas sanas dependía de la temperatura, siendo más corto a temperaturas más altas. Esto provocó que las epidemias de la enfermedad fueran rápidas y explosivas en el periodo considerado de mayor riesgo (de mediados de mayo a mediados de julio), haciendo de *F. occidentalis* una plaga muy limitante para el cultivo. No en vano, el porcentaje de plantas enfermas era muy elevado desde principios de junio, lo que hacía inviable gran parte de la cosecha (Lacasa 2021).

La contención de la virosis pasaba por implementar una serie de pautas preventivas que incluían la utilización de material libre del virus y del trips en la plantación, la eliminación de hospedantes alternativos (malas hierbas) en el invernadero o la colocación de mallas tanto en las aperturas de ventilación como en los accesos, entre otras (Lacasa *et al* 1991). Estas medidas, si bien eran imprescindibles, resultaron insuficientes para controlar de forma estable las poblaciones del vector (Contreras *et al* 1999). Por otra parte, la aplicación de organofosforados, piretroides y carbamatos que se usaban para reducir la dispersión y la multiplicación de especies autóctonas de trips como *Thrips tabaci* o *T. angusticeps*, se mostraban deficientes contra *F. occidentalis* (Balsas 1989), ya que las poblaciones que llegaron a España eran resistentes a estos productos (Espinosa *et al* 2002ab). Solo determinadas materias se mostraron ciertamente eficaces, aunque la ausencia de estrategias adecuadas y la frecuencia indiscriminada de las aplicaciones pronto desembocó en la selección de poblaciones resistentes (Espinosa *et al* 2005, Bielza *et al* 2007ab), en la acumulación de residuos en las plantas al límite de los autorizados o en el deterioro vegetativo de éstas como resultado de los coadyuvantes, sin olvidar el perjuicio para las tareas de recolección dentro del invernadero, que se encontraban supeditadas a continuos plazos de seguridad. De las más de 60 aplicaciones que se hacían con productos químicos, más de la mitad eran para controlar el trips, lo que da una idea de la magnitud del problema (Sánchez y Lacasa 2006). Con todo, las virosis seguían comprometiendo la continuidad de los cultivos y, por lo tanto, la productividad.

Fue en este contexto que el control biológico comenzó a abrirse paso, impulsado por el desarrollo de empresas de producción auxiliar y gracias al compromiso de algunos agricultores, técnicos e investigadores (Sánchez y Lacasa 2006, van der Blom 2008), con base en las experiencias de los Países Bajos (Ramakers 1990, 1993) y a partir de los buenos resultados alcanzados en los primeros ensayos realizados en el sureste de España para el control de los trips con enemigos naturales. Así, las especies autóctonas de *Orius* Wolff (Hemiptera: Anthocoridae), concretamente *O. laevigatus* (Figura 1.2) y *O. albidipennis* Reuter, se asociaban de forma natural al cultivo, destacando la primera de ellas desde finales del invierno y dando paso a *O. albidipennis* al inicio del verano, con el aumento de las temperaturas (Sánchez *et al* 1995, 1997). Syngenta Bioline y Koppert Biological Systems, dos de las principales casas comerciales de control biológico de plagas, iniciaron los primeros intentos de control biológico del trips en invernaderos comerciales (Sánchez *et al* 1997, van der Blom *et al* 1997), alcanzando una eficacia muy alta por parte de *O. laevigatus* y *O. albidipennis* en la reducción de la densidad de trips, siendo además clave la acción complementaria llevada a cabo por el ácaro fitoseido *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) durante los primeros meses del cultivo (Sánchez *et al* 1997) (Figura 1.3). El ácaro se instalaba muy bien al inicio del ciclo de cultivo, poco después del trasplante y siempre que no hubiera acumulación de residuos de insecticidas, liberándose al poco tiempo *O. laevigatus*, cuyas poblaciones comenzaban a crecer con el aumento de las temperaturas primaverales y apoyados en la depredación intragremial sobre el fitoseido. Las elevadas tasas de depredación resultantes, junto con la eliminación de las plantas con síntomas de TSWV que pudieran aparecer, lograron finalmente una estabilidad en el control de las epidemias del trips, evitando la explosión poblacional del vector y, por consiguiente, los daños graves de virosis que se venían produciendo a principios de mayo (Lacasa 2021). Para comprender la dimensión del éxito, cabe destacar que,

para conseguir un efecto similar con el control químico, eran necesarias entre 19 y 26 aplicaciones específicas (Sánchez *et al* 1997), con el consiguiente riesgo de aparición de resistencias y demás peligros asociados al uso indiscriminado de insecticidas.



Figura 1.2. *Orius laevigatus*. Adulto depredando al trips *Frankliniella occidentalis*.

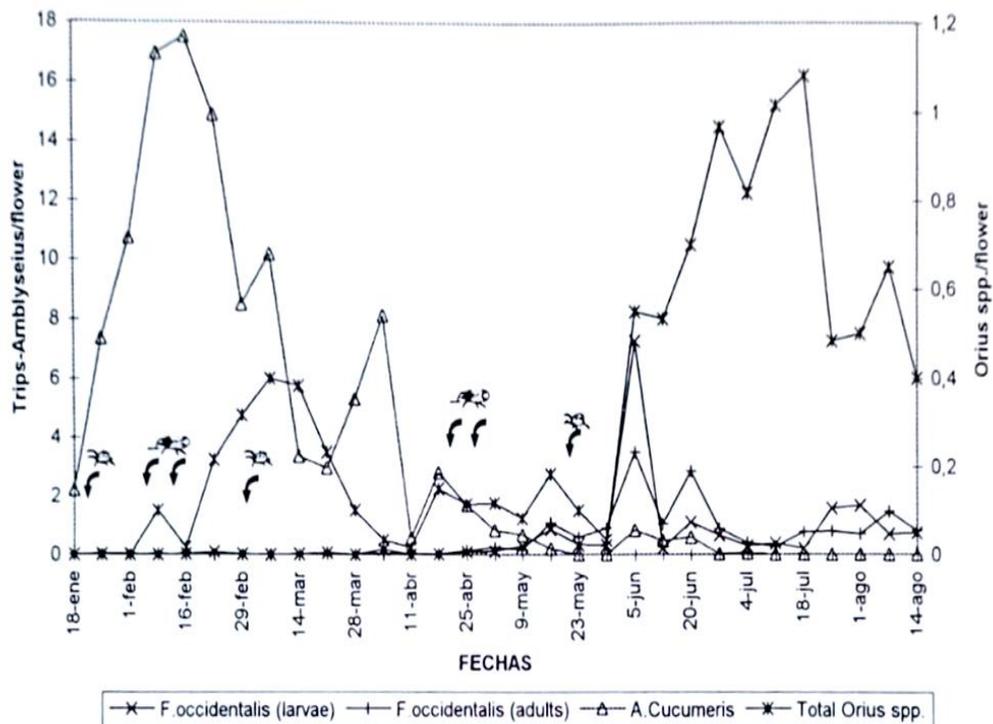


Figura 1.3. Dinámica poblacional de *F. occidentalis*, *N. cucumeris* y *O. laevigatus* en un cultivo de pimiento de invernadero en el Campo de Cartagena (Murcia). Las flechas indican las fechas de suelta de *Orius* y *Amblyseius* (Sánchez *et al* 1997).

### El sistema combinado *Orius laevigatus* – *Amblyseius swirskii*

El éxito de *O. laevigatus* para controlar las graves epidemias de *F. occidentalis* en el sureste de la península atrajo el interés de numerosas casas comerciales desde principios del siglo XX, las cuales rápidamente incluyeron al antocórido en sus catálogos de enemigos naturales, quedando de esta forma a disposición de los agricultores para su empleo en unos programas de control biológico aumentativo cada vez mejor implementados. Si bien la acción combinada de este chinche con el fitoseido *A. cucumeris* era una realidad en el cultivo de pimiento de invernadero, la invasión de nuevos biotipos resistentes de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) en Europa (Fernández *et al* 2009) y las grandes pérdidas de producción ocasionadas en el pimiento de invernadero fueron los principales desencadenantes del uso extendido de otros fitoseidos en los programas de control de esta plaga, la cual había alcanzado una dimensión en este cultivo (Nomikou *et al* 2001) al nivel del trips de las flores, debido a los daños directos por alimentación y también por la transmisión de virus. Sin embargo, el detonante definitivo llegó a partir de un análisis por parte de *Greenpeace Germany* en el que se detectaron residuos de metil-isofenfos, un organofosforado sin registro en la Unión Europea y que se usaba para combatir al trips, en el 60% de las muestras de pimiento provenientes de España (Krautter 2007), provocando el colapso de uno de los mercados, el alemán, más importantes en términos de exportaciones de este producto desde nuestro país (van der Blom *et al* 2008).

En este contexto, la introducción y utilización, desde 2007, de un ácaro fitoseido originario de la costa este del Mediterráneo, *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae), promovida por Koppert (Hoogerbrugge *et al* 2005, Belda y Calvo 2006), y en combinación con *O. laevigatus*, vino a aportar una solución de control estable para las dos plagas clave del pimiento bajo plástico, mosca blanca y trips de las flores. Y es que *A. swirskii* (Figura 1.4), gracias a sus cualidades como depredador generalista, es capaz de desarrollarse y reproducirse de forma efectiva a partir de un amplio rango de presas, especialmente sobre estas dos plagas principales, además de que puede subsistir en el cultivo gracias al polen de las propias plantas, al tratarse de un depredador omnívoro (Bolckmans *et al* 2005). Estas cualidades favorecían su complementariedad con el antocórido, haciendo que el control biológico de ambas plagas con el sistema basado en *A. swirskii* y *O. laevigatus* no solo fuera más eficiente, sino también más barato que la estrategia utilizada anteriormente, consistente en el parasitoide *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) para el control de la mosca blanca y *N. cucumeris* y *O. laevigatus* para el control del trips (Calvo *et al* 2012). En consecuencia, la superficie de pimiento de invernadero del sureste peninsular bajo control biológico pasó de 200 hectáreas en la campaña 2005-2006 a alrededor de 10000 hectáreas en la campaña 2008-2009 (van der Blom *et al* 2009, Frutas y Hortalizas 2014) hasta llegar al 100% de la superficie cultivada en la actualidad, al tiempo que el porcentaje de detección de residuos de insecticidas en muestras de pimiento se redujo de un 33.3 a menos del 1% a lo largo de la campaña 2007-2008 (Glass 2012).

Actualmente, *O. laevigatus* y *A. swirskii* se encuentran incluidos ambos en la lista de organismos beneficiosos de control comercializados en España, publicada por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM 2010), y el sistema de control biológico combinado formado por ambos continúa siendo el más recomendado para el control del trips en el cultivo de pimiento en el Campo de Cartagena y Almería, hasta el punto de que no se entiende la producción de esta hortaliza bajo plástico sin el empleo de estos enemigos naturales (Calvo *et al* 2015).

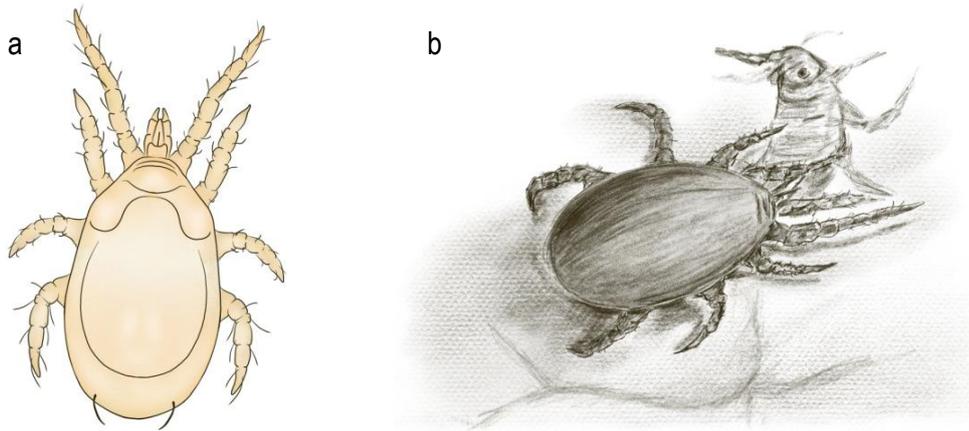


Figura 1.4. *Amblyseius swirskii*. Hembra adulta (a) y adulto depredando a una larva de primer estadio de *F. occidentalis* (b).

### ***Orius laevigatus*: cualidades y limitaciones como agente de control biológico**

*O. laevigatus* es un depredador zoofitófago perteneciente a la familia Anthocoridae, dentro del orden de los hemípteros. Se trata de un insecto muy común en toda la cuenca mediterránea, en las islas británicas y en algunos países del centro de Europa (Fauna Europaea 2020) (Figura 1.5). Como se indicó en el apartado anterior, en España es una de las especies de *Orius* más presentes y abundantes, llegando a acaparar el 50% de los muestreos de este género, y encontrándose asociado a una gran variedad de plantas silvestres (Ferragut y González-Zamora 1994, Riudavets y Castañé 1994, Lacasa y Llorens 1998).

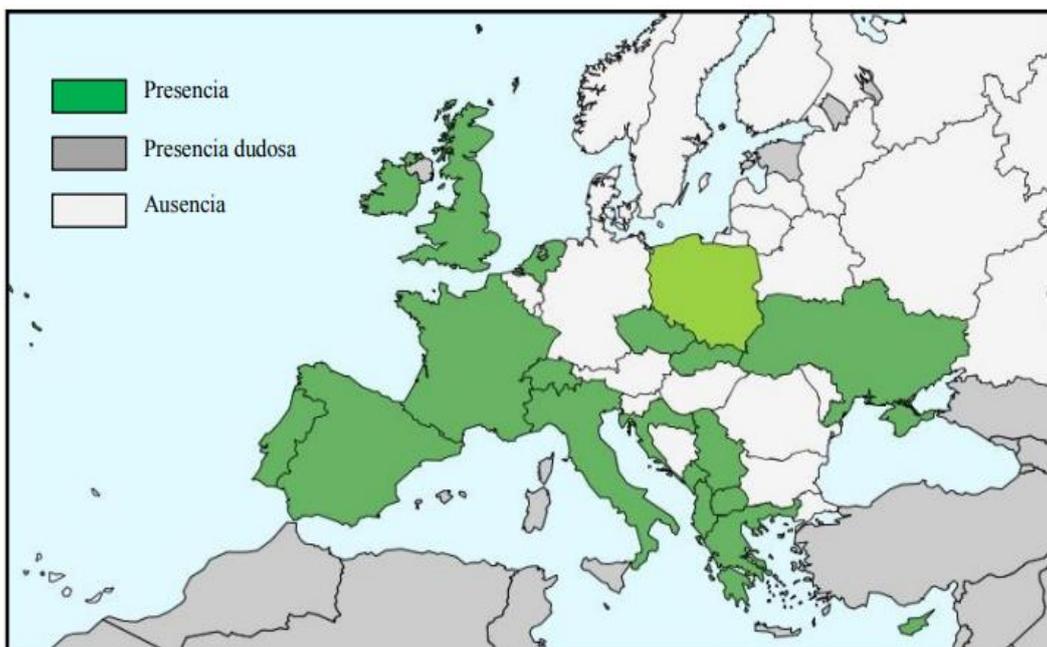


Figura 1.5. Distribución de *Orius laevigatus* en Europa (Fauna Europaea 2020).

Como el resto de los hemípteros, *O. laevigatus* tiene un desarrollo hemimetábolo, de manera que al estadio de huevo le suceden cinco estadios ninfales antes de alcanzar la fase adulta (Lacasa y Llorens 1998) (Figura 1.6). El adulto, de 1.4 - 2.4 mm de longitud y coloración oscura aunque variable, está dotado de alas de tipo hemiélitro con el extremo de su parte membranosa de color oscuro (Figura 1.2), lo cual es un carácter taxonómico que diferencia a *O. laevigatus* del resto de especies del género (Péricart 1972).

*O. laevigatus* presenta sexos separados, y entre ellos encontramos un evidente dimorfismo sexual, de forma que, mientras la hembra tiene un tamaño más grande y presenta el final del abdomen simétrico y terminado en un ovipositor (Figura 1.7a), los dos últimos segmentos del abdomen del macho se muestran desplazados hacia la izquierda (Figura 1.7b), con el parámero u órgano copulador en su interior, el cual es también un carácter taxonómico que permite diferenciar a las distintas especies de *Orius* (Ferragut y González-Zamora 1994). Las hembras de *O. laevigatus* son monándricas, es decir, una vez tiene lugar la cópula (Figura 1.8) y la hembra está grávida, ésta evita nuevos intentos de acoplamiento por parte del macho, el cual, en cambio, sí es capaz de inseminar a varias hembras (es poligínico) (Leon-Beck y Coll 2009). A continuación, las hembras almacenan el esperma del macho y lo usan para fertilizar los huevos que van produciendo a lo largo de su vida (Figura 1.9a), llegando a ovipositar hasta 300 huevos con una tasa máxima de unos 10 huevos al día. Para ello, la hembra inserta el ovipositor en el material vegetal e insertan el huevo, quedando éste posicionado verticalmente (Lundgren *et al* 2008), con el extremo proximal hacia el exterior y finalizando en un opérculo cuyo relieve es, de nuevo, un carácter taxonómico de identificación de especies de *Orius* (Schuldiner-Harpaz y Coll 2012, Figura 1.9b).

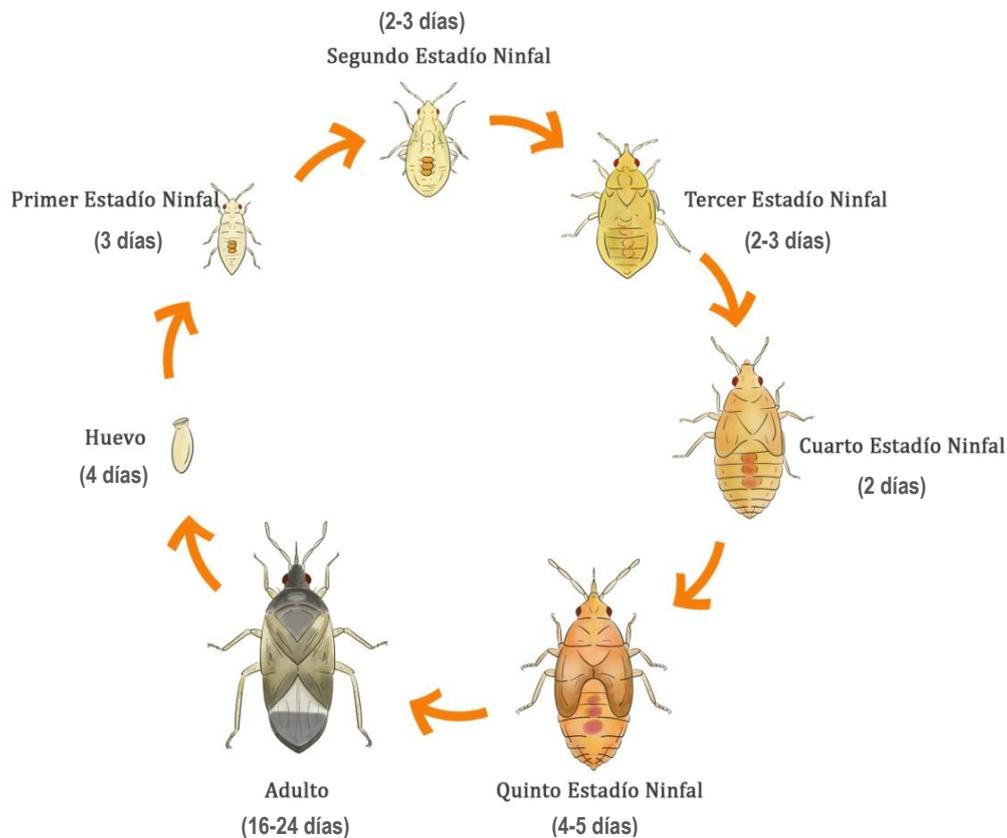


Figura 1.6. Ciclo biológico de *Orius laevigatus*. Datos de longevidad a 26 °C (propios).

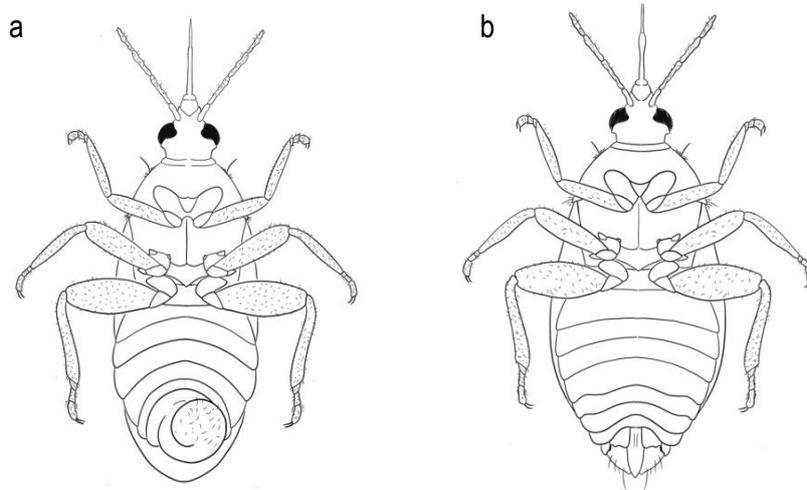


Figura 1.7. Dimorfismo sexual en *O. laevigatus*. Vista ventral del macho (a) y de la hembra (b).



Figura 1.8. Apareamiento en *O. laevigatus*, con el macho acoplado sobre la hembra, rodeándola ventralmente con el final de su abdomen.

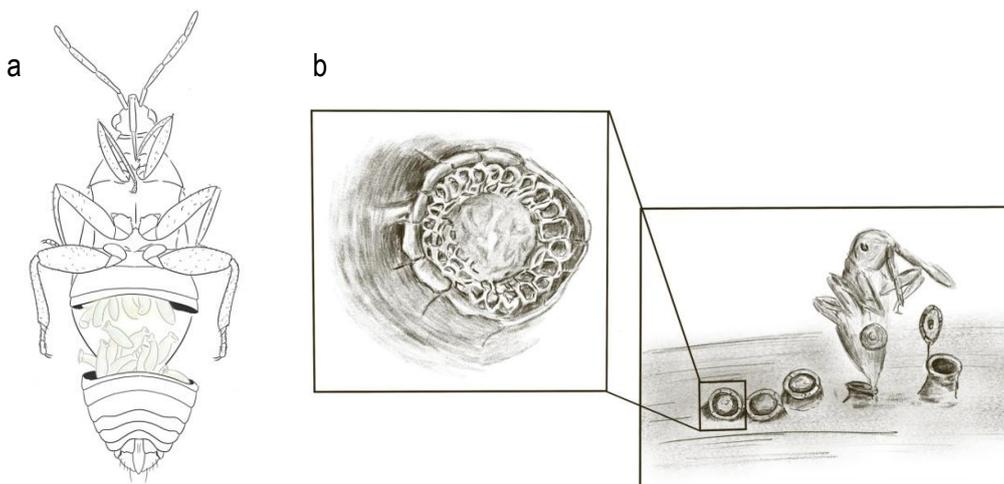


Figura 1.9. Huevo de *O. laevigatus*. Hembra grávida diseccionada, con numerosos huevos en su interior (a), y huevos abiertos y cerrados insertos en el material vegetal, con ninfa de primer estadio emergiendo y detalle de la morfología del opérculo (b).

### *Orius laevigatus* como depredador generalista y omnívoro

*O. laevigatus* es un enemigo natural dotado de una gran voracidad y un amplio espectro de presas entre las que se incluyen numerosas plagas de los cultivos como pulgones (Figura 1.10), mosca blanca, huevos de lepidópteros, ácaros y trips, con especial preferencia por este último grupo de especies (Alvarado *et al* 1997, Montserrat *et al* 2000, Venzon *et al* 2002, van Lenteren y Bueno 2003, Tommasini *et al* 2004). Concretamente, a *O. laevigatus* se le considera el principal enemigo del trips *F. occidentalis* (Chambers *et al* 1993, Tommasini y Nicoli 1993, Blaeser *et al* 2004). No en vano, es el único que ataca a individuos adultos de esta plaga, y tanto el adulto como sus estadios ninfales son capaces de realizar la actividad depredadora (Figura 1.11) (Cocuzza *et al* 1997a, Arnó *et al* 2008). Además, a diferencia de otras especies del género, *O. laevigatus* es la única que no presenta diapausa reproductiva durante los días más cortos del invierno, lo que supone una ventaja tanto para su manejo en periodos climáticos desfavorables como para su eficacia en el control del trips, ya que tampoco esta plaga sufre diapausa (Tommasini y van Lenteren 2003).

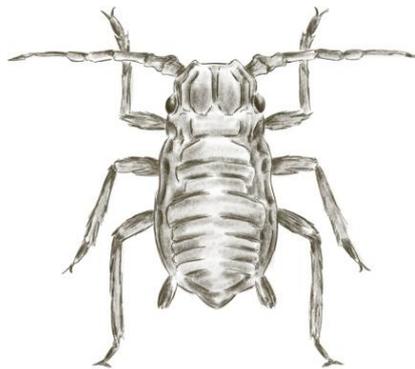


Figura 1.10. Larva del pulgón *Myzus persicae* S. (Hemiptera: Aphididae), una de las plagas secundarias controladas por *O. laevigatus*.

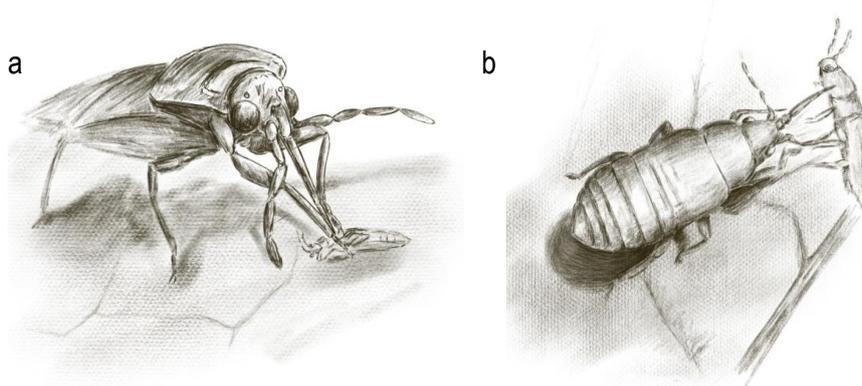


Figura 1.11. Acción depredadora en *O. laevigatus*. Adulto (a) y ninfa (b) atacando al trips.

Por otro lado, el éxito de *O. laevigatus* como agente de control biológico radica en su capacidad para persistir en el cultivo a pesar de las fluctuaciones de la densidad de su principal presa, incluso en condiciones de escasez o ausencia de la plaga. Además, su presencia continua permite una respuesta temprana a la inmigración de plagas o a los brotes poblacionales (Sánchez *et al* 2000). Esto es posible gracias a sus cualidades como depredador omnívoro, de manera que este insecto es capaz de alimentarse a base de determinados recursos que las plantas del cultivo pueden

ofrecerle, como la savia, el néctar y sobre todo el polen (Cocuzza *et al* 1997b). De hecho, según Bouagga *et al* (2017), *O. laevigatus* pasa más de un tercio del tiempo alimentándose de la planta y, además, se ha demostrado la capacidad nutricional del polen para garantizar la supervivencia y la reproducción de este insecto (Biondi *et al* 2016). Esta cualidad hace posible su introducción en el cultivo de forma preventiva, en cuanto se abren las primeras flores, lo que resulta determinante para que pueda llevar a cabo un control eficiente de las poblaciones de *F. occidentalis*. Es cada vez más usual, por otro lado, entre las estrategias empleadas en las sueltas inoculativas de enemigos naturales omnívoros, añadir al cultivo ciertos alimentos alternativos que permitan a las poblaciones del depredador subsistir cuando los niveles de la plaga se reducen por debajo del umbral de subsistencia de éste. Así, en cultivos con escasa o nula producción de polen, como el crisantemo (Leman y Messelink 2015), el pepino de invernadero (Oveja *et al* 2016) o el pimiento tipo capia (Bielza 2021), frecuentemente se suplementan las sueltas de fitoseidos con polen de *Typha angustifolia* L. (Messelink *et al* 2014), o bien se usan ciertas presas alternativas como huevos de la polilla de la harina, *Ephestia kuehniella* Z., o quistes de *Artemia franciscana* L. para sustentar las poblaciones de míridos (Calvo *et al* 2012, Brenard *et al* 2019, Benson y Labbe 2021), facilitando su rendimiento en el ejercicio del control biológico.

### Acción depredadora: la suelta inoculativa

Como ya hemos visto, en el cultivo de pimiento de invernadero en el Campo de Cartagena, la liberación de *O. laevigatus* tiene lugar en los primeros meses del año, en cuanto se abren las primeras flores, cuando la presión por parte del trips aún es residual y el polen está disponible para el depredador. Dicha suelta es de tipo inoculativo, es decir, se realiza de forma preventiva, en contraposición a la suelta inundativa, que tiene un efecto curativo más inmediato y no busca la instalación del insecto a largo plazo. La densidad más apropiada de suelta es de 1.5 a 3 individuos adultos por metro cuadrado (CARM 2020), aunque se ha asegurado en numerosas ocasiones que la suelta de un individuo por metro cuadrado es suficiente para controlar de forma eficaz al trips (Tavella *et al* 1996, Tommasini y Maini 2001, Bosco *et al* 2008). Sin embargo, se ha señalado también que una segunda suelta del insecto es recomendable para lograr el establecimiento y la multiplicación de una población estable a medio plazo que permita mantener a la plaga bajo el umbral económico de daños (Sánchez *et al* 1997, Sánchez y Lacasa 2002, Weintraub *et al* 2011, Elimem *et al* 2018). En cualquier caso, una correcta distribución del insecto es aquella que se centra en zonas con un mayor número de flores abiertas, reforzando las bandas y los accesos en los que el riesgo de entrada de la plaga es más elevado (CARM 2020).

La suelta de *O. laevigatus* suele realizarse en cajas de cartón, las cuales se cuelgan en la primera cruceta de la planta (o en la segunda si se repite la suelta), y se liberan junto con un sustrato que permita evitar el canibalismo, como puede ser vermiculita o cáscara de trigo sarraceno (Figura 1.12). A partir de ese momento, los adultos comienzan a dispersarse por el cultivo y a colonizar las flores, donde encuentran polen y néctar, así como al trips, y donde, por tanto, se alimentan de forma mayoritaria. Sin embargo, según Cocuzza *et al* (1997a), *O. laevigatus* no lleva a cabo una actividad intensa de búsqueda, sino que tiende a localizar a su presa de forma aleatoria, aunque es capaz de detectar movimientos rápidos a una distancia de un centímetro (Eubanks y Denno 2000), momento en que atacan rápidamente, sujetando a la presa con sus patas delanteras e insertando el estilete para succionar el contenido de su cuerpo (Figura 1.11). A las 2-3 semanas de realizar la última suelta, se lleva a cabo un diagnóstico de presencia tanto del trips como de los depredadores en las flores (Hansen *et al* 2003) con el fin de ratificar la eficacia del control por parte del orius, verificando asimismo que hay presente un número consistente de ninfas en ellas para garantizar la presencia del insecto a largo plazo en el cultivo (CARM 2020).



**Figura 1.12.** Suelta inoculativa de *Orius laevigatus* en el cultivo. Distribución en cajas de suelta.

### Principales limitaciones para su establecimiento a largo plazo en el cultivo

Teniendo en cuenta todo lo anterior, resulta obvio que la instalación temprana, el establecimiento y la posterior distribución en los invernaderos de *O. laevigatus* es de vital importancia en el éxito de la gestión integrada de plagas. Sin embargo, los agricultores manejan sus cultivos con el fin de conseguir una producción eficiente, sin prestar, en general, demasiada atención a las necesidades de las especies que atacan a las plagas. Sin embargo, es frecuente que los cultivos constituyan ambientes desfavorables para algunos enemigos naturales, comprometiendo su rendimiento como agentes de control biológico (Urbaneja *et al* 2003, Bielza *et al* 2020). Concretamente, el cultivo de pimiento bajo plástico es un sistema tan simple que en ocasiones puede no llegar a satisfacer los requerimientos básicos para el mantenimiento de las poblaciones de muchos enemigos naturales (Sánchez 2021).

Entre las dificultades a las que se enfrenta *O. laevigatus* a la hora de establecerse en el cultivo a largo plazo, una de las más importantes es la alimentación en condiciones de escasez de presas, la cual resulta clave para el uso de este insecto en programas de control biológico inoculativo (Bielza *et al* 2020). Y es que a pesar de que, como hemos visto, este depredador es capaz de sobrevivir a partir del polen de las plantas de pimiento, también es cierto que se ha observado una reducción drástica en su supervivencia y en su fecundidad y, por consiguiente, en la capacidad de multiplicación de sus poblaciones cuando se alimentan exclusivamente a partir de este recurso nutricionalmente subóptimo (Cocuzza *et al* 1997b). Un efecto similar se ha observado en una serie de pruebas de laboratorio encaminadas a encontrar una dieta artificial factible para la cría de este insecto en condiciones controladas (Bonte y de Clercq 2008), así como en ensayos en los que se proveía al depredador de ciertas presas no preferidas (Arijs y de Clercq 2001, Messelink *et al* 2011). En otros, la duración del periodo de preoviposición, el número total de huevos producidos y la tasa de eclosión se vieron también afectados por el tipo de alimento (Tommasini *et al* 2004, Xu *et al* 2006, Sengonça *et al* 2008). Todos ellos demostraron la elevada dependencia que presenta este insecto de su principal presa, el trips de las flores (Venzon *et al* 2002), a pesar de que es posible criarlos de forma óptima con un alimento nutricionalmente muy rico como son los huevos de *E. kuehniella*, hasta el punto de que la fecundidad puede alcanzar o incluso superar a la de una alimentación basada en el trips (Tawfik y Atta 1973, Zaki 1989, Tommasini y Nicoli 1993). El hecho

de que las poblaciones que se distribuyen comercialmente provengan de ciclos de numerosas generaciones criadas con esta alimentación óptima no hace sino amplificar el salto que supone pasar de unas condiciones controladas a las que el insecto está habituado a un ambiente tan fluctuante como el que se encuentra en el momento de la suelta (Grenier y de Clercq 2003).

Por otro lado, los artrópodos son especialmente sensibles a los cambios ambientales, al tratarse de organismos ectotermos de pequeño tamaño. En el caso de *O. laevigatus*, las temperaturas más bajas a las que se enfrenta en el invernadero durante los primeros meses del año tiene una incidencia definitiva en su ecología y en su biología reproductiva, de manera que, si bien la temperatura óptima para la cría de este insecto es de 26 °C (Alauzet *et al* 1994), el período de preoviposición, la eclosión de los huevos y el desarrollo juvenil se ralentizan a temperaturas más bajas, al tiempo que la fecundidad, la tasa intrínseca de crecimiento de la población y la tasa de depredación se ven reducidas en estas condiciones (Alauzet *et al* 1994, Tavella *et al* 1996, Cocuzza *et al* 1997a, Tommasini *et al* 2004, Bahşi y Tunç 2008). Como consecuencia, en aquellas temporadas en las que la llegada de las temperaturas templadas se retrasa, el insecto necesita más tiempo para instalarse de forma efectiva en el cultivo, con el consiguiente riesgo de descontrol de las poblaciones de trips. No en vano, todavía hoy se considera al trips una plaga limitante en el cultivo de pimiento bajo cubierta, tanto que el 14% de los agricultores encuestados en 2020 en el sureste de la península declaró haber sufrido un 5% de pérdidas en producción a causa del virus TSWV (van der Blom *et al* 2021). En muchos casos, estas pérdidas están asociadas a una lenta instalación del orius debido a la forma diferente en que responden al estrés térmico el depredador y su presa. Así pues, mientras *O. laevigatus* presenta un umbral mínimo de desarrollo a 11 °C (Sánchez y Lacasa 2002), *F. occidentalis* se mantiene activa hasta los 8 °C (McDonald *et al* 1998), lo que permite el desarrollo de la plaga dentro del invernadero durante el invierno pero no el del depredador.

Asimismo, y teniendo en cuenta que el sistema *O. laevigatus*-*A. swirskii* se encuentra hoy en día perfectamente implementado en el cultivo de pimiento, no podemos olvidar el efecto perturbador del control biológico que puede provocar la depredación intragremial del antocórido sobre el ácaro fitoseido (Ramakers 1993, Chow *et al* 2008, Weintraub *et al* 2011). Varios estudios de laboratorio han indagado acerca de la compatibilidad entre especies de *Orius* y de *Amblyseius* para el control del trips. Algunos estudios apoyan la premisa de la compatibilidad (Wittmann y Leather 1997, Weintraub *et al* 2011), mientras que otros no (Magalhães *et al* 2004, Chow *et al* 2010, Buitenhuis *et al* 2015), apoyados estos últimos en la condición de *O. laevigatus* como depredador superior o depredador intragremial sobre *A. swirskii*, el cual, a su vez, se comporta como depredador intermedio o presa intragremial. Dicha relación viene motivada por el hecho de que este último se encuentra más abajo en la cadena alimenticia, mientras que el primero es el competidor superior de acuerdo a su eficacia más alta cuando comparte con el ácaro al primer o al segundo estadio del trips como presa (Messelink *et al* 2006, Weintraub *et al* 2011). En consecuencia, ante una baja densidad de presas, *A. swirskii* sufre tanto la depredación como la competencia por parte de *O. laevigatus*, mientras que la competencia del fitoseido es el único efecto negativo interespecífico sobre el depredador superior, con el consiguiente perjuicio para la coexistencia y, por tanto, para la eficacia del control biológico (Rosenheim *et al* 1995, Rosenheim 1998, Symondson *et al* 2002, Janssen *et al* 2007).

También es importante tratar la cuestión de la adaptación a determinados cultivos que a priori no le permiten establecerse de forma óptima y por tanto alcanzar un rendimiento adecuado como enemigo natural. Este es el caso del cultivo de tomate, en el cual *F. occidentalis* es también una de las plagas clave, y en el que sin embargo *O. laevigatus* no se instala con éxito. Por un lado, el elevado potencial entomófago de *Orius* se ve mermado debido a que no son capaces de moverse

con rapidez entre los numerosos tricomas o pelos glandulares que presentan las hojas y tallos de la tomatera (Malais y Ravensberg 2003), problema que se acentúa en el caso de las ninfas, que llegan incluso a quedar atrapadas e inmobilizadas. Por otro lado, también en el caso de las ninfas, determinados ensayos realizados con otros hemípteros auxiliares ofrecen resultados concluyentes acerca del efecto negativo que tienen sobre su supervivencia ciertos alcaloides presentes en la tomatera, como la  $\alpha$ -tomatina o el ácido clorogénico, sustancias que, además, se sabe que afectan a la capacidad reproductiva de los adultos (Oliveira *et al* 2002). Tampoco podemos olvidar que el orius, como ya se ha comentado previamente, prefiere plantas cuyas flores generen cantidades suficientes de polen como para permitirles sobrevivir en ausencia de sus presas, lo cual no ocurre con la planta de tomate, lo que también dificulta su instalación y su establecimiento a largo plazo.

Por último, otro reto que resulta fundamental para el establecimiento y la supervivencia de un enemigo natural en un cultivo es la compatibilidad con los tratamientos plaguicidas, ya sean éstos sintéticos o naturales (Bielza 2016). A pesar del aumento de los programas de control biológico, los tratamientos químicos son a menudo necesarios en el cultivo de pimiento para controlar a diversas orugas de lepidópteros noctuidos como *Spodoptera* G. o *Helicoverpa* spp H., así como frente a determinadas plagas secundarias que amenazan con convertirse en recurrentes (*Nezara viridula* L., *Ostrinia nubilalis* H., *Empoasca* W., *Creontiades* D. o algunos pseudocóccidos), o simplemente porque el sistema *O. laevigatus*-*A. swirskii* no siempre es suficiente para mantener a las poblaciones de insectos succionadores (trips, pulgones y moscas blancas) por debajo de los umbrales económicos (Bielza 2021). Pues bien, estas aplicaciones pueden tener efectos letales o subletales (reducción de los parámetros reproductivos y de depredación) sobre los agentes de control biológico liberados en el cultivo, como ocurre en el caso de *O. laevigatus*, comprometiendo el mantenimiento de sus poblaciones y menoscabando el ejercicio del control biológico (Bielza *et al* 2009).

## Hacia una nueva era en el control biológico de plagas: selección y mejora genética de enemigos naturales

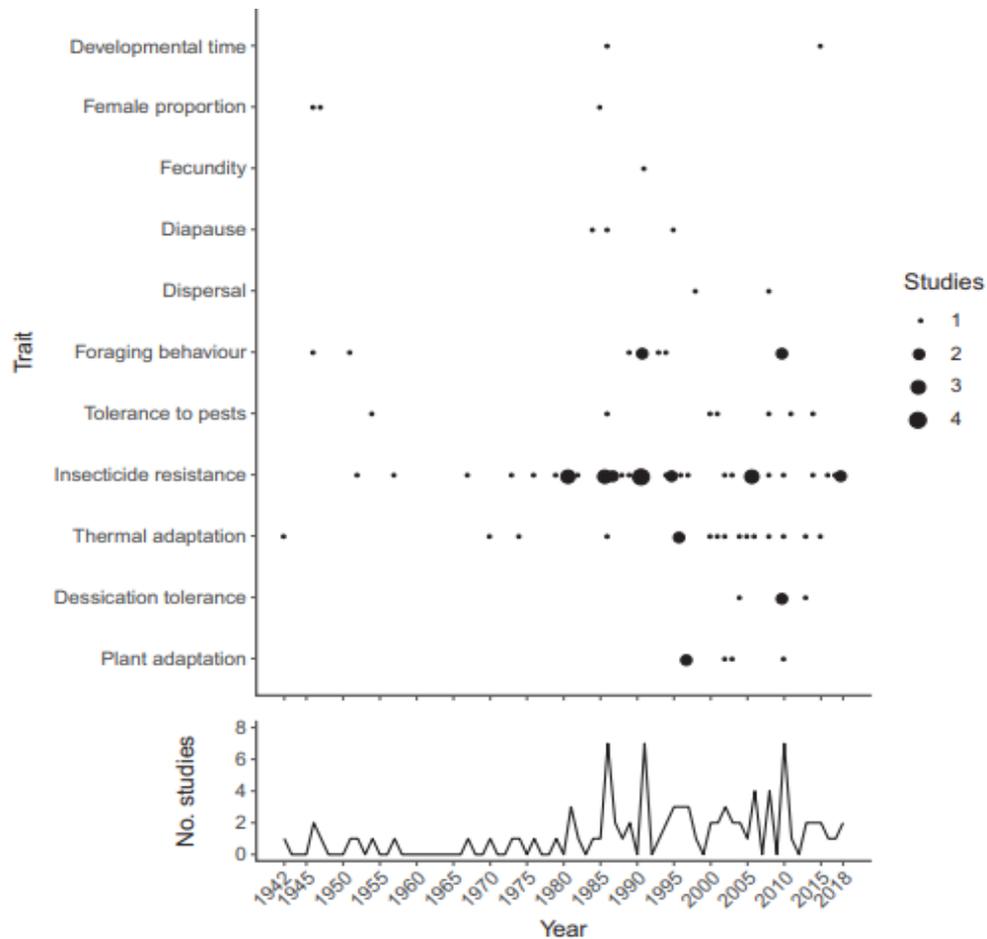
La gestión integrada de plagas (en inglés, IPM) con especial atención en el uso de agentes de control biológico ha tenido un éxito rotundo en muchos cultivos, especialmente en aquellos con producción en invernadero, como es el caso del pimiento del Campo de Cartagena (Calvo *et al* 2012, Bielza 2014). Concretamente, el control biológico aumentativo ha demostrado ser un método eficaz y sólido para el control de plagas, ya sea en su variante inundativa, en la que se liberan depredadores y/o parasitoides para lograr el control directo de las plagas, o inoculativa, con el fin de establecer una población que controle a las plagas a lo largo de sucesivas generaciones. El éxito comentado en el control del trips y la mosca blanca en el pimiento es uno más entre los numerosos casos de éxito que ha reportado el control biológico aumentativo a la agricultura moderna (van Lenteren *et al* 2018). En este contexto, la industria del control biológico se encuentra actualmente perfectamente organizada, dotada de un desarrollo metodológico de cría industrial en masa eficiente y riguroso, así como de una tecnología y logística adecuada para el transporte y el envío de agentes de control biológico, además de unos sistemas de control de calidad bien establecidos. Por otro lado, existe también un importante colectivo de expertos en industria e investigación cuya labor a la hora de orientar a los productores y formar a los técnicos en materia de control biológico ha resultado fundamental. Todos ellos han desarrollado una serie de métodos eficaces para la liberación de los enemigos naturales en los cultivos (van Lenteren 2012), con sus particularidades en función de la especie del cultivo y del agente beneficioso.

No obstante, este sistema es susceptible, como cualquier otro, de ser mejorado significativamente. No en vano, el avanzado nivel tecnológico que exige hoy en día una horticultura competitiva requiere de una constante innovación. Así pues, en el apartado anterior vimos que existen serias limitaciones para el establecimiento y el éxito de los protocolos de control biológico, ya sea bajo determinadas condiciones ambientales (bajas o altas temperaturas, baja humedad relativa, etc.), o bien debido a la adaptación a algunos cultivos (tomate, pepino, ornamentales), a la compatibilidad con los tratamientos fitosanitarios, etc. En estos casos, no siempre es posible disponer de otras especies de enemigos naturales que puedan garantizar un rendimiento superior en esas circunstancias. Es más, el número de nuevas especies de agentes de control biológico disponibles en el mercado ha disminuido ostensiblemente en las últimas décadas (van Lenteren 2012) a causa, entre otras razones, de un aumento en la restricción de la regulación para la importación de enemigos naturales exóticos de acuerdo con el Protocolo de Nagoya, que se encuentra en vigor desde octubre de 2014 (Convention on Biological Diversity [www.cbd.int](http://www.cbd.int)). Éste tiene una incidencia directa en el registro de agentes de control biológico (van Lenteren 2012) y ha contribuido claramente a una tendencia creciente al uso de enemigos naturales autóctonos contra nuevas plagas exóticas.

En este contexto, la mejora de la robustez y la fiabilidad de los agentes de control biológico se ha venido señalando como un elemento fundamental para el progreso del control biológico (Poppy y Powell 2004). Para hacer esto posible, urge disponer de poblaciones mejoradas de enemigos naturales a través de la selección artificial, lo que ayudaría a responder a los desafíos a los que se enfrenta con frecuencia el control biológico (Bielza *et al* 2020). Sin embargo, esta idea de la mejora genética de los agentes de control biológico no es nueva y, de hecho, se han realizado algunos avances en el pasado (Urquijo 1946, Hoy 1986, Hopper *et al* 1993), aunque con una baja o nula ejecución en el campo debido a diversas razones. Una de las principales razones fue que no había desarrollados protocolos de control biológico ni estaba tan extendida su implementación entre los agricultores. En cualquier caso, la selección de organismos en función de una serie de rasgos ventajosos es una práctica que el ser humano ha venido realizando durante siglos. Así, a través de una serie de procesos de cría basados en el cruce de líneas parentales dotadas de los rasgos o atributos deseados en la descendencia, se ha obtenido la diversidad de variedades de cultivos y razas de ganado que hay disponibles hoy en día.

Con respecto a los invertebrados, la cría selectiva parece muy prometedora en tanto que su menor tamaño y su rápido desarrollo permiten acelerar la ganancia genética en el tiempo al hacer posible la sucesión de un elevado número de generaciones en poco tiempo. Con todo, a excepción de los casos del gusano de seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) o la abeja melífera, *Apis* spp L. (Hymenoptera: Apidae), de cuya cría existen informes desde hace siglos (Hoy 1976), únicamente durante el siglo XX hay registrados casos de mejora genética aplicada a agentes de control biológico (Hoy 1986, Lirakis y Magalhães 2019) (Figura 1.12). No en vano, la elección de los atributos clave que se deben seleccionar en ellos para mejorar su eficacia en el control de plagas sigue siendo en la actualidad una cuestión abierta (Wajnberg 2004). Dicha elección requiere de un conocimiento preciso de los rasgos que determinan el rendimiento de los artrópodos como agentes de biocontrol (Wajnberg 2004), y en ese sentido se han propuesto ya distintos caracteres a mejorar (Wainberg 2004, Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018, Leung *et al* 2019, Bielza *et al* 2020). Sin embargo, lo cierto es que la mejora genética de los agentes de control biológico ha dado lugar a pocos avances significativos (Poppy y Powell 2004, Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018). Sin duda, identificar los caracteres apropiados a priorizar sería un paso definitivo para revertir esta situación. Así, se ha sugerido que, para ello, lo ideal es identificar los factores que limitan el rendimiento de los principales agentes de control biológico y, en función de estos retos, elegir las características que permitirían a estas especies superar dichas

limitaciones (Bielza *et al* 2020). Bajo esta premisa, la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha se han centrado en rasgos como el tiempo de desarrollo, el ratio sexual, la fecundidad, la diapausa reproductiva, el comportamiento alimenticio, la resistencia a insecticidas o la tolerancia a un cultivo determinado o a temperaturas extremas, entre otros (Figura 1.13), predominando los estudios realizados con himenópteros, ácaros y nematodos (Lirakis y Magalhães 2019).



**Figura 1.13.** Mejora genética de enemigos naturales. Número de estudios que tratan un rasgo concreto sujeto a evolución experimental o selección artificial en agentes de control biológico a lo largo del tiempo, por rasgo (panel superior) y para todos los estudios combinados (panel inferior). Únicamente se han tenido en cuenta los estudios que describen el proceso de selección (Lirakis y Magalhães 2019).

En la actualidad, las condiciones son idóneas para un avance significativo en esta línea. Por un lado, los sistemas de gestión integrada de plagas que existen hoy en día están dotados de protocolos de control biológico muy bien establecidos y, por otro, existe una infraestructura de suministro de enemigos naturales de alta calidad, con una elevada implantación entre los agricultores y en cultivos de alto valor añadido. Además, se practica fundamentalmente el control biológico aumentativo, que es el óptimo para aplicar la mejora de enemigos naturales (Bielza *et al* 2020). La selección de líneas más adaptadas a los entornos agrícolas o a condiciones ambientales fuera de su rango medio de distribución natural, podría conseguir el éxito de especies de agentes de control biológico que hoy en día no son suficientemente eficaces. Igualmente, las especies ya

implementadas con éxito pueden seleccionarse para mejorar determinados rasgos que eleven su rendimiento (mayor fecundidad, longevidad) o que les permitan adaptarse a ciertos agrosistemas en los que aún no se han podido implantar (cultivos como tomate, plantas sin polen, uso de plaguicidas sobre plagas secundarias).

## Planteamiento y objetivos de tesis

El grupo de Protección de Cultivos de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA - UPCT), del cual forma parte el autor de esta tesis doctoral, lleva casi una década desarrollando una serie de líneas de investigación basadas en la mejora genética de *O. laevigatus* con el fin de obtener una mayor eficacia en la lucha biológica de estos insectos contra el trips *F. occidentalis*, al permitir al depredador sortear las dificultades a las que se enfrenta una vez es liberado en el cultivo. La base de estos programas de mejora consiste en explorar la variabilidad natural que existe entre los individuos y poblaciones de este enemigo natural (variabilidad intraespecífica) para una serie de características biológicas y ecológicas de interés agronómico, explotándola a través de un exhaustivo programa de selección que se detalla a lo largo de los primeros capítulos de esta tesis.

Las poblaciones de enemigos naturales que se reproducen actualmente en las biofábricas para su uso en programas de control biológico aumentativo no difieren significativamente entre los distintos proveedores, ya que se introducen individuos silvestres de forma regular en el sistema de cría masiva para evitar la consanguinidad y la deriva genética. Estos caracteres que se pretenden mejorar, tanto en el caso de *O. laevigatus* como en el resto de los agentes de control biológico criados en biofábricas y liberados en el campo, no se desvían de los valores medios propios de la especie, puesto que son el resultado de la selección natural a lo largo de la evolución para su rendimiento óptimo en su ambiente natural (Bielza *et al* 2020). Es decir, el modo en que los enemigos naturales se desenvuelven en el sistema tritrófico que conforman con plantas y fitófagos es el resultado de un largo y complejo proceso de coevolución que les ha permitido adaptarse a sus ambientes naturales específicos, los cuales varían en función del clima, el nicho ecológico, la planta, su presa u hospedante, etc. (Roderick *et al* 2012). Sin embargo, las condiciones en las que estos agentes de control biológico deben ejercer su acción beneficiosa (cultivos, invernaderos) suelen ser muy diferentes a las naturales. En consecuencia, los caracteres óptimos para su rendimiento en los distintos agrosistemas pueden ser muy distintos a los resultantes de la selección natural, por lo que son susceptibles de ser optimizados mediante la selección artificial aprovechando la variación intraespecífica. De esta forma, la mejora de una cierta población, ya sea mediante su manipulación genética o por métodos clásicos en el laboratorio, podría dar lugar a adaptaciones que rara vez se presentarían en campo (Bielza *et al* 2020). En definitiva, es posible acelerar significativamente el desarrollo de adaptaciones deseables mediante su selección en el laboratorio.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la mejora genética de enemigos naturales se presenta como una posibilidad real de progreso en el control biológico mediante *O. laevigatus*, dando respuesta a los retos planteados en el apartado anterior de esta tesis. Bajo esta premisa, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado con éxito una serie de razas de este depredador resistentes a algunos insecticidas que resultan fundamentales para la sostenibilidad de la gestión integrada de plagas: piretrinas y piretroides (Balanza *et al* 2021), neonicotinoides (Balanza *et al* 2019) o spinosad (Balanza *et al* 2021), entre otros. Esta tesis doctoral, por su parte, aborda otros retos de gran importancia en el manejo de este depredador, igualmente detallados en el apartado anterior y siempre desde el punto de vista de la mejora genética.

## Objetivos de tesis

En los capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral se plantean dos programas de mejora genética orientados a conseguir sendas razas con un rendimiento más alto en determinadas condiciones óptimas y subóptimas de alimentación y, por tanto, dirigidos hacia una especialización trófica diferencial. Así pues, en el **Capítulo 2** se lleva a cabo un primer programa de selección con el objetivo de alcanzar un rendimiento más elevado en condiciones nutricionales óptimas (mediante huevos de *Ephestia*) a través de la obtención de una raza con un tamaño corporal en el adulto significativamente más grande. En el **Capítulo 3**, por el contrario, el objetivo es obtener una serie de líneas genéticas con una tolerancia sustancialmente superior cuando se les alimenta con una dieta subóptima como es la basada exclusivamente en polen, y por tanto, con una dependencia menor de su presa.

No obstante, ciertos estudios recientes destacan la importancia de seguir determinados pasos antes de emprender un programa de cría selectiva con un agente de control biológico, prestando especial atención a los factores que puedan haber contribuido al fracaso de esfuerzos de selección anteriores (Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018, Lirakis y Magalhaes 2019, Bielza *et al* 2020). Así pues, en ambos capítulos se aborda el proceso de mejora con base en una amplia variabilidad genética para este insecto, ya sea en cuanto al tamaño del macho y de la hembra y en lo que respecta a la respuesta reproductiva de esta especie en ambas situaciones de alimentación. Resulta imprescindible, por tanto, abastecerse con una serie de poblaciones de *O. laevigatus* representativas de distintas zonas, mantenerlas en condiciones de laboratorio y conseguir tal nivel de multiplicación que nos permita disponer de un número suficiente de individuos para realizar los bioensayos. Por otro lado, en ambos procesos de mejora se ha realizado un seguimiento de la ganancia genética adquirida en el curso de los distintos pasos de selección realizados, evaluando asimismo la complejidad metodológica en cuanto a disponibilidad de tiempo y recursos, y variando el procedimiento de selección cuando se consideró necesario con el fin de acelerar la conquista de una ganancia genética significativa. Finalmente, una vez obtenidas las poblaciones seleccionadas, se evalúa en ambos capítulos el coste ecológico potencial que el proceso de mejora pueda llevar aparejado mediante la caracterización bioecológica de estas líneas genéticas en comparación con una serie de poblaciones comerciales y silvestres sin seleccionar. Para ello, se incluyen en los capítulos mencionados una serie de experimentos para evaluar la extensión de la mejora obtenida en cuanto a supervivencia, longevidad y capacidad reproductiva en condiciones óptimas y de hambre de presas.

Los siguientes tres capítulos versan sobre el desempeño de nuestras poblaciones mejoradas de *O. laevigatus* en condiciones más parecidas a las que se van a encontrar en el agroecosistema, determinando de nuevo el posible coste ecológico en este sentido que pueda haber ido asociado al proceso de selección.

Así, en el **Capítulo 4** se incluyen los resultados de una serie de ensayos en los que se determina la respuesta funcional de la población seleccionada para un tamaño superior en base a su tasa de depredación sobre las presas más óptimas de *O. laevigatus*, esto es, sobre larvas y adultos del trips *F. occidentalis*, y sobre ninfas del pulgón del melocotonero, *M. persicae*, en comparación con una población comercial de este agente de control biológico. En el **Capítulo 5** se repiten estos ensayos para una de las líneas seleccionadas con una mayor tolerancia a la alimentación sin presa y, del mismo modo que en el Capítulo 4, se discuten las posibles aplicaciones agronómicas de estas nuevas soluciones biológicas.

El **Capítulo 6**, por su parte, aborda la cuestión de la depredación intragremial de *O. laevigatus* sobre el ácaro fitoseído *A. swirskii*, de manera que se evalúa la mejora potencial que los citados

procesos de selección hayan podido conllevar en cuanto a la coexistencia entre ambos enemigos naturales, así como la importancia de la alternancia de presas o la tolerancia a una alimentación alternativa en el éxito de dicha coexistencia. Para ello, se incluyen en este capítulo los resultados de dos grupos de experimentos. Por un lado, se estudió la tasa de depredación sobre el ácaro fitoseido en nuestras líneas seleccionadas en comparación con una población comercial. Y por otro, se sometió a las hembras de estas tres poblaciones a un ensayo de elección entre el adulto del trips y el ácaro fitoseido, situados ambos, *a priori*, a un nivel similar en cuanto a preferencia por parte del depredador.

Finalmente, el **Capítulo 7** incluye una breve discusión de los resultados obtenidos a partir de estos procesos de mejora, así como de las perspectivas que se plantean para el futuro en cuanto a nuevas líneas de investigación, finalizando con las conclusiones más importantes que se extraen de esta tesis doctoral.

## Thesis outline and objectives

The Crop Protection group at the Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA - UPCT), of which the author of this doctoral thesis is a member, has been developing for almost a decade a series of research lines based on the genetic improvement of *O. laevigatus* with the aim of obtaining greater efficiency in the biological control against *F. occidentalis*, enabling the predator to overcome the difficulties it has to cope with once it is released in the crop. The basis of these breeding programmes consists of exploring the natural variability existing among individuals and populations of this natural enemy (intraspecific variability) for a series of biological and ecological features of agronomic interest, exploiting it through an exhaustive selection programme that is detailed throughout the first chapters of this thesis.

The populations of natural enemies currently reproduced in biofactories for use in augmentative biological control programmes do not differ significantly between suppliers, as wild individuals are regularly introduced into the mass rearing system to avoid inbreeding and genetic drift. These target traits, both in the case of *O. laevigatus* and the other biological control agents reared in biofactories and released in the field, do not deviate from the species' average values, as they are the result of natural selection over the course of evolution for optimal performance in their natural environment (Bielza *et al* 2020). Namely, the way natural enemies perform in the tritrophic system they form with plants and pests is the result of a long and complex process of co-evolution in which they have adapted to their specific natural environments, which fluctuate according to climate, ecological niche, the plant, their prey or host, etc. (Roderick *et al* 2012). However, the conditions under which these biological control agents must do their beneficial work (crops, greenhouses) are often very different from the natural ones. Consequently, the optimal traits for their performance in different agrosystems may be very different from those resulting from natural selection, and are therefore likely to be further optimised by artificial selection through the exploitation of intraspecific variation. In this way, the improvement of a certain population, either by genetic manipulation or classical in-lab methods, could lead to adaptations that would rarely occur in the field (Bielza *et al* 2020). In other words, it is possible to substantially accelerate the development of desirable adaptations through selection in the laboratory.

Considering all the above, the genetic improvement of natural enemies is presented as a real possibility of progress in biological control by *O. laevigatus*, responding to the challenges outlined in the previous sections of this thesis. Under this premise, our working group has successfully developed a series of strains of this predator resistant to some insecticides that are essential for the sustainability of integrated pest management: pyrethrins and pyrethroids (Balanza *et al* 2021),

neonicotinoids (Balanza *et al* 2019) or spinosad (Balanza *et al* 2021), among others. This doctoral thesis, on the other hand, addresses other major concerns in the management of this predator, also detailed in the previous sections and still from the point of view of genetic improvement.

### Thesis objectives

Chapters 2 and 3 in this PhD thesis propose two breeding programmes aimed at obtaining strains with higher performance under certain optimal and sub-optimal feeding conditions. So, **Chapter 2** set out a first selection programme carried out to achieve a greater efficiency under optimal dietary conditions (on *Ephestia* eggs) by obtaining an *O. laevigatus* genetic line with a significantly larger body size. **Chapter 3**, by contrast, focuses on obtaining a series of genetic lines with a significantly higher tolerance when fed a suboptimal diet such as that based exclusively on pollen, and therefore a significantly lower dependence on their prey.

Nevertheless, recent studies highlight the importance of following certain steps before launching a selective breeding programme for a biological control agent, with a particular focus on factors that may have contributed to the failure of previous selection efforts (Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018, Lirakis and Magalhaes 2019, Bielza *et al* 2020). Therefore, these two chapters address the breeding process based on a wide genetic variability for this insect, either in terms of male and female size and regarding the reproductive behaviour of this species in both foraging situations. It is therefore essential to obtain a stock of *O. laevigatus* populations representative of different areas, maintaining them under laboratory conditions and achieving a successful multiplication to provide us with a sufficient number of individuals to carry out the bioassays. On the other hand, in both breeding processes, the genetic gain acquired in the course of the different selection steps must be monitored, assessing the methodological aspects in terms of availability of time and resources, and varying the selection procedure when necessary in order to accelerate the acquisition of a substantial genetic gain. Finally, once the selected populations have been successfully obtained, the potential fitness cost of the breeding process is evaluated in both chapters through the biological characterization of these genetic lines in comparison with a series of lab, commercial and wild unselected populations used as reference. To this end, both chapters include a set of assays to estimate the extent of the enhancement attained in terms of survival, longevity and reproductive fitness under both favorable and prey scarcity conditions.

The following three chapters concern with the performance of our enhanced predators under closer conditions to those potentially found in the agroecosystem, again determining the potential trade-offs in this regard which may have been associated with our selection processes.

Then, **Chapter 4** includes the results of a series of trials assessing the functional response of the selected strain with a larger size in terms of predation rate on the most optimal *O. laevigatus*' prey: larvae and adults of the western flower thrips, *F. occidentalis*, and the peach aphid, *M. persicae*, in comparison with a commercial population of this biological control agent. **Chapter 5** reproduces these trials for one of the selected lines with a higher tolerance to non-prey feeding and, similarly to Chapter 4, discusses the potential agronomic applications of these new biological solutions.

**Chapter 6**, on the other hand, approaches the issue of *O. laevigatus* intraguild predation on the phytoseiid mite *A. swirskii*, by evaluating the potential improvement that such selection processes may have brought about in terms of coexistence between the two natural enemies, as well as the importance of prey switching or tolerance to alternative feeding in the success of this coexistence. For this purpose, the results of two sets of experiments are included in this chapter. Firstly, the predation rate on the phytoseiid predator in our selected populations is studied in comparison with a commercial population. Secondly, the females of these populations are subjected to a choice test

between adult thrips and phytoseiid mites, both theoretically at a similar level in terms of preference by the predator.

Finally, **Chapter 7** is a brief discussion of the results of these breeding processes and future prospects for new research topics, with special attention to the most important conclusions to be drawn from this dissertation.

## Referencias

- Alauzet C, Dargagnon D, Malausa JC. 1994. Bionomics of a polyphagous predator: *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga* 39: 33-40. <https://doi.org/10.1007/BF02373492>.
- Alvarado P, Baltà O, Alomar O. 1997. Efficiency of four heteroptera as predators of *Aphis gossypii* and *Macrosiphon euphorbiae* (Hom.: Aphididae). *Entomophaga* 42: 21-226. <https://doi.org/10.1007/BF02769899>.
- Arijs Y, de Clercq P. 2001. Rearing *Orius laevigatus* on cysts of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biol Control* 21: 79-83. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0910>.
- Arnó J, Roig J, Riudavest J. 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *Orius laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their preference. *Biological Control* 44: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.009>.
- Bahşi SU, Tunç I. 2008. Development, survival and reproduction of *Orius niger* (Hemiptera: Anthocoridae) under different photoperiod and temperature regimes. *Biocontrol Sci Techn* 18: 767-778. <https://doi.org/10.1080/09583150802302215>.
- Balanza V, Mendoza JE, Cifuentes D, Bielza P. 2021. Genetic improvement of spinosad resistance in the biocontrol agent *Orius laevigatus*. *BioControl* (in press).
- Balanza V, Mendoza JE, Bielza P. 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomol Experim Appl* 167 (7): 626-635. <https://doi.org/10.1111/eea.12813>.
- Balanza V, Mendoza JE, Cifuentes D, Bielza P. 2021. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Manag Sci* 77: 2539-2546. <https://doi.org/10.1002/ps.6288>.
- Balsas P. 1989. *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Reciente plaga de los cultivos hortícolas del Campo de Cartagena: Delimitación de daños y ensayos de control. (Trabajo Final de Carrera). EUITA, Orihuela (Alicante) Universidad Politécnica de Valencia, 231 pp.
- Belda JE, Calvo J. 2006. Eficacia de *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) en el control biológico de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom.: Aleyrodidae) y *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thys.: Thripidae) en pimiento en condiciones de semicampo. *Bol Sanid Veg Plagas* 32: 283-296.
- Benson CL, Labbe RM. 2021. Exploring the role of supplemental foods for improved greenhouse biological control. *Ann Entomol Soc Am* 20 (20): saab005. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab005>.
- Bielza P. 2014. Un nuevo paso en el control biológico: mejora genética de enemigos naturales. *Phytoma* 262: 26.

- Bielza P. 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz AR, Ishaaya I (eds), *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-339. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4_16).
- Bielza. 2021. Mejores bichos para el control biológico: razas de *Orius laevigatus* más eficaces. *Phytoma-España* 327: 67-70.
- Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>.
- Bielza P, Fernández E, Grávalos C, Izquierdo J. 2009. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl* 54: 229-236. <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9162-0>.
- Bielza P, Quinto V, Contreras J, Torné M, Martín A, Espinosa PJ. 2007a. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of southeastern Spain. *Pest Manag Sci* 63: 682-687. <https://doi.org/10.1002/ps.1388>.
- Bielza P, Quinto V, Fernández E, Grávalos C, Contreras J. 2007b. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 100: 916-920. <https://doi.org/10.1093/jee/100.3.916>.
- Biondi A, Zappalà L, di Mauro A, Garzia GT, Russo A, Desneux N, Siscaro G. 2016. Can alternative host plant and prey affect phytophagy and biological control by the zoophytophagous mirid *Nesidiocoris tenuis*? *Biocontrol* 61: 79-90. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9700-5>.
- Blaeser P, Sengonca C, Zegula T. 2004. The potential use of different predatory bug species in the biological control of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *J Pest Sci* 77: 211-219. <https://doi.org/10.1007/s10340-004-0057-2>.
- Bolckmans K, van Houten Y, Hoogerbrugge H. 2005. Biological control of whiteflies and western flower thrips in greenhouse sweet peppers with the phytoseiid predatory mite *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). En: *Proceedings 2nd International Symposium on Biological Control of Arthropods*, pp 555-565.
- Bonte M, de Clercq P. 2008. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J Econ Entomol* 101: 1127-1133. <https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1127>.
- Bosco L, Giacometto E, Tavella L. 2008. Colonization and predation of thrips (Thysanoptera: Thripidae) by *Orius* spp. (Heteroptera: Anthocoridae) in sweet pepper greenhouses in Northwest Italy. *Biol Control* 44: 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.027>.
- Bouagga S, Urbaneja A, Rambla JL, Granell A, Pérez-Hedo M. 2017. *Orius laevigatus* strengthens its role as a biological control agent by inducing plant defenses. *J Pest Sci* 91: 55-64. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0886-4>.
- Brenard N, Sluydts V, Christianen E, Bosmans L, de Bruyn L, Moerkens R, Leirs H. 2019. Biweekly supplementation with *Artemia* spp. cysts allows efficient population establishment by *Macrolophus pygmaeus* in sweet pepper. *Entomol Exp Appl* 167: 406-414. <https://doi.org/10.1111/eea.12776>.

- Buitenhuis R, Murphy G, Shipp L, Scott-Dupree C. 2015. *Amblyseius swirskii* in greenhouse production systems: a floriculture perspective. *Exp Appl Acarol* 65: 451-464. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9869-9>.
- Calvo FJ, Knapp M, van Houten Y, Hoogerbrugge H, Belda J. 2015. *Amblyseius swirskii*: what made this predatory mite such a successful biocontrol agent? *Exp Appl Acarol* 65: 419-433. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9873-0>.
- Calvo FJ, Lorente MJ, Stansly PA, Belda JE. 2012. Preplant release of *Nesidiocoris tenuis* and supplementary tactics for control of *Tuta absoluta* and *Bemisia tabaci* in greenhouse tomato. *Entomol Exp Appl* 143: 111-119. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01238.x>.
- CARM. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. 2020. Agricultura. [http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=488&IDTIPO=140&RASTRO=c80\\$m](http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=488&IDTIPO=140&RASTRO=c80$m). Consultado en abril de 2021.
- Chambers RJ, Long S, Helyer NL. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hem.: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the UK. *Biocontrol Sci Technol* 3: 295-307. <https://doi.org/10.1080/09583159309355284>.
- Chow A, Chau A, Heinz KM. 2008. Compatibility of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) with *Amblyseius (Iphiseius) degenerans* (Acari: Phytoseiidae) for control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse roses. *Biol Control* 44: 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.11.002>.
- Chow A, Chau A, Heinz KM. 2010. Compatibility of *Amblyseius (Typhlodromips) swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) and *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on roses. *Biol Control* 53 (2): 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.12.008>.
- Cocuzza GE, de Clercq P, Lizzo S, van de Veire M, Tirry L, Degheele D, Vacante V. 1997a. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and at three constant temperatures. *Entomol Exp Appl* 85: 189-198. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00249.x>.
- Cocuzza GE, de Clercq P, van de Veire M, de Cock A, Degheele D, Vacante V. 1997b. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephesia kuehniella* eggs. *Entomol Exp Appl* 82: 101-104. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00118.x>.
- Contreras J, Lacasa A, Sánchez JA, Lorca M. 1999. Periodo de máximos incrementos poblacionales de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) en el cultivo de pimiento en invernadero de la Región de Murcia. *Actas de Horticultura* 26: 301-307.
- Cuadrado IM, de Juan E, Moreno P, Sáez E. 1989. Detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en cultivos de pimiento y tomate bajo invernadero en el poniente almeriense. *V Congreso Nacional de Fitopatología, Badajoz* 3: 29.
- Elimem M, Harbi A, Limem-Sellemi E, Othmen SB, Chermiti B. 2018. *Orius laevigatus* (Insecta; Heteroptera) local strain, a promising agent in biological control of *Frankliniella occidentalis* (Insecta; Thysanoptera) in protected pepper crops in Tunisia. *Euro-Mediterr J Environ Integr* 5: 3-6. <https://doi.org/10.1007/s41207-017-0040-y>.

- Espinosa PJ, Bielza P, Contreras J, Lacasa A. 2002a. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manag Sci* 58: 920-927. <https://doi.org/10.1002/ps.573>.
- Espinosa PJ, Bielza P, Contreras J, Lacasa A. 2002b. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Manag Sci* 58: 967-971. <https://doi.org/10.1002/ps.572>.
- Espinosa PJ, Contreras J, Quinto V, Grávalos C, Fernández E, Bielza P. 2005. Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag Sci* 61: 1009-1015. <https://doi.org/10.1002/ps.1069>.
- Eubanks MD, Denno RF. 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* 25: 1-7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00243.x>.
- Fauna Europaea 2020. Distribución geográfica de *O. laevigatus* en Europa. // [https://fauna-eu.org/cdm\\_dataportal/taxon/ec28a756-2fb4-448a-8bbd-7f3627709263](https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/ec28a756-2fb4-448a-8bbd-7f3627709263). Consultado en abril de 2021.
- Fernández E, Grávalos C, Haro PJ, Cifuentes D, Bielza P. 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in south-eastern Spain. *Pest Manag Sci* 65: 885-891. <https://doi.org/10.1002/ps.1769>
- Ferragut F, González-Zamora JE. 1994. Diagnóstico y distribución de las especies de *Orius* Wolf 1811, peninsulares (Heteróptera: Anthocoridae). *Bol Sanid Veg Plagas* 20: 89-101.
- Frutas y Hortalizas. 2014. Anuario Hortícola 2014. Frutas y Hortalizas, Almería.
- Glass R. 2012. Biological control in the greenhouses of Almeria and challenges for a sustainable intensive production. *Outlooks Pest Manag* 2012: 276-278. <https://doi.org/10.1564/23dec11>.
- Grenier S, de Clercq P. 2003. Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. En: van Lenteren JC (ed), *Quality control and the production of biological control agents: theory and testing procedures*. CAB International, Cambridge, USA, 115-131. <https://doi.org/10.1079/9780851996882.0115>.
- Hansen EA, Funderburk JE, Reitz SR, Ramachandran S, Eger JE, Mcauslane H. 2003. Within-plant distribution of *Frankliniella* species (Thysanoptera: Thripidae) and *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) in field pepper. *Environ Entomol* 32: 1035-1044. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1035>.
- Hoogerbrugge H, Calvo J, van Houten Y, Bolckmans K. 2005. Biological control of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* with the predatory mite *Amblyseius swirskii* in sweet pepper crops. *IOBC WPRS Bull* 28 (1): 119-122.
- Hopper KR, Roush RT, Powell W. 1993. Management of genetics of biological-control introductions. *Ann Rev Entomol* 38 (1): 27-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.000331>.
- Hoy MA. 1976. Genetic improvement of insects: fact or fantasy. *Environ Entomol* 5: 833-839. <https://doi.org/10.1093/ee/5.5.833>.

Hoy MA. 1986. Use of genetic improvement in biological control. *Agric Ecosyst Environ* 15: 109-119. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(86\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0167-8809(86)90084-8).

Janssen A, Sabelis MW, Magalhães S, Montserrat M, van der Hammen T. 2007. Habitat structure affects intraguild predation. *Ecology* 88: 2713-2719. <https://doi.org/10.1890/06-1408.1>.

Jordá C, Lacasa A, Costa J, Díez MJ, Nuez F. 1993. El virus del bronceado del tomate, TSWV. *Horticultura* 6: 39-42.

Krautter M. 2007. Essen ohne Pestizide. Greenpeace, Hamburg.

Kruitwagen A, Beukeboom LW, Wertheim B. 2018. Optimization of native biocontrol agents, with parasitoids of the invasive pest *Drosophila suzukii* as an example. *Evol Appl* 11: 1473-1497. <https://doi.org/10.1111/eva.12648>.

Lacasa A. 2021. Factores que motivaron el desarrollo del control biológico en el cultivo de pimiento en invernadero de la Región de Murcia. *Phytoma-España* 327: 15-22.

Lacasa A, Llorens JM. 1998. Trips y su control biológico (II). Ed. Pisa ediciones, Alicante, pp. 311.

Lacasa A, Martínez MC, Torres J. 1988. Una amenaza para los cultivos de la Región de Murcia: El trips *Frankliniella occidentalis*. *La Verdad*. 29 de mayo.

Lacasa A, Sánchez JA. 2002. El estado actual del control integrado de los tisanópteros en cultivos de invernadero. La situación del pimiento. *Phytoma-España* 135: 101-105.

Lacasa A, Torres J, Martínez MC. 1991. La implicación de *Frankliniella occidentalis* en la diseminación del virus del bronceado del tomate (TSWV) en los cultivos murcianos. *Agrícola Vergel* 112: 203-209.

Leman A, Messelink GJ. 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experim Appli Acar* 65: 511-524. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9859-y>.

Leon-Beck M, Coll M. 2009. The mating system of the flower bug *Orius laevigatus*. *Biol Control* 50: 199-203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.016>.

Leung K, Ras E, Ferguson K, Ariëns S, Babendreier D, Bijma P, Bourtzis K, Brodeur J, Bruins M, Centurión A, Chattington S, Chinchilla-Ramírez M, Dicke M, Fatouros N, González Cabrera J, Groot T, Haye T, Knapp M, Koskinioti P, Le Hesran S, Lirakis M, Paspatis A, Pérez-Hedo M, Plouvier W, Schlotterer C, Stahl J, Thiel A, Urbaneja A, van de Zande L, Verhulst E, Vet L, Visser S, Werren J, Xia S, Zwaan B, Magalhães S, Beukeboom L, Pannebakker B. 2020. Next-generation biological control: the need for integrating genetics and genomics. *Biol Rev* 95: 1838-1854. <https://doi.org/10.1111/brv.12641>.

Lirakis M, Magalhães S. 2019. Does experimental evolution produce better biological control agents? A critical review of the evidence. *Entomol Exp Appl* 167: 584-597. <https://doi.org/10.1111/eea.12815>.

Lommen ST, Jong PW, Pannebakker BA. 2017. It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control-a review. *Entomol Exp Appl* 162 (2): 108-123. <https://doi.org/10.1111/eea.12510>.

- Lundgren JG, Fergen JK, Riedell WE. 2008. The influence of plant anatomy on oviposition and reproductive success of the omnivorous bug *Orius insidiosus*. *Anim Behav* 75: 1495-1502.
- Magalhães S, Tudorache C, Montserrat M, van Maanen R, Sabelis MW, Janssen A. 2004. Diet of intraguild predators affects antipredator behavior in intraguild prey. *Behav Ecol* 16: 364-370.
- Malais MH, Ravensberg WJ. 2003. Knowing and recognizing: the biology of glasshouse pests and their natural enemies. Koppert Biological Systems.
- MARM. 2010. Registro Oficial de Productos de control de plagas: Otras herramientas, Organismos de Control Biológico (OCB). Disponible online: <http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroOCB.pdf> (consultado el 20 de abril de 2021).
- McDonald JR, Bale JS, Walters KF. 1998. Effect of temperature on development of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Eur J Entomol* 95: 301-306.
- Messelink GJ, Bennison J, Alomar O, Ingegno BL, Tavella L, Shipp L, Palevsky E, Wäckers FL. 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *Biocontrol* 59: 377-393. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9579-6>.
- Messelink GJ, Bloemhard CMJ, Kok L, Janssen A. 2011. Generalist predatory bugs control aphids in sweet pepper. *IOBC/WPRS Bull* 68: 115-118.
- Messelink G, van Steenpaal SEF, Ramakers PMJ. 2006. Evaluation of phytoseiid predators for control of western flowers thrips on greenhouse cucumber. *BioControl* 51: 753-768. <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9013-9>.
- Montserrat M, Albajes R, Castañe C. 2000. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environ Entomol* 29 (5): 1075-1082. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.5.1075>.
- Nomikou N, Janssen A, Schraag R, Sabelis MW. 2001. Phytoseiid predators as potential biological control agents for *Bemisia tabaci*. *Exp Appl Acarol* 25: 271-291. <https://doi.org/10.1023/A:1017976725685>.
- Oliveira JEM, Torres JB, Carrano-Moreira AF, Barros R. 2002. Effect of cotton and tomato plants as complementary food on development and reproduction of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 31 (1): 101-108.
- Oveja MF, Riudavets J, Arnó J, Gabarra R. 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *Biocontrol* 61: 47-56. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9690-3>.
- Péricart J. 1972. Hémiptères Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest Paléarctique. Faune de Europe et du Bassin Méditerranéen, Paris.
- Poppy GM, Powell W. 2004. Genetic manipulation of natural enemies: can we improve biological control by manipulating the parasitoid and/or the plant? En: Ehler LE, Sforza R, Mateille T (eds), *Genetics, Evolution and Biological Control*. CABI, Wallingford, pp. 219-234.
- Ramakers PMJ. 1990. Manipulation of phytoseiid thrips predators in the absence of thrips. *IOBC/WPRS Bull* 13 (5): 169-172.

- Ramakers PMJ. 1993. Coexistence of two thrips predators, the anthocorid *Orius insidiosus* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* on sweet pepper. IOBC/WPRS Bull 16: 133-136.
- Riudavets J, Castañe C. 1994. Abundance and host plant preferences for oviposition of *Orius* spp. (Heteroptera: Anthocoridae) along the mediterranean coast of Spain. Bull IOBC/WPRS 17 (5): 230-237.
- Roderick GK, Hufbauer R, Navajas M. 2012. Evolution and biological control. Evol Appl 5: 419-423.
- Rosenheim JA. 1998. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. Annu Rev Entomol 43: 421-447. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.421>.
- Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ, Jaffee BA. 1995. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. Biol Control 5: 303-335. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1038>.
- Sánchez JA. 2021. Contribución de la investigación al desarrollo del control biológico en pimiento en el sureste de España. Phytoma-España 327: 23-27.
- Sánchez JA, Alcázar A, Lacasa A, Llamas A, Bielza P. 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. IOBC/WPRS Bull 23: 21-30.
- Sánchez JA, Contreras J, Lacasa A, Lorca M. 1995. Datos preliminares sobre la utilización de *Orius laevigatus* (Fieber) en el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) en pimiento de invernadero en invernadero. Phytoma-España 65: 32-38.
- Sánchez JA, García F, Lacasa A, Gutiérrez L, Oncina M, Contreras J, Gómez J. 1997. Response of the anthocorids *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* for the control of *Frankliniella occidentalis* in commercial crops of sweet pepper in plastic houses in Murcia (Spain). Bull OILB/SROP 20 (4): 177-185.
- Sánchez JA, Lacasa A. 2002. Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Bull Entomol Res 92 (1): 77-88. <https://doi.org/10.1079/ber2001136>.
- Sánchez JA, Lacasa A. 2006. A biological pest control story. IOBC/WPRS Bull 29: 17-22.
- Schuldiner-Harpaz T, Coll M. 2012. Identification of *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) females based on egg operculum structure. J Econ Entomol 105: 1520-1523. <https://doi.org/10.1603/EC12068>.
- Sengonça C, Ahmadi K, Blaeser P. 2008. Biological characteristics of *Orius similis* Zheng (Heteroptera: Anthocoridae) by feeding on different aphid species as prey. J Plant Dis Prot 115: 32-38. <https://doi.org/10.1007/BF03356236>.
- Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? Ann Rev Entomol 47: 561-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>.
- Tavella L, Alma A, Conti A, Arzone A. 1996. Evaluation of *Orius* spp. in controlling *Frankliniella occidentalis*. Acta Horticulturæ 431: 499-506.

- Tawfik MFS, Atta AM. 1973. The life-history of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Bull Soc Entomol Egypte 57: 117-126.
- Tommasini MG, Maini S. 2001. Thrips control on protected sweet pepper crops: enhancement by means of *Orius laevigatus* releases. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera, Italy, 249-256.
- Tommasini MG, Nicoli G. 1993. Adult activity of four *Orius* species reared on two preys, integrated control in glasshouses. IOBC WPRS Bull 16: 181-184.
- Tommasini MG, van Lenteren JC. 2003. Occurrence of diapause on *Orius laevigatus*. Bull Insectol 56: 225-251
- Tommasini MG, van Lenteren JC, Burgio G. 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. Bull Insectol 57: 79-93.
- Urbaneja A, Arán E, León P, Gallego A. 2003. Efecto combinado de altas temperaturas y de humedades en la supervivencia, fecundidad y fertilidad de *Orius laevigatus* y *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae). Bol San Veg Plagas 29: 27-34.
- Urquijo P. 1946. Sobre las diferentes estirpes de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis. y su distinta resistencia al cobre. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola. 24: 315-320.
- Van der Blom J. 2008. Control biológico en pimiento bajo abrigo. En: Jacas J, Urbaneja A (eds), Control biológico de plagas agrícolas, Phytoma-España, Valencia, 399-409.
- Van der Blom J, Crisol E, García-Martínez R. 2021. Control biológico en pimiento: primer paso hacia la sostenibilidad fitosanitaria en horticultura bajo cubierta. Phytoma-España 327: 28-31.
- Van der Blom J, Ramos M, Ravensberg W. 1997. Biological pest control in sweet pepper in Spain: Introduction rates of predators of *Frankliniella occidentalis*. IOBC WPRS Bull 20: 196-202.
- Van der Blom J, Robledo A, Torres S, Sánchez JA. 2008. Control biológico de plagas en Almería: revolución verde después de dos décadas. Phytoma-España 198: 42-48.
- Van der Blom J, Robledo A, Torres S, Sánchez JA. 2009. Consequences of the wide scale implementation of biological control in greenhouse horticulture in Almeria, Spain. IOBC/WPRS Bull 49: 9-13.
- Van Lenteren JC. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. BioControl 57:1-20. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>.
- Van Lenteren JC, Bolckmans K, Kohl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl 63: 39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>.
- Van Lenteren J, Bueno VH. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. Biocontrol 48:123-139. <https://doi.org/10.1023/A:1022645210394>.
- Venzon M, Janssen A, Sabelis MW. 2002. Prey preference and reproductive success of the generalist predator *Orius laevigatus*. Oikos 97:116-124. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.970112.x>.

Wajnberg E. 2004. Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: why and how? En: Ehler L, Sforza R, Mateille T (eds), Genetics, evolution and biological control. CAB International, pp 19-37.

Weintraub PG, Pivonia S, Steinberg S. 2011. How many *Orius laevigatus* are need for effective western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, management in sweet pepper? Crop Protection 30 (11): 1443-1448. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.07.015>.

Wittman EJ, Leather SR. 1997. Compatibility of *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera, Anthochoridae) with *Neioseius (Ambyseius) cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) and *Iphiseius (Ambyseius) Berlese* (Acari: Phytoseiidae) in the biocontrol of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae). Exp Appl Acarol 21: 523-538. <https://doi.org/10.1023/A:1018440214801>.

Xu X, Borgemeister C, Poehling HM. 2006. Interactions in the biological control of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch by the predatory bug *Orius insidiosus* Say on beans. Biol Control 36: 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.07.019>.

Zaki FN. 1989. Rearing of two predators. *Orius albidipennis* (Reut.) and *Orius laevigatus* (Fieber) on some insect larvae. J Appl Entomol 107: 107-109. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1989.tb00235.x>.

## Selección para un tamaño corporal superior en *Orius laevigatus*: variabilidad intraespecífica e incidencia en sus parámetros reproductivos

Different characters of natural enemies can affect their performance in biological control programs. Among them, body size may play a significant role, as has been associated with increased fitness. No specific studies on body size have been carried out in any *Orius* species, important predators widely used in biological control. Therefore, the aim of this work was to study the variation in body size in wild and commercial populations of *O. laevigatus*, and artificially select a strain with larger body size. Life table parameters of populations showing different body sizes were investigated. We found a significant variability in body size among wild *O. laevigatus* populations, with commercial populations within the natural range. From this variation we started a selective breeding program for a larger body size, successfully obtaining a strain with a significantly larger body size. Our selected strain showed higher fecundity when provided a nutritional superior food (*Ephestia kuehniella* eggs), and increased fecundity and longevity when fed a nutritionally inferior food (honey bee pollen). Despite a slightly slower developmental time, the overall reproductive potential was similar or superior to the commercial and unselected populations. We hypothesize that the enhanced characteristics of the selected large strain are based on a superior ability to exploit nutritional resources, which would confer stronger resilience under stresses (low food quality or quantity) typically found in agricultural ecosystems, improving its performance as biological control agent. Additional potential benefits of larger body size are discussed.

Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biological Control* 148, 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>.

**S**on numerosas las especies de artrópodos que se emplean con éxito para el control biológico de plagas en diferentes agroecosistemas. Estos agentes de control biológico (ACBs) son especialmente eficaces en cultivos bajo plástico, en los cuales los depredadores generalistas desempeñan un papel fundamental. El género *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) incluye a algunas de las especies cuya cría masiva tiene lugar de forma más intensiva en las biofábricas para su uso en programas de control biológico aumentativo en cultivos protegidos, principalmente para el control del trips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Concretamente, en Europa y otros países de África y Asia, es la especie *O. laevigatus* (Fieber) la que más sueltas comerciales acapara en cultivos de invernadero.

Resulta obvio que los diferentes caracteres bioecológicos de un enemigo natural pueden afectar a su rendimiento en programas de control biológico. Por ejemplo, una regla general admitida en biología es "cuanto más grande mejor", según la cual los individuos con un mayor tamaño corporal tenderán a ofrecer un rendimiento mejorado, así como garantías de instalación y establecimiento a medio-largo plazo y, en definitiva, de adaptación al entorno (*fitness*) (Kingsolver y Huey 2008). En definitiva, el tamaño corporal es uno de los caracteres más importantes desde el punto de vista ecológico. Por un lado, tiene un profundo efecto sobre la fisiología, la longevidad, la reproducción, la competencia intra e interespecífica y muchos otros componentes de gran valor adaptativo y relacionados con ciertos procesos ecológicos (Kingsolver y Huey 2008, Chown y Gaston 2010). Pero además, el tamaño corporal desempeña un papel destacado en la dinámica de las poblaciones y los ecosistemas, siendo clave en las relaciones depredador-presa, y con un impacto significativo en la cantidad de presas que puede encontrar un depredador y en la cantidad de éstas que es capaz de consumir (Kalinkat *et al* 2015). Por lo tanto, resulta crucial entender cómo influye la variación del tamaño corporal de un insecto depredador como *O. laevigatus* en su biología y su ecología para así poder mejorar su rendimiento como ACB, adaptando su tamaño corporal a las diferentes condiciones agroecológicas (Bielza *et al* 2020).

Desde el punto de vista evolutivo, la ventaja ya mencionada que presentan aquellos individuos más grandes permite pronosticar un proceso de selección en favor de un tamaño superior en las poblaciones naturales (Kingsolver y Huey 2008). Sin embargo, dicho proceso puede llevar aparejado un determinado coste ecológico (*fitness cost*), como un desarrollo más tardío y una menor supervivencia de los juveniles, así como unos requerimientos energéticos más elevados. El resultado de estas repercusiones negativas o contrapartidas (*trade-offs*) se traduciría, en última instancia, en la estabilización de la selección en un tamaño óptimo desde el punto de vista evolutivo (Kingsolver y Huey 2008, Xu y Wang 2013). Por lo tanto, resulta fundamental averiguar cómo influye el tamaño corporal de *O. laevigatus* en los distintos componentes de su ciclo vital, a fin de comprender el potencial reproductivo absoluto de este insecto en función de su tamaño.

En resumen, el tamaño corporal es un rasgo determinante en el desempeño de un agente de control biológico, ya que puede tener un impacto significativo no sólo en el crecimiento, la reproducción y la longevidad, sino también en la dinámica de la población, la tasa de depredación, el espectro de presas y la capacidad de adaptación a las perturbaciones propias de un ecosistema agrícola. No en vano, aquellos ACBs que gocen de una mayor capacidad reproductiva y de una mayor tolerancia al estrés ambiental (temperatura, baja calidad o cantidad de alimento) tendrán más probabilidades de establecerse a largo plazo en el cultivo tras su suelta, mejorando sus prestaciones en el control de las plagas (Bielza *et al* 2020).

Existe un gran número de estudios orientados a analizar las características reproductivas de diferentes especies de *Orius* bajo diversas condiciones de alimentación y cría (Bonte y De Clercq 2008, 2010a, 2010b, 2011, Castañé *et al* 2014, Aragón-Sánchez *et al* 2018). Sin embargo, no constan en la literatura trabajos específicos acerca del tamaño corporal en ninguna especie de *Orius*. Por tanto, el objetivo de este estudio se centra en examinar y explotar la variación del tamaño corporal en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus* para seleccionar artificialmente una raza mejorada con un tamaño más grande. Para ello, se evaluó el efecto potencial del tamaño en los parámetros característicos de la tabla de vida en aquellas poblaciones que presentaban tamaños corporales diferentes, tomando como referencia la anchura del pronoto de hembras y machos adultos, y repitiendo todo el proceso para dos dietas diferentes: 1) una dieta óptima, consistente en huevos de la polilla de la harina *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) (en adelante, huevos de *Ephestia*), la cual se considera un alimento nutricionalmente superior en el que, por tanto, la aptitud reproductiva puede expresarse en su plenitud; y 2) una

dieta subóptima consistente en polen de abeja deshidratado (en adelante, polen), el cual es nutricionalmente inferior (Cocuzza *et al* 1997), con el fin de estudiar la respuesta del tamaño corporal en condiciones de estrés alimenticio.

## Materiales y métodos

El mantenimiento y la multiplicación de las diferentes poblaciones de *O. laevigatus* tuvo lugar en condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo, a  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y 16:8 L: O, respectivamente.

### Variación intraespecífica

Para examinar la variabilidad intraespecífica del tamaño del adulto en *O. laevigatus* se empleó un total de 12 poblaciones silvestres (Tabla 2.1) recolectadas en zonas de vegetación no cultivada de diferentes partes de España e Italia, las cuales fueron multiplicadas y mantenidas de forma separada en nuestro laboratorio. Por otro lado, se utilizó una población comercial de Agrobio SL (Almería, España, ORIcontrol®) como referencia.

Para la cría de las poblaciones de insectos se usaron recipientes de plástico de 1 litro con papel de filtro en la tapa. Como alimento se utilizaron huevos de *Ephestia*, y como fuente de humedad y sustrato de oviposición, vainas de judías verdes (*Phaseolus vulgaris* Linnaeus). Todas las poblaciones se propagaron en el laboratorio durante 2-4 generaciones antes del inicio de los experimentos.

Se pesaron aproximadamente 50 adultos recién emergidos (< 24 horas) de cada sexo y para cada población, en grupos de diez individuos y con una precisión de 0.01 mg. Finalmente se congeló a los adultos y se midió la anchura del pronoto mediante un micrómetro óptico a 50 aumentos.

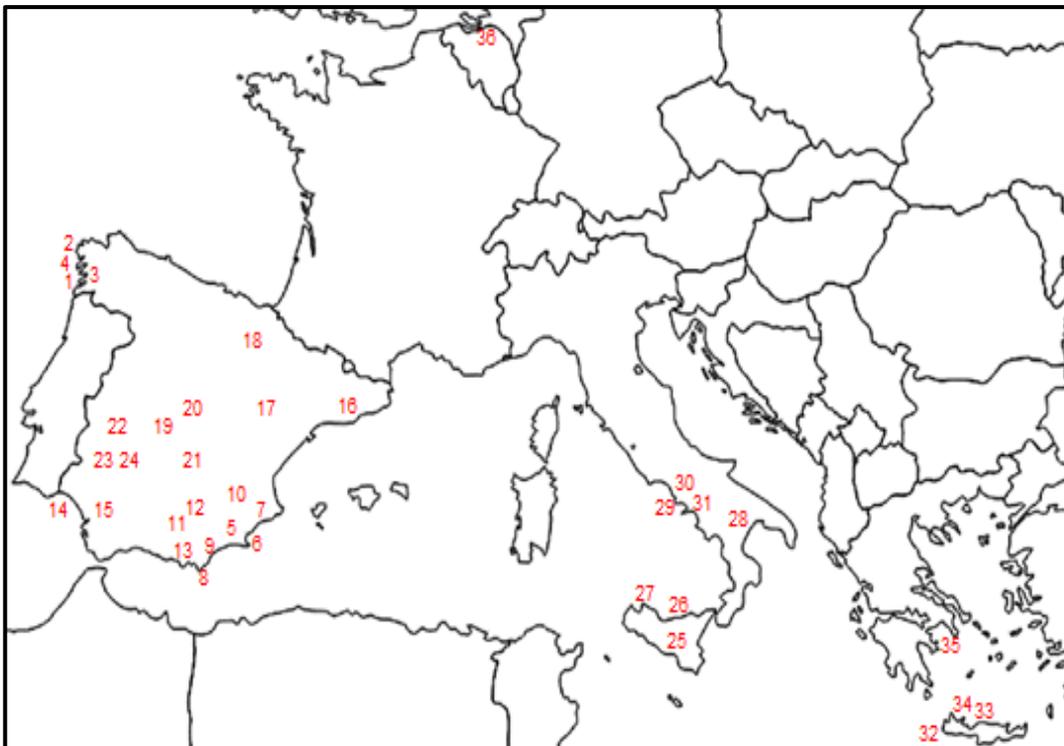
**Tabla 2.1.** Origen y planta hospedante de las poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* empleadas para el estudio de la variabilidad intraespecífica.

Origen	Población	Número <sup>a</sup>	Especie de planta
España (noroeste)	Corrubedo	2	<i>Daphne gnidium</i>
España (sureste)	Perín	5	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	Cabo de Gata	8	<i>Anthyllis cytisoides</i>
	Cazorla	12	<i>Rubus</i> sp.
España (suroeste)	Islantilla	14	<i>Thymus carnosus</i>
	Carmona	15	<i>Mentha suaveolens</i>
España (noreste)	Teruel	17	<i>Aster</i> sp.
	Logroño	18	Sin datos
	Alcobendas	20	Umbelliferae
Italia (Sicilia)	Acate	25	Sin datos
	Palermo	27	<i>Daucus</i> sp.
Italia (sur)	Vesubio	31	Sin datos

<sup>a</sup> número de cada población correspondiente a su localización en el mapa (Figura 2.1).

### Selección para un tamaño más grande

El proceso de selección comenzó a partir de una mezcla de 30 poblaciones silvestres recolectadas en diferentes zonas de España, Italia, Bélgica y Grecia (Figura 2.1, Tabla 2.2) (ver Balanza *et al* 2019 para más detalles). Todas ellas fueron previamente multiplicadas y mantenidas de forma separada en nuestro laboratorio, y a partir de ellas se conformó una población mezcla inicial denominada WildMix de la que partió el proceso de selección. Cada ciclo de selección sucesivo se sometió a una cría continua, realizándose cada dos semanas la extracción de los individuos para la selección del 20% de machos y hembras de mayor tamaño con los que fundar el siguiente paso de selección. Este proceso se repitió varias veces en cada ciclo a fin de garantizar la selección de al menos 200 individuos. Y es que este número de individuos fundadores puede considerarse adecuado para evitar la endogamia, teniendo en cuenta que 10 parejas fundadoras se consideran suficientes para establecer colonias viables de *O. laevigatus* en condiciones controladas (Castañé *et al* 2014). De esta forma se procedió durante 26 ciclos de selección para, posteriormente, con el objetivo de mejorar la selección, realizar una selección de familias de hermanos completos durante cuatro generaciones, hasta alcanzar el paso de selección número 30 (BIG30). Para este método de selección, el 20% de las hembras y los machos de mayor tamaño fueron emparejados y a continuación se les permitió poner huevos durante 10 días. Finalmente se pesaron las ninfas de último estadio (N5) de la descendencia de estas familias, obteniendo un peso medio para cada una de ellas, seleccionando el 20-40% de las familias con mayor tamaño y mezclándolas para dar lugar a la siguiente generación. El hecho de seleccionar en este estadio previo a la emergencia de los adultos es lo que permitió que fuera posible el emparejamiento de adultos de un tamaño grande ya seleccionado, incrementando la ganancia genética y con ello la eficacia del proceso de mejora.



**Figura 2.1.** Distribución geográfica de las poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* empleadas para iniciar el proceso de selección y mejora genética para un tamaño más grande, recogidas en las Tablas 2.1 y 2.2.

**Tabla 2.2.** Poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* incluidas en la población mezcla de partida, WildMix.

Origen	Población	Número <sup>a</sup>	Distancia (km) <sup>b</sup>	Fecha de muestreo	Especie de planta
España (Noroeste)	Portonovo	1	>100	Ago 2013	<i>Ulex</i> sp.
	Corrubedo	2	>100	Ago 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Moreira	3	>100	Ago 2013	<i>Daucus</i> sp.
	Catadoiro	4	>100	Ago 2015	<i>Daucus</i> sp.
España (Sureste)	Perín	5	>25	Oct 2012	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	Cabo de Palos	6	>20	Oct 2012	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	La Zenia	7	>10	May 2013	<i>Convolvulus</i> sp.
	Cabo de Gata	8	>10	Jun 2013	<i>Anthyllis cytisoides</i>
	Cuevas de Almanzora	9	>25	May 2013	Umbelliferae
	Hellín	10	>75	May 2013	<i>Chamaemelum</i> sp.
	Puerto de la Mora	11	>60	Nov 2015	Desconocido
	Cazorla	12	>100	Jul 2014	<i>Rubus</i> sp.
	Órgiva	13	>25	Oct 2018	<i>Thymelaea hirsuta</i>
España (Suroeste)	Islantilla	14	>10	Jun 2014	<i>Thymus carnosus</i>
	Carmona	15	>100	Ago 2013	<i>Mentha suaveolens</i>
España (Noreste)	Cabrils	16	>2	-	Desconocido
	Teruel	17	>100	Sep 2013	<i>Aster</i> sp.
	Logroño	18	>100	Oct 2014	Desconocido
España (Centro)	Méntrida	19	>100	Mar 2015	<i>Chenopodium</i> sp.
	Alcobendas	20	>100	May 2015	Umbelliferae
	Ruidera	21	>100	Jul 2013	<i>Rubus</i> sp.
España (Oeste)	Guadalupe	22	>100	Sep 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Arroyo de San Serván	23	>100	Sep 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Merida	24	>100	Oct 2014	<i>Daphne gnidium</i>
Italia (Sicilia)	Acate	25	>2	Jun 2013	Desconocido
	Cefalú	26	>100	May 2015	Compositae
	Palermo	27	>100	May 2015	<i>Daucus</i> sp.
Italia (Sur)	Policoro	28	>2	Jun 2013	Desconocido
	Nápoles	29	>60	Oct 2018	<i>Daucus silvestre</i>
	Capodichino	30	>60	Oct 2018	<i>Mentha suaveolens</i>
	Vesubio	31	>60	Oct 2018	Desconocido
Grecia (Creta)	Samaria	32	>60	May 2013	Labiatae
	Rethymno	33	>40	May 2013	Umbelliferae
	Chania	34	>80	May 2013	<i>Malva</i> sp.
Grecia	Atenas	35	>100	Abr 2019	Desconocido
Bélgica	Westerlo	36	<10	Oct 2017	Desconocido

<sup>a</sup> número de cada población correspondiente a su localización en el mapa (Figura 2.1).

<sup>b</sup> distancia a zonas de cultivo o invernaderos donde pueden realizarse sueltas comerciales de *O. laevigatus*.

El 20% de los adultos más grandes seleccionados entre los ciclos de selección 7 y 26 se pesaron (en las primeras 24 horas desde su extracción del contenedor de cría) para calcular el peso medio dividiendo el total por el número de individuos. Cada 7-8 ciclos de selección (en los ciclos 1, 8, 15, 22 y 30), se pesaron al menos 50 adultos recién emergidos de cada sexo (< 24 h), en grupos de diez individuos y con una precisión de 0.01 mg, con el fin de realizar sendos controles de la ganancia genética obtenida. Finalmente, se congeló a estos individuos y se midió la anchura del pronoto mediante una lupa binocular dotada de un micrómetro óptico a 50 aumentos.

La población inicial WildMix, la cual se utilizó como control, se mantuvo en las mismas condiciones de cría que las selecciones pero sin sufrir ningún proceso de selección.

### Características del ciclo vital

La nueva raza seleccionada resultante (BIG30), la población mezcla sin seleccionar (WildMix), dos poblaciones comerciales (Agrobio y Koppert) y una población silvestre que se recolectó en Málaga en noviembre de 2017 y que resultó tener un tamaño corporal más pequeño, se utilizaron para estudiar la influencia del tamaño corporal en determinados parámetros del ciclo biológico.

Por un lado, se contaron los huevos puestos por un conjunto de hembras de cada población en trozos de vaina de judía durante 12 horas, colocando éstas en vasos de plástico y comprobando diariamente la eclosión de los huevos. Para evaluar la supervivencia y el tiempo de desarrollo juvenil, se aisló de manera individual en recipientes de polipropileno de 30 mL a al menos sesenta ninfas recién nacidas (N1) de cada población junto con huevos de *Ephestia* y un trozo de judía como alimento y fuente de humedad, respectivamente. Seguidamente, se controló la supervivencia de las ninfas diariamente hasta que alcanzaron la edad adulta, momento en que los individuos fueron sexados y congelados para medir la anchura del pronoto de cada uno de ellos.

Los parámetros reproductivos se estudiaron utilizando una dieta óptima de huevos de *Ephestia* y una dieta subóptima consistente en una mezcla comercial de polen de abeja deshidratado y finamente pulverizado. A las hembras y a los machos recién emergidos (< 24 h) de cada población se les permitió aparearse durante 4 días con su alimento correspondiente (huevos o polen) y un vial con agua pero sin vainas de judía, para evitar la oviposición. A continuación, se aislaron al menos 20 hembras en vasos provistos de ventilación, con huevos de *Ephestia* o polen de abeja como alimento y un trozo de judía como sustrato de puesta. Dos veces por semana se añadía comida fresca, se sustituía el trozo de vaina de judía por una nueva y se contaban los huevos puestos, y así sucesivamente hasta el final de la vida de la hembra. Finalmente, las hembras ya muertas se congelaban y se medía la anchura del pronoto como se ha descrito anteriormente.

### Análisis estadístico

Como el tamaño del cuerpo podría tener un efecto en el patrón de oviposición, se calculó el tiempo de fecundidad (FT50) como la edad (en días) a la que las hembras alcanzaban la mitad de su fecundidad total (FT, durante toda su vida). Los valores medios para cada población en cuanto al tiempo de desarrollo de los estadios de huevo y ninfales, la longevidad de los adultos, la fecundidad total y durante los primeros 10 días (F10) y la FT50 se compararon mediante un ANOVA de un factor (la población) para cada tipo de dieta. Las diferencias entre las medias se separaron mediante test HDS de Tukey ( $p < 0.05$ ). Todos los datos se analizaron por medio del programa SPSS (versión 26, IBM statistics, Armonk, NY, USA).

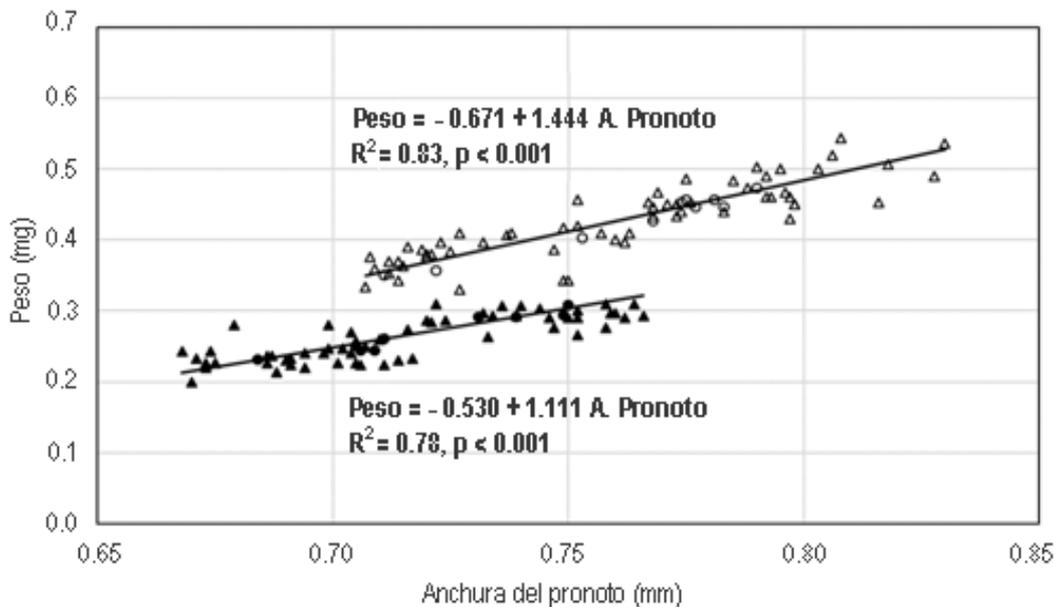
Las diferencias en las tasas de eclosión de los huevos y en la supervivencia de las ninfas entre las cinco poblaciones analizadas (efectos fijos) se estudiaron mediante un modelo lineal generalizado mixto (MLMG) (Wolfinger y O'Connell 1993), asumiendo una distribución binomial de la variable dependiente (individuo eclosionado/emergido o no). Cuando se encontró un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) se realizaron comparaciones *post-hoc* mediante un test  $t$  (HDS de Tukey). Los análisis MLMG se llevaron a cabo con el software SAS® University Edition.

Para calcular los parámetros de la tabla de vida se utilizó el programa informático rm 2.0 (Taberner *et al* 1993). Así, se calculó la tasa intrínseca de incremento natural ( $r_m$ ), la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), el tiempo de generación ( $T$ ), la capacidad finita de crecimiento ( $\lambda$ ), la capacidad innata de crecimiento ( $r_c$ ) y el tiempo de duplicación de la población ( $D$ ). Las relaciones entre los parámetros biológicos se calcularon mediante un test de regresión lineal.

## Resultados

### Variación intraespecífica

El tamaño del cuerpo, estimado como la anchura del pronoto en milímetros y como la masa del individuo en fresco (en las primeras 24 horas), varió significativamente entre las poblaciones estudiadas, tanto en el caso de los machos (anchura:  $F = 17.4$ ,  $p < 0.001$ ; peso:  $F = 15.5$ ,  $p < 0.001$ ) como en el de las hembras (anchura:  $F = 22.8$ ,  $p < 0.001$ ; peso:  $F = 12.5$ ,  $p < 0.001$ ). Así, la anchura del pronoto de los machos osciló entre 0.67 mm y 0.76 mm (Figura 2.2). Concretamente, la población comercial de Agrobio mostró una anchura de pronoto intermedia, de unos 0.72 mm. En cuanto a su peso fresco, éste osciló entre 0.22 y 0.30 mg, de nuevo con la población comercial mostrando un valor intermedio (0.27 mg) (Figura 2.2). En el caso de las hembras, la anchura del pronoto osciló entre 0.72 y 0.81 mm, y el peso fresco, entre 0.36 y 0.50 mg de media, con la población comercial en una posición intermedia para ambos parámetros, con 0.76 mm y 0.48 mg, respectivamente (Figura 2.2).



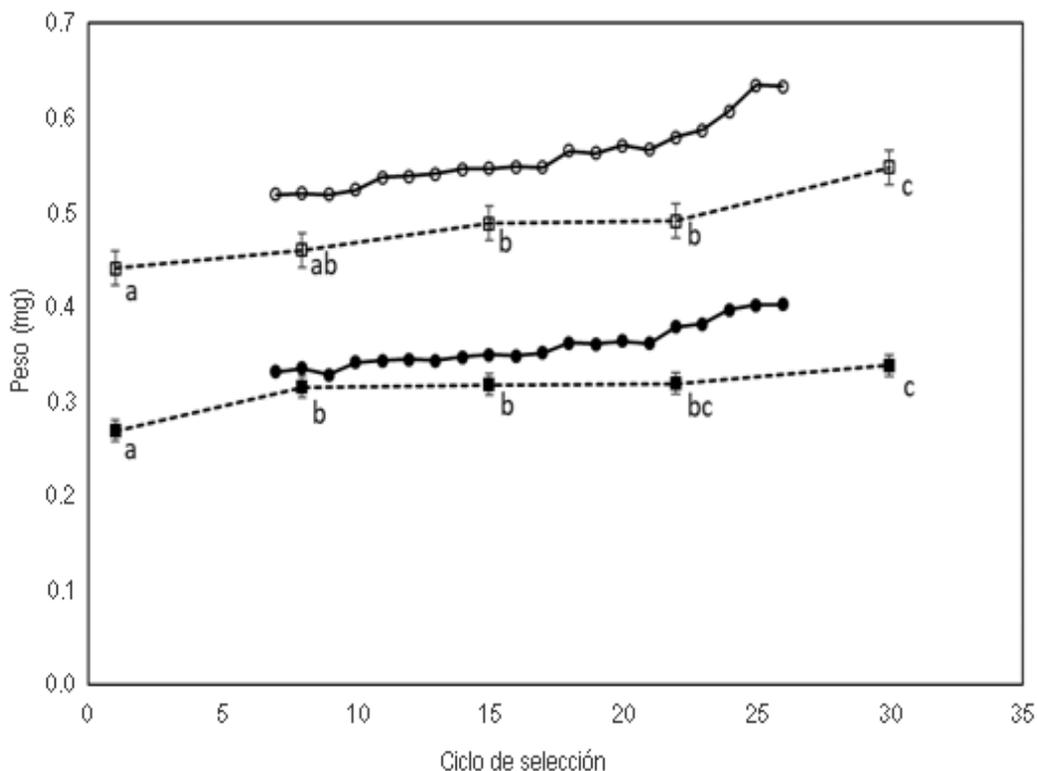
**Figura 2.2.** Relación entre el peso de los adultos (< 24 h) y la anchura del pronoto en 12 poblaciones silvestres (triángulos) y una población comercial (círculos), para machos (símbolos de color negro) y hembras (símbolos en blanco).

La relación entre el peso corporal y la anchura del pronoto fue significativa tanto para las hembras como para los machos (Figura 2.2). No obstante, las hembras fueron significativamente más grandes ( $F = 76.6$ ,  $p < 0.001$ ) y más pesadas ( $F = 545.3$ ,  $p < 0.001$ ) que los machos, con una anchura media del pronoto de 0.76 y 0.71 mm, y un peso de 0.43 y 0.26 mg, para hembras y machos, respectivamente.

### Selección para un tamaño más grande

El peso corporal de los machos ( $F = 30.3$ ,  $p < 0.001$ ) y de las hembras ( $F = 21.3$ ,  $p < 0.001$ ) se incrementó de forma significativa a lo largo de los ciclos de selección (Figura 2.3), pasando de 0.27 y 0.44 mg en el ciclo 1 a 0.34 y 0.55 mg en el ciclo 30 (BIG30) para machos y hembras, respectivamente. El aumento de peso de las hembras (0.11 mg) fue mayor que el de los machos (0.07 mg), aunque ambos incrementos son comparables si tenemos en cuenta el valor en cuanto al porcentaje de mejora (25%).

El peso corporal del 20% de los adultos con mayor tamaño aumentó en el curso de los distintos ciclos de selección, con un incremento más pronunciado en los últimos ciclos (Figura 2.3). La diferencia entre el 20% de mayor tamaño y el peso medio fue mayor en las hembras que en los machos (Figura 2.3), indicando una mayor dispersión de los datos en el primer caso.



**Figura 2.3.** Peso corporal de los adultos (media  $\pm$  error estándar) (< 24 h) a lo largo de los ciclos de selección 1, 8, 15, 22 y 30 (cuadrados y líneas discontinuas) y media del 20% de los individuos de mayor tamaño (< 24 h) seleccionados en los ciclos de selección 7 a 26 (círculos y líneas continuas), para los machos (símbolos de color negro) y las hembras (símbolos blancos). Las medias con la misma letra dentro de cada línea no presentan diferencias significativas (test de Tukey,  $p > 0.05$ ).

### Características del ciclo vital

En la tabla 2.3 se compara el desarrollo ninfal de las diferentes poblaciones ensayadas. En los estadios más jóvenes (N1-N2), la raza de mayor tamaño, BIG30, experimentó un desarrollo significativamente más rápido que las demás líneas, pasando paulatinamente a un desarrollo más lento en los últimos estadios ninfales (N4-N5). Por otro lado, el periodo de desarrollo de las hembras, tanto de huevo a adulto como de N1 a adulto (no así para los machos), fue significativamente más largo en la población BIG30 que en las poblaciones comerciales y que en la población de referencia sin seleccionar (WildMix). Curiosamente, la población de Málaga, a pesar de tener un tamaño corporal más pequeño, mostró un retraso de unos 3-4 días independientemente del sexo del adulto.

En cuanto a la tasa de eclosión de los huevos, ésta fue significativamente más baja en la población silvestre de Málaga. Por otro lado, las poblaciones BIG30, Agrobio y Wildmix mostraron las mayores tasas de supervivencia juvenil, con valores similares entre ellas (63-73%), ligeramente inferiores para la población comercial Koppert (53%), y claramente por debajo en el caso de la población de Málaga (47%).

El tamaño del cuerpo (anchura del pronoto) de las hembras alimentadas con huevos de *Ephestia* tuvo una variación significativa entre las poblaciones estudiadas, con 0.82 mm para la población seleccionada BIG30, 0.76-0.77 mm para las poblaciones comerciales y para la población de referencia, y 0.73 mm para la población de Málaga (Tabla 2.4).

Cuando se les alimentó con huevos de *Ephestia*, la fecundidad durante toda la vida de las hembras de BIG30 (177.4 huevos) fue estadísticamente superior a la de las demás poblaciones (103.6-138.6 huevos) (Tabla 2.4). Estas diferencias se hicieron más patentes cuando las hembras se alimentaron con polen. Así, las hembras de BIG30 pusieron significativamente más huevos (51.5 huevos) que las poblaciones comerciales (31.4 y 29.0 huevos) y la población de control (37.0 huevos) en presencia de este alimento, valores que a su vez fueron claramente superiores a los de la población silvestre con individuos de menor tamaño (14.1 huevos) (Tabla 2.4). Como se esperaba, la alimentación con polen dio lugar a fecundidades totales más bajas que una alimentación óptima con huevos de *Ephestia* ( $F = 138.9$ ,  $p < 0.001$ ).

Asimismo, se ha demostrado la existencia de diferencias entre las poblaciones en cuanto a su fecundidad temprana, es decir, durante los primeros diez días (F10), ya sea con una dieta óptima o con una dieta subóptima. Así pues, BIG30 presentó una fecundidad temprana más alta que el resto de las poblaciones con un tamaño corporal menor (Tabla 2.4). De acuerdo con nuestros resultados, la fecundidad total de la hembra depende de su longevidad ( $R^2 = 43.0\%$ ,  $p < 0.001$ ), por lo que la fecundidad durante los primeros diez días (F10) permite detectar mejor diferencias significativas entre poblaciones y al mismo tiempo se trata de un buen indicador de la fecundidad durante toda la vida de la hembra ( $FT = -20.39 + 2.28 \cdot F10$ ,  $R^2 = 70.3$ ,  $p < 0.001$ ).

Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto a la longevidad entre las poblaciones cuando se alimentó a las hembras de forma óptima, llegando a vivir entre 23.9 y 27.4 días desde la emergencia. Sin embargo, las hembras de BIG30 duraron más tiempo (26.2 días) que las de Koppert y Málaga (16.2 - 20.4 días) con el alimento nutricionalmente inferior, mientras que las hembras de Agrobio y WildMix ocuparon una posición intermedia (21.0 - 22.0 días) (Tabla 2.4). El patrón de oviposición no varió significativamente entre las poblaciones con ambas dietas, con tiempos de fecundidad del 50% (TF50) que oscilaron entre 9.2 y 10.3 días cuando se alimentaron de huevos de *Ephestia*, y entre 5.6 y 8.1 cuando se alimentaron de polen (Tabla 2.4).

Tabla 2.3. Tiempo de desarrollo (días), eclosión de los huevos (%) y supervivencia (%) de los estadios juveniles de diferentes poblaciones de *Orius laevigatus* con distintos tamaños corporales (anchura del pronoto, mm).

	BIG30	Agrobio	Koppert	WildMix	Málaga	F
Huevo	3.18 ± 0.03 a	3.29 ± 0.04 b	3.10 ± 0.04 a	3.32 ± 0.04 b	3.05 ± 0.03 a	6.94***
N1	1.85 ± 0.05 a	2.36 ± 0.05 c	2.40 ± 0.09 c	2.02 ± 0.07 b	2.00 ± 0.00 ab	16.32***
N2	1.52 ± 0.06 a	1.76 ± 0.07 bc	1.97 ± 0.11 c	1.66 ± 0.07 ab	2.95 ± 0.04 d	44.77***
N3	1.36 ± 0.05 b	1.38 ± 0.05 b	1.06 ± 0.04 a	1.51 ± 0.05 b	2.60 ± 0.12 c	49.06***
N4	2.06 ± 0.05 d	1.58 ± 0.07 ab	1.44 ± 0.09 a	1.75 ± 0.07 bc	2.00 ± 0.15 cd	10.45***
N5	3.68 ± 0.10 c	2.80 ± 0.05 a	3.28 ± 0.09 b	3.01 ± 0.08 b	4.11 ± 0.15 d	30.87***
Huevo-hembra	14.02 ± 0.14 b	13.02 ± 0.12 a	13.18 ± 0.21 a	13.40 ± 0.18 a	17.08 ± 0.31 C	53.49***
Huevo-macho	13.32 ± 0.16 a	13.27 ± 0.10 a	13.20 ± 0.11 a	13.16 ± 0.11 a	16.40 ± 0.21 b	60.18***
N1-hembra	10.78 ± 0.12 b	9.79 ± 0.09 a	10.12 ± 0.21 a	10.06 ± 0.14 a	14.00 ± 0.28 c	86.91***
N1-macho	10.15 ± 0.13 a	9.93 ± 0.07 a	10.20 ± 0.11 a	9.88 ± 0.11 a	13.40 ± 0.21 b	86.95***
Eclosión de huevos	98.06 ± 0.01 a	96.75 ± 0.01 a	97.15 ± 0.01 a	97.58 ± 0.01 a	91.51 ± 0.01 b	4.19**
Superv. de ninfas	63.33 ± 0.04 ab	73.33 ± 0.04 a	53.53 ± 0.06 bc	70.00 ± 0.04 a	46.67 ± 0.06 c	9.05***
Tamaño de hembra	0.82 ± 0.01 a	0.77 ± 0.01 b	0.77 ± 0.005 b	0.76 ± 0.01 b	0.74 ± 0.01 c	25.19***
Tamaño de macho	0.76 ± 0.01 a	0.75 ± 0.01 b	0.74 ± 0.006 bc	0.73 ± 0.01 c	0.68 ± 0.01 d	41.57***

Las medias (± error estándar) entre columnas diferentes seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas (ANOVA o MLMG seguido del test de Tukey).  
\*\*\*:  $p < 0.001$ .

Tabla 2.4. Longevidad (días), fecundidad total y temprana (número de huevos), tiempo para el 50% de fecundidad (FT50) y anchura del pronoto de la hembra (mm) de varias poblaciones de *Orius laevigatus* alimentadas con diferentes dietas.

Dieta	Población	Longevidad	Fecundidad total (FT)	Fecundidad temprana (F10)	Tiempo para el 50% de la FT (FT50)	Tamaño de la hembra
Huevos de <i>Ephesia</i>	BIG30	25.2 ± 2.1	177.4 ± 20.6	90.6 ± 3.7	9.6 ± 0.8	0.82 ± 0.01
	Agrobio	27.4 ± 1.9	138.6 ± 14.5	76.9 ± 4.2	9.2 ± 0.7	0.76 ± 0.01
	Koppert	26.5 ± 2.4	133.1 ± 16.7	78.0 ± 3.3	10.3 ± 0.7	0.77 ± 0.01
	WildMix	26.1 ± 2.3	106.9 ± 12.2	71.7 ± 5.6	8.9 ± 0.7	0.77 ± 0.01
	Málaga	23.9 ± 2.4	103.6 ± 14.4	55.3 ± 6.1	9.7 ± 1.0	0.73 ± 0.01
	F	0.27ns	3.20*	6.64***	0.47ns	18.67***
Polen	BIG30	26.2 ± 1.7	51.5 ± 3.0	37.4 ± 1.6	7.2 ± 0.4	
	Agrobio	21.0 ± 2.3	31.4 ± 6.1	29.3 ± 6.2	6.0 ± 0.7	
	Koppert	20.4 ± 1.3	29.0 ± 2.9	24.3 ± 1.3	6.1 ± 0.4	
	WildMix	22.0 ± 3.5	37.0 ± 6.2	27.5 ± 3.9	8.1 ± 1.5	
	Málaga	16.2 ± 1.9	14.1 ± 3.0	15.1 ± 4.4	5.6 ± 0.5	
	F	3.74**	14.12***	8.64***	1.79ns	

Las medias (± error estándar) dentro de la misma columna (para cada dieta) seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente (ANOVA seguido del test de Tukey). ns: no significativo, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Tabla 2.5.** Parámetros de la tabla de vida [tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ), tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ), capacidad innata de crecimiento ( $r_c$ ), tiempo de generación ( $T$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $D$ )] de varias poblaciones de *Orius laevigatus*.

Población	$r_m (\pm \text{EE})$	$R_0$	$\lambda$	$r_c$	$T$	$D$
BIG30	0.153 ( $\pm 0.003$ ) c	55.19	1.17	0.13	26.17	4.52
Agrobio	0.155 ( $\pm 0.002$ ) c	49.25	1.17	0.14	25.17	4.48
Koppert	0.138 ( $\pm 0.004$ ) b	36.34	1.15	0.12	25.97	5.01
WildMlx	0.147 ( $\pm 0.004$ ) bc	36.72	1.16	0.13	24.51	4.72
Málaga	0.103 ( $\pm 0.003$ ) a	21.81	1.11	0.10	29.83	6.71

Las medias ( $\pm$  error estándar) dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente (ANOVA seguido del test de Tukey),  $p < 0.05$ ).

Por último, los parámetros de la tabla de vida se indican en la tabla 2.5. Así pues, se encontraron diferencias significativas para la tasa intrínseca de incremento natural ( $r_m$ ), siendo las poblaciones BIG30 y Agrobio las que mostraron los valores más altos. Del mismo modo, estas poblaciones presentaron los valores más altos de tasa reproductiva neta ( $R_0$ ).

## Discusión

El tamaño del cuerpo se considera un aspecto fundamental para el funcionamiento ecológico y fisiológico de cualquier organismo, ya que tiene un impacto sustancial en su eficacia o potencial ecológico en general (Kingsolver y Huey 2008). Por lo tanto, es de esperar que una raza de ACB con un tamaño corporal más grande exhiba un rendimiento mejorado. Es por eso que, en base a la variación natural que se espera entre las poblaciones silvestres de *O. laevigatus* de la cuenca mediterránea analizadas en este estudio, hemos tratado de seleccionar una cepa de ACB con un tamaño superior, evaluando a continuación su capacidad reproductiva en condiciones nutricionales óptimas y subóptimas.

En primer lugar, hemos confirmado la variabilidad significativa existente en el tamaño corporal entre las poblaciones silvestres, con las poblaciones comerciales comprendidas entre los límites naturales de la especie. En estudios anteriores se obtuvieron pesos similares para una población de hembras de *O. laevigatus* silvestres criadas a 25 °C (Castañé *et al* 2014). Sin embargo, otros estudios informaron de valores más elevados para el peso de las hembras, y especialmente también para los machos, cuando se les alimentaba con huevos de *E. kuehniella* (De Clercq *et al* 2005, Bonte y de Clercq 2008, 2010a, 2010b, 2011, De Puyseleir *et al* 2014). Del mismo modo, otros estudios encontraron anchos de pronoto (De Clercq *et al* 2005) ligeramente más grandes que los de nuestro estudio para las poblaciones silvestres y comerciales. Estos valores más bajos en nuestro caso se pueden explicar atendiendo a dos factores. Por un lado, los autores anteriores utilizaron una temperatura de cría más baja (23 °C) que la de nuestro estudio (26 °C), lo que da lugar a tamaños corporales más grandes de acuerdo con la regla temperatura-tamaño (McCabe y Partridge 1997, Ghosh *et al* 2013). Este efecto de la temperatura durante el desarrollo ninfal sobre el tamaño de los adultos también se ha descrito para varias especies de *Orius* (Nakata 1995, Schuldiner-Harpaz y Coll 2013). Así, el tamaño varió con la temperatura en *O. thripoborus* Hesse y *O. naivashae* Poppius, permitiendo el desarrollo de machos y hembras más pesados cuanto más baja era la temperatura (Bonte *et al* 2012). Por otra parte, la densidad de población durante el

proceso de cría puede tener un efecto significativo en el tamaño de *O. laevigatus*, dando lugar a individuos más livianos cuanto mayor es la densidad de cría (Bonte y de Clercq 2011). Es importante resaltar que en los estudios antes mencionados que tuvieron como resultado tamaños corporales más grandes, los adultos habían sido criados individualmente o bien en grupos de tres. Por el contrario, en el presente trabajo, los adultos se extrajeron en todo caso de contenedores de cría en los que había cientos de individuos, de forma similar a la población silvestre ensayada por Castañé *et al* (2014), la cual mostró también un tamaño corporal menor.

A simple vista, nuestros depredadores seleccionados (BIG30) eran diferentes en cuanto al tamaño en general con respecto a los del resto de poblaciones. De hecho, el proceso de selección (BIG30) incrementó significativamente el peso corporal en un 25% en comparación con el de la población inicial sin seleccionar (Figura 2.3) y en un 28% en comparación con el peso medio de las poblaciones silvestres y comerciales. Del mismo modo, la línea mejorada BIG30 mostró una anchura del pronoto un 8% mayor que el tamaño medio de las poblaciones silvestres y comerciales (Figura 2.2). La ganancia genética en cuanto al peso (0.12 mg), desde la población inicial hasta la seleccionada, fue ligeramente superior a la esperada (0.08 mg) teniendo en cuenta la relación entre el peso y la anchura del pronoto calculada para las poblaciones silvestres y comerciales (Figura 2.2). Este hecho sugiere que la selección aumentó en mayor medida el peso que el tamaño, ganando 0.2 mg por cada mm aumentado, y siendo las hembras de BIG30 más pesadas para su tamaño que el resto de hembras y machos evaluados.

Los valores de fecundidad total registrados en este estudio están en línea con los obtenidos en otros estudios en condiciones de cría similares (108-198 huevos por hembra) (por ejemplo, Sánchez y Lacasa 2002, Tommasini *et al* 2004, Bonte y de Clercq 2008, Aragón-Sánchez *et al* 2018). Especialmente importante fue la asociación hallada entre el tamaño y la fecundidad total. Así pues, la fecundidad de BIG30 fue un 28-71% mayor que la de las demás poblaciones, que mostraron un tamaño inferior. Pero además, la ganancia fue del 39 al 262% cuando a las poblaciones se les proporcionó una dieta nutricional inferior como el polen. El tamaño corporal suele tener un efecto positivo en la fecundidad, como se ha observado en numerosas especies de insectos (Honěk 1993, McCabe y Partridge 1997, Reeve *et al* 2000). Esta relación entre la fecundidad y el tamaño corporal también se ha señalado para otros insectos depredadores. Así, la fecundidad y el potencial reproductivo fue mayor para las hembras de mayor tamaño (peso corporal) en los depredadores *Brontocoris tabidus* Signoret (Oliveira *et al* 2005) y *Podisus rostralis* Stal (Zanuncio *et al* 2002) (Hemiptera: Pentatomidae). En cambio, para un depredador de la misma familia que éstos, *P. maculiventris* Say, no se encontró ninguna relación entre el peso o el tamaño corporal y la fecundidad total (De Clercq *et al* 1998).

En principio, las reservas biológicas más amplias que se les presuponen a nuestras hembras con un tamaño más grande podrían suponer una ventaja clave para alcanzar una fecundidad superior, ventaja que como hemos visto se revela más claramente bajo una alimentación restringida. Sin embargo, *O. laevigatus* y otras especies de *Orius* son lo que se conoce como *income breeders*, término por el que se conoce a la estrategia por la que una especie lleva a cabo una alimentación continua para obtener recursos que les permitan reproducirse, a diferencia de los llamados *capital breeders*, que utilizan recursos almacenados por adelantado (Davis *et al* 2016). Y es que la producción de huevos por parte de las hembras de *Orius* depende principalmente de la calidad nutricional del alimento ingerido durante la etapa adulta, de manera que se ha observado frecuentemente una tasa distinta de maduración de los huevos en función del valor de la dieta (Cocuzza *et al* 1997, Tommasini *et al* 2004, De Clercq *et al* 2005, Aragón-Sánchez *et al* 2018). De hecho, en ausencia de alimentación, las hembras de *Orius* no son capaces de reproducirse, ya que requieren de la ingesta nutricional en su estado adulto para la maduración de los huevos. Por

ejemplo, en el interior de hembras apareadas pero sin alimentar de *O. pumilio* Champion no se encontraron huevos maduros (Shapiro y Shirk 2010). Del igual modo, las hembras de *O. insidiosus* Say ponían 190.3 huevos de media si se les alimentaba con huevos de *Ephestia*, pero solo 2.4 huevos (el 1.3%) en ausencia de alimento (Calixto *et al* 2013), e incluso su fecundidad habría sido más baja de no haber tenido acceso estos adultos a huevos de *Ephestia* durante las primeras 24 horas después de la emergencia. Además, algunas hembras provistas de una dieta óptima pueden ser capaces de compensar por completo una nutrición de inferior calidad durante las fases ninfales (Bonte y de Clercq 2008). Por consiguiente, las reservas superiores esperables en nuestras hembras mejoradas para un mayor tamaño (BIG30) no parecen explicar por sí mismas la diferencia de fecundidad observada cuando se las alimentaba con una dieta basada en una presa o en polen. De hecho, de acuerdo con un estudio previo (Bonte y de Clercq 2010a), hembras de *O. laevigatus* con diferentes tamaños corporales pueden mostrar niveles de fecundidad similares.

En general, todos estos resultados sugieren que el tamaño corporal no parece tener un efecto directo sobre la fecundidad, sino que más bien hay otros factores que contribuyen a aumentar tanto el tamaño corporal como la fecundidad. Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados sugieren que nuestra variante mejorada BIG30, de mayor tamaño, podría poseer una capacidad superior para explotar los recursos alimenticios, ya sean presas o material vegetal, lo que le otorgaría una mayor tasa de crecimiento que conduciría a un tamaño corporal superior y a una mayor tasa de maduración de los huevos. Esto, a su vez, se traduciría en un aumento de la fecundidad. En esa misma línea, Zanuncio *et al* (2002) ya plantearon que los valores más altos para los parámetros reproductivos que mostraban las hembras más corpulentas de *P. rostralis* en su estudio, podrían estar relacionados con una mayor capacidad en ellas para asimilar los nutrientes de las presas.

Por otro lado, si bien la longevidad de las hembras mejoradas de *O. laevigatus* no se vio afectada significativamente por su tamaño corporal cuando se les proporcionó una dieta superior (huevos de *Ephestia*), sí que se percibió un efecto significativo cuando se les suministró una dieta inferior basada en polen. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una suerte de asignación de recursos energéticos entre la supervivencia y la reproducción, como evidencia el hecho de que las hembras vírgenes tienden a vivir más tiempo que las hembras que ovipositan en algún momento durante su vida adulta (Leon-Beck y Coll 2009). De este modo, nuestras hembras menos pesadas podrían reducir la producción de huevos para subsistir durante un tiempo más prolongado. Estos resultados coinciden con otros datos del estudio comentado anteriormente con *P. rostralis* en el que se utilizaron hembras de diferentes categorías de peso, de manera que las hembras más ligeras vivían durante un período de tiempo similar a las más pesadas, pero a cambio reducían la puesta de huevos, de nuevo apoyando la existencia de la asignación de recursos entre fecundidad y supervivencia (Zanuncio *et al* 2002).

Volviendo a nuestros resultados, la respuesta observada para la longevidad bajo diferentes dietas es consistente con nuestra hipótesis de que la cepa BIG30 seleccionada cuenta con una capacidad superior para aprovechar los recursos alimenticios. Con una dieta óptima, las hembras de distintos tamaños corporales serían capaces de asignar recursos de forma diferencial entre la reproducción y la supervivencia, dando lugar a una longevidad similar pero a cambio también a fecundidades distintas. En cambio, con una dieta subóptima, la limitación energética no permitiría una distribución óptima de los recursos, lo que resultaría en una supervivencia y una puesta de huevos variable. Así las cosas, la cepa BIG30, en su habilidad para explotar mejor cualquier recurso subóptimo, consigue extender su longevidad y en consecuencia producir más huevos, mientras que la población Málaga, con un tamaño corporal más reducido, pone significativamente

menos huevos y además vive menos tiempo, lo que sugiere una eficiencia más baja en el aprovechamiento de los nutrientes.

Como se ha comentado anteriormente, la selección de un atributo beneficioso puede llevar aparejada variaciones perjudiciales en otros rasgos, lo que se conoce como coste ecológico de la selección. En este sentido, nuestra raza BIG30 mostró una fecundidad superior pero al mismo tiempo un desarrollo ligeramente más tardío en las hembras. Sin embargo, en cuanto a la supervivencia de las ninfas, BIG30 expresó un resultado similar a la población de referencia sin seleccionar y a una de las poblaciones comerciales, e incluso fue superior a la otra población comercial y a la población silvestre de pequeño tamaño. Algunos autores han hecho referencia a la existencia de un equilibrio entre el tamaño corporal de los adultos y el tiempo de desarrollo y la supervivencia de los juveniles en sus estudios en otras especies de insectos (por ejemplo, Xu y Wang 2013). Sin embargo, en el presente estudio encontramos un patrón no lineal entre el tamaño y el desarrollo ninfal, ya que tanto los individuos más grandes (BIG30) como los particularmente pequeños (Málaga) mostraron un desarrollo más largo. En otros estudios, las poblaciones de *O. laevigatus* que poseían tamaños corporales estadísticamente diferentes (debido a factores ajenos a la calidad y a la cantidad de la alimentación, como la fuente de humedad o el sustrato de oviposición) también evidenciaron una escasa relación entre el tamaño corporal y el tiempo de desarrollo o la supervivencia de las ninfas (Bonte y Clercq 2010b). De hecho, las ninfas (tanto las que darían lugar a hembras como las que se convertirían en machos) de mayor peso tendían a desarrollarse más rápidamente que las más ligeras. En otro estudio en el que se comparaban sistemas de cría con y sin uso de plantas, las hembras de *O. laevigatus* exhibieron pesos significativamente diferentes pero tiempos de desarrollo similares; los machos, por el contrario, no difirieron en tamaño pero sí en el tiempo de desarrollo (De Puyseleir *et al* 2014).

Las ninfas de BIG30 emplearon 14 días para pasar de huevo a hembra adulta, sólo un 4% más que la población no seleccionada, si bien éstas eran un 8% más grandes y un 25% más pesadas. Además, en el caso de los machos no hubo diferencias en el tiempo de desarrollo entre las poblaciones (a excepción de Málaga), y sin embargo los machos de BIG30 mostraron un tamaño significativamente más grande que los de las otras poblaciones. Esto sugiere una mayor tasa de crecimiento en las ninfas de la variante seleccionada BIG30, apoyando la hipótesis de una capacidad superior en ella para explotar los recursos nutritivos. En ese sentido, conviene profundizar en este estudio para determinar si esta ventaja se basa en una mayor capacidad de adquisición de alimento (cantidad de alimento presa y no presa) o en un aprovechamiento más eficiente de la energía o los nutrientes presentes en el alimento ingerido.

El potencial reproductivo global de las diferentes poblaciones se refleja en sus tasas intrínsecas de incremento natural ( $r_m$ ) y en la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ). Así pues, en base a los valores de  $r_m$ , los mayores potenciales bióticos se obtuvieron para las poblaciones Agrobio, BIG30 y WildMix, seguidas de Koppert y, por último, Málaga. Además, nuestra línea seleccionada, BIG30, mostró la tasa reproductiva neta más alta, influenciada principalmente por la superioridad del valor de su fecundidad. Otros estudios ya encontraron que el efecto de las presas sobre el potencial reproductivo de *O. laevigatus* se evidenciaba mejor mediante  $R_0$  que mediante  $r_m$  (Aragón-Sánchez *et al* 2018). Tal vez el origen de esta circunstancia se encuentre en el hecho de que la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ) expresa el número total de hembras producidas por cada hembra al día, por lo que este parámetro se ve fuertemente afectado por el tiempo de desarrollo. Por su parte, la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) es el número de veces que una población se multiplica en cada generación (número de hembras por hembra y por generación), y en este sentido es importante hacer hincapié en la escala generacional, lo que desvincula a esta métrica del tiempo de desarrollo (Kingsolver y Huey 2008). En cualquier caso, el parámetro más adecuado

para evaluar la aptitud depende del contexto ecológico y del impacto de varios factores, como puede ser la temperatura (Kingsolver y Huey 2008). Para terminar, nuestros valores de *fitness* se han obtenido a una temperatura constante, pero es importante tener en cuenta que los depredadores se desempeñan bajo diferentes temperaturas y bajo la influencia de otras variables ambientales en el campo. En este sentido, la interacción entre la temperatura y el tamaño corporal puede tener un fuerte impacto en la aptitud ecológica, haciendo que un cuerpo de mayor tamaño se adapte mejor a las condiciones ambientales extremas (Bielza *et al* 2020). Es por eso que se hace necesario seguir investigando con el fin de evaluar el efecto potencial de un tamaño corporal más grande en la eficacia general de nuestro enemigo natural en condiciones de campo.

Para concluir, gracias a este estudio hemos revelado una variabilidad considerable en cuanto al tamaño del cuerpo entre las poblaciones silvestres de *O. laevigatus*, mientras que las poblaciones comerciales se encuentran dentro del rango natural de la especie. A partir de esta variación intraespecífica, iniciamos un programa de cría selectiva con el fin de alcanzar un mayor tamaño corporal, obteniendo con éxito una línea genética con un tamaño significativamente más grande. Posteriormente, nuestra variedad seleccionada mostró una mayor fecundidad cuando se le proporcionaba un alimento óptimo (huevos de *Ephestia*), pero sobre todo una mayor fecundidad y longevidad cuando se le suministraba una dieta subóptima basada en polen. A pesar de sus tiempos de desarrollo ligeramente más lentos, el potencial reproductivo global de esta población fue similar o incluso superior al de las poblaciones de referencia. Como hemos comentado, nuestro razonamiento va en la dirección de que las características mejoradas de esta línea seleccionada se basan en una capacidad superior para aprovechar los recursos nutricionales, lo que le conferiría una mayor resistencia al estrés nutricional (baja calidad o cantidad de alimentos) que suele darse en los ecosistemas agrícolas, mejorando su rendimiento como agente de control biológico.

Sea como fuere, nuestros resultados sientan las bases para futuras investigaciones sobre la mejora genética del tamaño corporal de un ACB, pero también de otros rasgos determinantes para el ejercicio del control biológico, como las condiciones ambientales extremas (temperatura y humedad), la resistencia a insecticidas, la adaptación a una alimentación en ausencia de presa o la tasa de depredación, entre otros (Bielza *et al* 2020). Es importante destacar que el tamaño del cuerpo es fácilmente percibido por el cliente en última instancia, ya sean éstos técnicos o agricultores, lo que favorece la percepción de un valor añadido en el producto que puede tener ciertas ventajas potenciales. No en vano, hemos demostrado que la mejora que se ha llevado a cabo en este estudio puede ir perfectamente asociada a otros rasgos mejorados, lo que a buen seguro incrementaría la aceptación de una población seleccionada de ACB para su uso en las explotaciones agrícolas.

## Referencias

Aragón-Sánchez M, Román-Fernández LR, Martínez-García H, Aragón-García A, Pérez-Moreno I, Marco-Mancebón VS. 2018. Rate of consumption, biological parameters and population growth capacity of *Orius laevigatus* fed on *Spodoptera exigua*. *BioControl* 63: 785-794. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9906-4>.

Balanza V, Mendoza JE, Bielza P. 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomol Exp Appl* 167: 626-635. <https://doi.org/10.1111/eea.12813>.

- Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>. <https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1127>.
- Bonte M, de Clercq P. 2008. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J Econ Entomol* 101: 1127-1133. <https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1127>.
- Bonte M, de Clercq P. 2010a. Impact of artificial rearing systems on the developmental and reproductive fitness of the predatory bug, *Orius laevigatus*. *J Insect Sci* 10: 104. <https://doi.org/10.1673/031.010.10401>.
- Bonte M, de Clercq P. 2010b. Influence of male age and diet on reproductive potential of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Ann Entomol Soc Am* 103: 597-602. <https://doi.org/10.1603/AN09180>.
- Bonte M, de Clercq P. 2011. Influence of predator density, diet and living substrate on developmental fitness of *Orius laevigatus*. *J Appl Entomol* 135: 343-350. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01554.x>.
- Bonte J, de Ro M, Conlong D, de Clercq P. 2012. Thermal biology of the predatory bugs *Orius thripoborus* and *O. naivashae* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 41: 989-996. <https://doi.org/10.1603/EN12089>.
- Calixto AM, Bueno VHP, Montes FC, Silva AC, Van Lenteren JC. 2013. Effect of different diets on reproduction, longevity and predation capacity of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Biocontrol Sci. Tech.* 23: 1245-1255. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822850>.
- Castañé C, Bueno VH, Carvalho LM, van Lenteren JC. 2014. Effects of founder population size on the performance of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) colonies. *Biol Control* 69: 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.11.009>.
- Chown SL, Gaston KJ. 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biol Rev* 85: 139-169. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00097.x>.
- Cocuzza GE, de Clercq P, van de Veire M, de Cock A, Degheele D, Vacante V. 1997. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomol Exp Appl* 82: 101-104. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00118.x>.
- Davis RB, Javoš J, Kaasik A, Ōunap E, Tammaru T. 2016. An ordination of life histories using morphological proxies: capital vs. income breeding in insects. *Ecology* 97: 2112-2124. <https://doi.org/10.1002/ecy.1435>.
- De Clercq P, Arijs Y, van Meir T, van Stappen G, Sorgeloos P, Dewettinck K, Rey M, Grenier S, Febvay G. 2005. Nutritional value of brine shrimp cysts as a factitious food for *Orius laevigatus*. *Biocontrol Sci Tech* 15: 467-479. <https://doi.org/10.1080/09583150500086706>.
- De Clercq P, Vandewalle M, Tirry L. 1998. Impact of inbreeding on performance of the predator *Podisus maculiventris*. *BioControl* 43: 299-310. <https://doi.org/10.1023/A:1009961921817>.
- De Puyseleir V, Höfte M, de Clercq P. 2014. Continuous rearing of the predatory anthocorid *Orius laevigatus* without plant materials. *J Appl Entomol* 138: 45-51. <https://doi.org/10.1111/jen.12063>.

- Ghosh M, Testa ND, Shingleton AW. 2013. Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in *Drosophila melanogaster*. Proc Royal Soc B: Biol Sci 280: 20130174. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0174>.
- Honěk A. 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. Oikos 66: 483-492. <https://doi.org/10.2307/3544943>.
- Kalinkat G, Jochum M, Brose U, Dell AI. 2015. Body size and the behavioral ecology of insects: linking individuals to ecological communities. Curr Opin Insect Sci 9: 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.017>.
- Kingsolver JG, Huey RB. 2008. Size, temperature, and fitness: three rules. Evo Ecol Res 10: 251-268.
- Leon-Beck M, Coll M. 2009. The mating system of the flower bug *Orius laevigatus*. Biol Control 50: 199-203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.016>.
- McCabe J, Partridge L. 1997. An interaction between environmental temperature and genetic variation for body size for the fitness of adult female *Drosophila melanogaster*. Evolution 51: 1164-1174. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1997.tb03964.x>.
- Nakata T. 1995. Effect of rearing temperature on the development of *Orius sauteri* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae). Appl Entomol Zool 30: 145-151. <https://doi.org/10.1303/aez.30.145>.
- Oliveira I, Zanuncio JC, Serrão JE, Zanuncio TV, Pinon TBM, Fialho MDCQ. 2005. Effect of female weight on reproductive potential of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). Braz Arch Biol Tech 48: 295-301. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200017>.
- Reeve MW, Fowler K, Partridge L. 2000. Increased body size confers greater fitness at lower experimental temperature in male *Drosophila melanogaster*. J Evol Biol 13: 836-844. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00216.x>.
- Sánchez JA, Lacasa A. 2002. Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Bull Entomol Res 92: 77-88. <https://doi.org/10.1079/BER2001136>.
- Schuldiner-Harpaz T, Coll M. 2013. Effects of global warming on predatory bugs supported by data across geographic and seasonal climatic gradients. PloS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066622>.
- Shapiro JP, Shirk PD. 2010. Ovarian development in predacious *Orius pumilio*: relationship to diet, mating, and juvenile hormone. Ann Entomol Soc Am 103: 971-978. <https://doi.org/10.1603/AN09123>.
- Taberner A, Castaera P, Silvestre E, Dopazo J. 1993. Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. Bioinformatics 9: 535-540. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/9.5.535>.
- Tommasini MG, van Lenteren JC, Burgio G. 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. Bull Insectology 57: 79-93.

Wolfinger R, O'Connell M. 1993. Generalized linear mixed models a pseudo-likelihood approach. *J Stat Comput Simul* 48: 233-243.

Xu J, Wang Q. 2013. Trade-off between adult body size and juvenile survival: an experimental test of parental effects in the Mediterranean flour moth. *Australian J Entomol* 52: 403-406. <https://doi.org/10.1111/aen.12038>.

Zanuncio JC, Molina-Rugama AJ, Santos GP, Ramalho FS. 2002. Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesqui Agropecu Bras* 37: 1225-1230.

## Selección de una línea de *Orius laevigatus* con una eficacia mejorada en la alimentación con polen

In many protected crops, augmentative biological control heavily relies on generalist predators, which continuous presence on the crop allows an early response to pest immigration and outbreaks. Persistence is possible by their ability to feed on alternative food, such as pollen, plant-provided or artificially supplemented. However, fitness is decreased when feeding on alternative foods, hindering performance. Extensive research has been carried out on different alternative and supplemental food. Here, we present a new approach to face this challenge: genetic improvement for better fitness feeding on suboptimal food. *Orius laevigatus* is one of the main biological control agents used in greenhouse vegetable crops. A breeding process was carried out on the basis of a broad intraspecific variability exploration for 10-days fecundity feeding on pollen (14.2-37.9 eggs/female for 30 wild and commercial populations). Life history traits were finally compared between our two selected strains and three commercial, wild and acclimated-to-pollen unselected populations, both on rich (*Ephestia* eggs) and suboptimal (dry honeybee pollen) diets. Selected lines showed considerably improved values for longevity (1.5-fold), early (1.3-fold) and lifetime fecundity (1.9-fold), nymphal survival (3.5-fold), intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) (7.3-fold) and net reproductive rate ( $R_0$ ) (6.7-fold) as compared to reference unselected strains when they were fed on pollen, although still lower than those on the optimal diet. Selection feeding on plant material resulted in no trade-offs when feeding on the factitious prey. This improvement was due to genetic gain rather than to phenotypic plasticity to tolerate nutritious restriction. Finally, some potential contributions of these improved lines not only for augmentative biocontrol but also for artificial rearing are provided.

Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. J Pest Sci. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01291-x>.

**E**l control biológico aumentativo en cultivos bajo plástico depende en gran medida de los depredadores generalistas para controlar a las plagas clave, ya sean ácaros fitoseidos como *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), o heterópteros como *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae), *Nesidiocoris tenuis* Reuter o *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae) (van Lenteren *et al* 2020). Su importancia como agentes de control biológico radica en su capacidad para persistir en el cultivo a pesar de las fluctuaciones en la densidad de la plaga, incluso en condiciones de escasez o ausencia de éstas. Su presencia continua permite una respuesta temprana tanto a la invasión de nuevas plagas como a potenciales brotes poblacionales

(Janssen y Sabelis 2015). Además, estos depredadores omnívoros se liberan a menudo de forma preventiva, antes de la aparición de la plaga, justo después del trasplante, como en el caso de *O. laevigatus* y *A. swirskii* (Sánchez *et al* 2000, Calvo *et al* 2012a) o incluso en semillero (*N. tenuis*) (Calvo *et al* 2012b).

El establecimiento y la supervivencia de estos depredadores en ausencia de presas es posible gracias a su capacidad para alimentarse de recursos que habitualmente les proporcionan las plantas, los cuales pueden ser complementarios (permitiendo su supervivencia, pero precisando aún de presas para su desarrollo y reproducción) o alternativos (que permiten el desarrollo y la reproducción en ausencia de presas) (Bielza *et al* 2020). Así pues, los insectos zoofitófagos son capaces de aprovechar los recursos de los que disponen en las plantas, como el néctar, la savia o incluso el contenido del mesófilo, aumentando su supervivencia, aunque normalmente sólo el polen, cuya riqueza nutricional es superior, les permite desarrollarse y reproducirse de forma eficaz (Urbaneja *et al* 2005, Ingegno *et al* 2011, Biondi *et al* 2016).

Con el fin de facilitar y favorecer el rendimiento de estos depredadores, una posibilidad consiste en suministrar alimento suplementario de forma artificial (Vandekerkhove y De Clercq 2010, Brenard *et al* 2019), especialmente en cultivos que tienen una baja cantidad o calidad de polen, como el pepino (Oveja *et al* 2016) o muchas plantas ornamentales (rosas, crisantemos, etc.) (Leman y Messelink 2015). Por ejemplo, el polen de *Typha angustifolia* está disponible comercialmente para sustentar a las poblaciones de ácaros fitoseidos, en particular si se liberan de forma preventiva en ausencia de la plaga y cuando el acceso al polen en el cultivo es limitado (Messelink *et al* 2014). Del mismo modo, la liberación de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* en semilleros o después del trasplante suele ir acompañada de algún alimento alternativo, por lo general *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) o quistes de *Artemia franciscana* Kellogg (Anostraca: Artemiidae) (Calvo *et al* 2012b, Urbaneja-Bernat *et al* 2013, Brenard *et al* 2019). Esta estrategia de suplementar las sueltas de depredadores con algún alimento alternativo para promover la instalación y el establecimiento de sus poblaciones está cada vez más implementada en los programas de control integrado de numerosos cultivos protegidos (Leman y Messelink 2015).

Sin embargo, muchos autores han resaltado la reducción sustancial en la capacidad reproductiva que se produce en un depredador cuando se alimenta de forma exclusiva con la mayoría de alimentos alternativos (Cocuzza *et al* 1997, Vandekerkhove y De Clercq 2010). Esta es una de las principales limitaciones para lograr un establecimiento a largo plazo en los cultivos, especialmente en aquellos con una disponibilidad más baja de polen o con escaso valor nutricional (Bielza *et al* 2020). Recientemente se ha señalado esta limitación como uno de los principales retos a los que se enfrenta el control biológico en los cultivos protegidos (Bielza *et al* 2020). Es por eso que la investigación sobre la respuesta de los depredadores generalistas a la alimentación con diferentes dietas alternativas y suplementarias ha sido objeto de una gran atención en las últimas décadas (Richards y Schmidt 1996, Cocuzza *et al* 1997, Bonte y De Clercq 2008, Venkatesan *et al* 2008, Lundgren 2009, Vandekerkhove y de Clercq 2010, Oveja *et al* 2012, 2016, Calixto *et al* 2013, Urbaneja-Bernat *et al* 2015, Leman y Messelink 2015, Janssen y Sabelis 2015, Bernardo *et al* 2017, Brenard *et al* 2019).

Esta tesis, en cambio, propone un nuevo enfoque para afrontar este reto: la mejora genética de los depredadores zoofitófagos con el fin de que adquieran una capacidad superior para explotar cualquier forma de alimento alternativo. Existen varias adaptaciones fisiológicas y morfológicas que permiten a los depredadores omnívoros aprovechar con éxito tanto los recursos vegetales como los animales, como la posesión de un estilete especializado para lacerar y succionar como aparato bucal, así como glándulas salivales accesorias o enzimas digestivas y detoxificadoras (Dumont *et al* 2018). Por lo tanto, es posible explotar la variación genética que existe entre

poblaciones e individuos hacia la zoofagia o la fitofagia y manipular esta preferencia mediante un proceso de selección artificial (Dumont *et al* 2019). En este sentido, recientemente se ha demostrado una amplia variabilidad intraespecífica en la zoofagia del depredador omnívoro *Campylomma verbasci* (Meyer) (Hemiptera: Miridae) (Dumont *et al* 2016, 2017). En concreto, las diferencias encontradas en cuanto a la frecuencia con la que este insecto alterna entre buscar a su presa favorita (en este caso, la araña roja) y alimentarse de recursos vegetales (polen) se basaban en una evidente divergencia genotípica entre las distintas líneas estudiadas (Dumont *et al* 2017).

En cualquier caso, es evidente que la mejora genética es capaz de desempeñar un papel decisivo en la evolución del rendimiento de los depredadores a través de la adaptación de las líneas seleccionadas a una alimentación alternativa a la depredación (Bielza *et al* 2020). Como resultado de ello, por un lado, las razas más tolerantes a una alimentación subóptima podrían ver realizado su rendimiento como ACB tanto si se liberan de forma preventiva al inicio del cultivo como en caso de enfrentarse a una situación de escasez de presas a lo largo del ciclo de cultivo. Por otra parte, estas líneas mejoradas podrían responder mejor a la suplementación alimenticia, e incluso permitir el uso de alimentos alternativos más baratos que los huevos de *Ephestia* o los quistes de *Artemia*. Además, una mejora en la eficacia del depredador para aprovechar un determinado suplemento alimenticio podría contrarrestar el riesgo de que los herbívoros presentes en el cultivo respondan mejor a ese alimento suministrado que el propio depredador, lo que ocurre frecuentemente en el caso del polen, del cual se ha probado su capacidad para promover el crecimiento de algunas poblaciones de plagas objetivo, como los trips (Leman y Messelink 2015).

Para poder optimizar la eficacia de los depredadores con una dieta subóptima, es esencial, en primer lugar, conocer la variabilidad intraespecífica, ya que ésta determina la capacidad de respuesta potencial de la especie y por tanto la adaptación, en este caso, al estrés alimenticio. Seguidamente, esta variación heredable entre individuos y poblaciones dentro de la especie debe ser explotada a través de un proceso de selección artificial hasta alcanzar una eficacia mejorada para una alimentación en ausencia de presa (Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018, Bielza *et al* 2020).

En capítulos anteriores hemos destacado a *O. laevigatus* como uno de los enemigos naturales más utilizados en los programas de control biológico aumentativo, especialmente en invernaderos de Europa, África y Asia (van Lenteren 2012). Este depredador es especialmente relevante en cultivos hortícolas, particularmente en invernaderos de pimiento en los que realiza un control eficaz del trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (Sánchez *et al* 2000). Algunos estudios acerca del rendimiento de *O. laevigatus* bajo diferentes formas de alimentación independientemente de su presa se centran en una única población, normalmente de origen comercial, y casi siempre sin considerar la variabilidad natural que existe entre las diferentes poblaciones de este insecto (por ejemplo, Arijs y de Clercq 2004, Tommasini *et al* 2004, Bonte y de Clercq 2008). En el presente estudio, en cambio, se ha explorado la variabilidad en la tolerancia a la alimentación con polen empleando para ello treinta poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*. Además, se han seleccionado artificialmente dos líneas, cada una de ellas procedente de un conjunto diferente de poblaciones, con una aptitud ecológica mejorada cuando se alimentan exclusivamente de polen. Paralelamente, se ha desarrollado una línea alimentada con polen durante de varias generaciones, pero sin seleccionar, como un control que haga posible discernir entre adaptación (selección) y aclimatación (plasticidad fenotípica) y, por tanto, demostrar el éxito del proceso de selección en la ganancia genética adquirida en nuestras líneas mejoradas.

## Materiales y métodos

### Variabilidad intraespecífica

Se recolectaron 25 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* a partir de flores de plantas de diferentes zonas naturales sin cultivar de la cuenca mediterránea (ver Capítulo 2, Tabla 2.2, Figura 2.1, para más detalles). Como referencia, se usaron cinco poblaciones comerciales facilitadas por Bioline Agrosiences (Reino Unido, Oriline®; en adelante, Bioline), Koppert Biological Systems (Países Bajos, Thripor-L®; en adelante, Koppert), Agrobio SL (Almería, España, ORIcontrol®; en adelante, Agrobio), Biobest Group (Bélgica, Orius-System®; en adelante, Biobest) y Surinver Cooperative Group (Alicante, España; en adelante, Surinver). Estas poblaciones de insectos se establecieron con un mínimo de 50 individuos fundadores para algunas poblaciones silvestres pero normalmente con más de 100, y a partir de muchos más individuos en el caso de las poblaciones comerciales. Todas ellas se criaron en el laboratorio utilizando recipientes de plástico de 1 L con papel de filtro en la tapa, con acceso *ad libitum* a huevos congelados de *Ephestia*, trozos de judía verde (*Phaseolus vulgaris* Linnaeus) como fuente de humedad y sustrato de oviposición, y cáscara de trigo como refugio para evitar el canibalismo. El mantenimiento y la multiplicación de todas estas poblaciones tuvo lugar en condiciones controladas a  $26 \pm 1$  °C de temperatura y  $65 \pm 5\%$  de humedad relativa, con fotoperiodo L16:O8. Hasta el inicio de los ensayos, todas las poblaciones se reprodujeron durante 2-5 generaciones, manteniendo en todo momento niveles poblacionales por encima de los 1000 individuos.

Los bioensayos se llevaron a cabo bajo dos dietas diferentes: una considerada como dieta rica, consistente en huevos de *Ephestia*, y la otra considerada como dieta pobre, basada en una mezcla comercial de polen de abeja (Hijas del Sol®) deshidratado y pulverizado. Los adultos recién emergidos (en las últimas 24 horas) de cada población se separaron en dos grupos, recibiendo cada uno de ellos una dieta diferente de las dos señaladas. Después de 4 días en los que tenía lugar el apareamiento y el periodo de preoviposición (Cocuzza *et al* 1997), los adultos se sexaron y se procedió a aislar a las hembras para examinar su fecundidad y su longevidad. Para ello, se colocaron individualmente al menos 50 hembras por tratamiento en pequeños envases de polipropileno (45 mL) con tapas ventiladas, con un trozo de judía sellado en sus extremos con cera de parafina como sustrato para la puesta de huevos, y huevos de *Ephestia* o polen como alimento, según el tratamiento. Cada 2-3 días se realizó el recuento de huevos, cambiando a las hembras a un trozo limpio de judía y añadiendo alimento fresco. La fecundidad se evaluó hasta el décimo día desde el momento del apareamiento (*F10*), ya que la fecundidad temprana se ha considerado un parámetro eficaz para predecir la fecundidad total (Yano *et al* 2002, Bonte *et al* 2012, Capítulo 2). Durante este tiempo, las judías con huevos del tratamiento con polen se conservaron por separado a baja temperatura (15 °C), de manera que, una vez registrada la fecundidad, se pudieran seleccionar los huevos de alrededor del 40% de las hembras más fecundas de cada población. Se establecieron dos grupos de 15 poblaciones tratando de distribuir uniformemente las poblaciones silvestres por origen geográfico junto con algunas poblaciones comerciales (Tabla 3.1), de manera tal que la descendencia seleccionada de estas poblaciones constituyeran el primer paso de selección de cada una de las dos líneas base de selección previstas (en adelante, 1POL y 2POL).

### Selección para una mayor tolerancia al polen

Como ya se ha mencionado, se iniciaron dos líneas de selección (1POL y 2POL) a partir de la descendencia de las hembras que presentaron valores de fecundidad más elevados de los dos grupos distintos de poblaciones (Tabla 3.1). A partir de estas poblaciones de partida se llevaron a cabo varios ciclos de selección formados por varias tandas de selecciones, con el fin de evaluar a

al menos 200 hembras de cada línea en función de su fecundidad temprana ( $F_{10}$ ) con una alimentación basada en polen. A lo largo de este proceso de selección, las líneas mejoradas se fueron criando en las mismas condiciones que las poblaciones iniciales pero con una dieta limitada, que consistió en una alimentación tres veces por semana a base de la mezcla comercial de polen y sólo una vez a la semana mediante huevos de *Ephestia*, y por tanto, en una restricción a un tercio de la alimentación óptima con huevos de *Ephestia*, considerada como 10 huevos por individuo al día (Yano *et al* 2002). Del mismo modo, entre distintos ciclos de selección, las líneas mejoradas se criaron durante varias generaciones con esta dieta restringida en vez de únicamente a base de polen, a fin de disponer de suficientes individuos para los ciclos de selección siguientes.

Para evaluar la fecundidad temprana de las hembras con una alimentación subóptima, 24 horas después de la emergencia se transfirió a los adultos de la dieta restringida a otra basada exclusivamente en polen. Tres días después, se individualizó a las hembras y se comprobó su fecundidad durante 10 días. A continuación, la descendencia de las hembras con un valor  $F_{10}$  superior a la media del ciclo de selección anterior se mezcló para fundar el siguiente paso de selección. Este fue el procedimiento que seguido en cada ciclo de selección hasta el sexto ciclo dentro de ambas líneas genéticas (por tanto, 1POL-6 y 2POL-6). A partir de entonces, con el único fin de acelerar la ganancia genética, se llevó a cabo una selección por familias de hermanos completos hasta llegar a 1POL-13 y 2POL-11. Para ello, se fue seleccionando la descendencia de aquellas hembras más fecundas, repitiendo a continuación el proceso ya explicado para estas familias de segunda generación: individualización de las hembras para evaluar la fecundidad temprana, conservación de las judías con huevos a baja temperatura (15 °C) hasta el final del proceso y, por último, selección de las mejores familias en función de su tolerancia al polen, mezclando sus ninfas para obtener el siguiente paso de selección.

Paralelamente, se puso en marcha una línea genética aclimatada al polen a partir de una mezcla de todas las poblaciones silvestres para determinar si la mejora adquirida por nuestras líneas seleccionadas se debe a la ganancia genética obtenida mediante el proceso de selección, o si por el contrario tiene su origen en la plasticidad fenotípica de la propia especie para tolerar la restricción nutricional. Dicha población aclimatada se mantuvo durante los últimos tres años (aproximadamente durante 50 generaciones) en condiciones controladas, alimentada mediante la citada dieta restringida y de forma similar a las poblaciones mejoradas pero sin sufrir ningún proceso de selección.

### Características del ciclo vital

Del mismo modo que se procedió con la mejora en el tamaño (Capítulo 2), se evaluaron una serie de parámetros biológicos (tiempo de desarrollo, supervivencia durante los estadios ninfales, longevidad, fecundidad total, fecundidad temprana y tamaño corporal) usando polen como alimento. En este caso se compararon las dos líneas seleccionadas para una mayor tolerancia al polen (1POL-13 y 2POL-11), usando como referencia una población comercial (Agrobio), una población silvestre recogida recientemente de una zona cercana al monte Vesubio, en Italia, en octubre de 2018 (en adelante, Vesubio), así como la población aclimatada al polen mencionada anteriormente (en adelante, Aclimatada). Además, como el proceso selectivo hacia una fitofagia (en este caso, polinivoría) más eficiente podría conllevar cierto coste ecológico para el depredador a la hora de alimentarse de sus presas (ver el apartado Discusión del Capítulo 2), los ensayos con todas estas poblaciones se repitieron usando huevos de *Ephestia* como alimento. Todos estos experimentos se realizaron en condiciones controladas a  $26 \pm 1$  °C de temperatura,  $65 \pm 5\%$  HR y fotoperiodo L16:D8.

Cada vez que se llevaba a cabo el conteo de huevos en las vainas de judía, éstas se colocaban en vasos de plástico con tapas bien aireadas, evaluando la eclosión de los huevos diariamente. A continuación, se aisló a un total de 60-120 ninfas recién nacidas (en las últimas 24 horas) de cada población en recipientes de polipropileno de 30 mL junto con huevos de *E. kuehniella* o polen, en función del tratamiento evaluado, y un trozo de judía como fuente de humedad. La supervivencia se controló cada día hasta la edad adulta, y finalmente se sexó a los adultos, midiendo la anchura máxima del pronoto a 50 aumentos, usando para ello una lupa binocular dotada de micrómetro óptico.

Al mismo tiempo, se permitió que las hembras y los machos recién emergidos de cada población se aparearan durante 4 días con huevos o polen de *Ephestia*. A continuación, se individualizó a las hembras y se registró la fecundidad como se ha descrito anteriormente, en este caso hasta la muerte de las hembras.

### Análisis estadístico

Para analizar la fecundidad a los diez días ( $F_{10}$ ) con cada dieta, se llevó a cabo un ANOVA de un factor usando como factor aleatorio la población. Para comparar la dieta rica frente a la dieta más pobre, así como las poblaciones comerciales (5) frente a las silvestres (25) y las poblaciones fundadoras de la línea base 1POL (15) frente a las de la línea 2POL (15), se emplearon sendos test t de Student de dos colas.

Las diferencias entre poblaciones (líneas seleccionadas, poblaciones aclimatadas, comerciales y silvestres) en los parámetros biológicos se analizaron mediante sendos ANOVA de un factor para cada dieta. Antes del análisis se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Cuando se observaron diferencias significativas entre las poblaciones, se separaron las medias mediante un test HSD de Tukey. Además, las diferencias entre la dieta rica y la dieta pobre se compararon también en este caso mediante un test de Student a dos colas. Las hembras que vivieron menos de diez días y las que no llegaron a poner huevos se excluyeron en todo caso del análisis.

Para calcular los parámetros característicos de las tablas de vida se utilizó el programa *rm* 2.0 (Taberner *et al* 1993), aplicado a los datos de supervivencia y a las tasas de fecundidad en las diferentes clases de edad, previamente calculados, y considerando una proporción de sexos de 1:1 de acuerdo con el desarrollo observado durante el bioensayo. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante la técnica *bootstrap*, efectuando 1000 repeticiones, tal y como sugieren Aragón-Sánchez *et al* (2018). La supervivencia por edades ( $l_x$ ), la fecundidad por edades ( $m_x$ ), así como los siguientes parámetros se estimaron a partir del desarrollo de tablas de vida: tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ), tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ), tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), tiempo medio de generación ( $T$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $D$ ).

Se realizaron test de correlación entre la fecundidad total ( $FT$ ) a lo largo de toda la vida de la hembra y la  $F_{10}$  para determinar la idoneidad de utilizar esta última como medida de resultados. Se utilizaron datos de hembras individuales de las poblaciones seleccionadas y no seleccionadas para calcular la correlación a nivel individual, y las fecundidades medias de cada población para una correlación a nivel poblacional.

## Resultados

### Variación intraespecífica

Los valores de fecundidad temprana ( $F_{10}$ ) de las veinticinco líneas silvestres de *O. laevigatus* de España, Italia y Grecia y de las cinco poblaciones comerciales al alimentarse de polen y huevos de *Ephestia* se indican en la Tabla 3.1. De los datos presentes en ella se deduce una variabilidad natural significativa para nuestra especie tanto en el caso de la dieta óptima basada en huevos de la polilla de la harina ( $F = 12.11$ ,  $gl = 29 / 1209$ ,  $p < 0.001$ ) como en el caso de la dieta basada en polen ( $F = 9.93$ ,  $gl = 29 / 1087$ ,  $p < 0.001$ ).

En condiciones óptimas de alimentación, los valores de fecundidad temprana oscilaron entre 51.2 y 105.1 huevos por hembra, lo que indica una variabilidad de 2.1 veces entre la población menos fecunda, la recolectada en Cabo de Gata (Almería) y la más fecunda, que correspondió a la población comercial suministrada por Agrobio. De hecho, las poblaciones comerciales mostraron una  $F_{10}$  media estadísticamente superior (media  $\pm$  error estándar =  $87.1 \pm 3.4$  huevos / hembra) a la de las silvestres ( $71.8 \pm 1.4$ ) ( $t = 8.81$ ,  $gl = 1297$ ,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, las poblaciones fundadoras de la línea base seleccionada 1POL también mostraron una  $F_{10}$  estadísticamente superior ( $77.0 \pm 1.9$ ) a la de la línea base 2POL ( $71.0 \pm 1.9$  huevos / hembra) ( $t = 4.36$ ,  $gl = 1237$ ,  $p < 0.001$ ).

Para el tratamiento con polen, la fecundidad temprana también varió significativamente entre las poblaciones ensayadas, yendo desde Rethymno, con 14.2 huevos / hembra, hasta Puerto de la Mora, que llegó a poner 34.9 huevos / hembra. De nuevo, las poblaciones comerciales mostraron valores más elevados de fecundidad temprana usando polen como único alimento ( $27.1 \pm 1.5$  huevos / hembra) que las poblaciones silvestres ( $23.4 \pm 0.7$ ) ( $t = 4.49$ ,  $gl = 1181$ ,  $p < 0.001$ ). Y también igual que antes, las poblaciones fundadoras de 1POL fueron significativamente más fecundas alimentándose con polen ( $26.3 \pm 0.9$  huevos / hembra) que las de la línea 2POL ( $21.4 \pm 0.8$ ) ( $t = 7.87$ ,  $gl = 1115$ ,  $p < 0.001$ ).

Como se esperaba, el valor nutricional de la dieta tuvo un efecto sustancial en los valores de fecundidad, con un aumento significativo en la dieta rica con huevos de *Ephestia* ( $74.3 \pm 1.3$  huevos / hembra) con respecto a su valor en la dieta pobre basada en polen de abeja ( $24.1 \pm 0.6$ ) ( $t = 65.82$ ,  $gl = 2480$ ,  $p < 0.001$ ).

### Selección para una mayor tolerancia al polen

Ambas líneas genéticas mejoradas (1POL-13 y 2POL-11) presentaron valores de fecundidad temprana ( $F_{10}$ ) más elevados cuando se alimentaron con polen (35.1 y 38.9 huevos / hembra, respectivamente) que todas las poblaciones silvestres y comerciales ensayadas (entre 14.2 y 34.9 huevos / hembra) (Tabla 3.1, Tabla 3.3). Sin embargo, sólo en el caso de la línea 2POL-11 la producción de huevos fue significativamente superior durante los primeros 10 días a la del resto de líneas ensayadas, mientras que no se observaron diferencias significativas entre 1POL-13 y las mejores poblaciones iniciales alimentadas con polen: Puerto de la Mora (34.9 huevos / hembra), Logroño (33.9) y Alcobendas (31.4) (Tabla 3.1). Además, la línea seleccionada 1POL-13 mostró una  $F_{10}$  ligeramente inferior (35.1 huevos / hembra) a la 2POL-11 (38.9) a pesar de experimentar la primera de ellas dos pasos de selección más que la segunda, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellas, y ambas pueden considerarse como poblaciones mejoradas en su tolerancia al polen.

**Tabla 3.1.** Diferencias entre las poblaciones mediterráneas y comerciales de *O. laevigatus* en la fecundidad temprana (*F10*) alimentadas con dos dietas diferentes.

Línea Base	Población	País / Comercial	Loc <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	<i>F10</i> <i>Ephestia</i> <sup>c</sup>	<i>F10</i> Pollen <sup>c</sup>
1POL	Agrobio	Comercial	-	50	105.1 ± 3.2	30.3 ± 1.9
1POL	Puerto de la Mora	España	11	50	89.1 ± 3.5	34.9 ± 1.9
1POL	Surinver	Comercial	-	50	87.1 ± 3.2	30.8 ± 1.5
1POL	Portonovo	España	1	50	86.8 ± 2.6	23.0 ± 2.1
1POL	Alcobendas	España	20	50	85.0 ± 3.1	31.4 ± 1.8
1POL	Islantilla	España	14	50	84.2 ± 3.9	27.5 ± 1.1
1POL	Palermo	Italia	27	50	79.7 ± 4.4	23.7 ± 2.1
1POL	Hellín	España	10	50	79.3 ± 2.9	18.9 ± 1.7
1POL	Bioline	Comercial	-	50	76.5 ± 2.7	22.5 ± 1.4
1POL	Logroño	España	18	50	72.3 ± 3.2	33.9 ± 2.0
1POL	Guadalupe	España	22	50	70.3 ± 3.2	27.7 ± 1.4
1POL	Perín	España	5	50	65.5 ± 3.1	20.5 ± 1.6
1POL	La Zenia	España	7	50	64.0 ± 2.9	24.2 ± 1.4
1POL	Moreira	España	3	50	56.8 ± 2.9	19.9 ± 1.0
1POL	Cabo de Gata	España	8	50	51.2 ± 4.2	23.6 ± 1.5
2POL	Cabrils	España	16	50	84.2 ± 3.8	23.3 ± 1.6
2POL	Koppert	Comercial	-	50	83.9 ± 4.5	25.8 ± 2.0
2POL	Biobest	Comercial	-	50	83.7 ± 3.7	25.8 ± 2.0
2POL	Policoro	Italia	28	50	78.1 ± 3.2	21.9 ± 1.6
2POL	Cazorla	España	12	50	76.8 ± 3.6	24.2 ± 1.6
2POL	Mérida	España	24	50	69.9 ± 4.0	18.7 ± 1.3
2POL	Cuevas de Almanzora	España	9	50	67.3 ± 4.7	21.3 ± 1.9
2POL	Acate	Italia	25	50	67.3 ± 3.1	21.7 ± 1.7
2POL	Méntrida	España	19	50	67.2 ± 3.1	21.0 ± 1.3
2POL	Samaria	Grecia	32	50	66.9 ± 3.4	21.7 ± 2.3
2POL	Corrubedo	España	2	50	66.4 ± 3.4	19.0 ± 1.0
2POL	Rethymno	Grecia	33	50	63.6 ± 3.2	14.2 ± 1.2
2POL	Carmona	España	15	50	62.9 ± 2.7	23.7 ± 1.2
2POL	Teruel	España	17	50	62.5 ± 3.0	18.2 ± 1.1
2POL	Ruidera	España	21	50	61.3 ± 2.8	16.6 ± 1.3
					$F = 12.11^{***c}$	$F = 9.93^{***c}$
					$t = 65.82^{***d}$	

<sup>a</sup> número de cada población correspondiente a su localización en el mapa (Figura 2.1).

<sup>b</sup> número de hembras grávidas ensayadas por población y por tratamiento.

<sup>c</sup> Fecundidad durante 10 días tras la emergencia del adulto (huevos por hembra, media ± error estándar).

<sup>d</sup> ANOVA de un factor dentro de cada tipo de dieta, \*\*\*:  $p < 0.001$ .

<sup>e</sup> test t de Student entre ambos tipos de dieta, \*\*\*:  $p < 0.001$ .

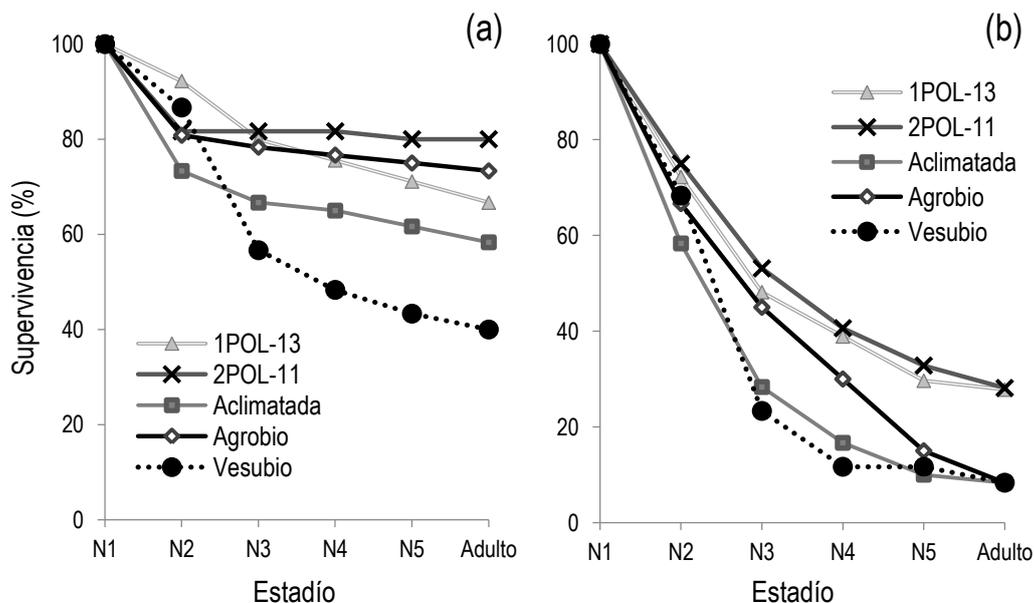
Tabla 3.2. Tiempo medio de desarrollo (días ± error estándar) de los estadios ninfales, supervivencia de huevos a adulto (%) y tamaño del cuerpo (anchura del pronoto, en mm) de diferentes poblaciones de *O. laevigatus* con dos tratamientos nutricionales diferentes.

Dieta	Estadio / Parámetro	1POL-13	2POL-11	Aclimatada	Agrobio	Vesubio	F
Huevos de <i>Ephesia kuehniella</i>	Huevo	3.19 ± 0.04 Aab	3.58 ± 0.06 Ac	3.15 ± 0.05 Aa	3.29 ± 0.04 Ab	3.08 ± 0.04 Aa	13.90***
	N1	1.81 ± 0.04 Ab	1.84 ± 0.05 Ab	1.39 ± 0.07 Aa	2.36 ± 0.05 Ad	2.02 ± 0.02 Ac	49.32***
	N2	2.31 ± 0.10 Ab	2.47 ± 0.09 Ab	1.55 ± 0.08 Aa	1.76 ± 0.07 Aa	3.03 ± 0.05 Ac	35.59***
	N3	1.93 ± 0.08 Ab	2.12 ± 0.08 Ab	2.03 ± 0.09 Ab	1.38 ± 0.05 Aa	2.76 ± 0.14 Ab	34.19***
	N4	1.41 ± 0.06 Ab	1.48 ± 0.07 Aab	1.86 ± 0.12 Ac	1.58 ± 0.07 Aab	1.73 ± 0.14 Abc	4.20*
	N5	2.97 ± 0.08 Aab	3.06 ± 0.08 Ab	3.06 ± 0.14 Ac	2.80 ± 0.05 Aa	3.75 ± 0.12 Ac	13.12***
	Huevo-Adulto	13.63 ± 0.09 Aab	14.50 ± 0.10 Ac	13.09 ± 0.16 Aa	13.14 ± 0.08 Aa	16.42 ± 0.24 Ad	93.29***
	Número de adultos	60	47	36	88	25	-
	% Superviv. huevo-adulto	63.10	75.50	56.70	70.93	38.50	-
	Anchura del macho	0.74 ± 0.01 Bbc	0.72 ± 0.01 Bab	0.72 ± 0.01 Ba	0.75 ± 0.01 Bc	0.75 ± 0.01 Bc	5.98***
Polen	Anchura de la hembra	0.79 ± 0.01 Ba	0.78 ± 0.01 Ba	0.78 ± 0.01 Ba	0.78 ± 0.01 Ba	0.79 ± 0.01 Ba	1.94ns
	Huevo	3.17 ± 0.05 Aa	3.45 ± 0.06 Ab	3.12 ± 0.04 Aa	3.15 ± 0.05 Aa	3.17 ± 0.05 Aa	6.41***
	N1	2.10 ± 0.13 Abc	1.87 ± 0.05 Aa	1.94 ± 0.12 Bab	2.28 ± 0.07 Ac	2.12 ± 0.08 Abc	3.19*
	N2	2.42 ± 0.11 Aa	2.85 ± 0.07 Bb	2.24 ± 0.29 Ba	2.15 ± 0.12 Ba	2.93 ± 0.13 Ab	6.30***
	N3	2.62 ± 0.13 Bb	3.28 ± 0.13 Bc	2.50 ± 0.34 Bb	1.72 ± 0.19 Ba	2.71 ± 0.18 Abc	12.31***
	N4	2.94 ± 0.23 Bab	3.62 ± 0.23 Bb	3.67 ± 0.49 Bb	2.67 ± 0.17 Ba	2.43 ± 0.20 Bb	3.65*
	N5	4.67 ± 0.19 Ba	3.94 ± 0.13 Ba	4.60 ± 0.51 Ba	4.40 ± 0.24 Ba	5.00 ± 0.95 Ba	1.99ns
	Huevo-Adulto	17.93 ± 0.23 Bb	18.83 ± 0.35 Bb	18.00 ± 0.77 Bb	15.60 ± 0.40 Ba	18.60 ± 1.12 Bb	4.35**
	Número de adultos	14	19	4	5	5	-
	% Superviv. huevo-adulto	26.6	27.8	8.1	8.0	8.0	-
Anchura del macho	0.62 ± 0.01 Aab	0.67 ± 0.01 Ac	0.56 ± 0.07 Aab	0.60 ± 0.05 Aab	0.59 ± 0.05 Aab	12.18***	
Anchura de la hembra	0.66 ± 0.01 Aab	0.71 ± 0.01 Ac	0.60 ± 0.05 Aab	0.70 ± 0.05 Abc	0.66 ± 0.05 Aab	2.85*	

Las medias (± error estándar) seguidas de la misma letra mayúscula entre dietas no son significativamente diferentes según el test de Student ( $p > 0.05$ ). Las medias (± error estándar) seguidas de la misma letra minúscula dentro de una fila no son significativamente diferentes (ANOVA seguido del test HDS de Tukey); ns: no significativo; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### Características del ciclo vital

Para estudiar las características biológicas y comprobar el coste ecológico potencial asociado al proceso de selección, se llevaron a cabo ensayos de tabla de vida para las cepas seleccionadas y para las poblaciones de referencia sin seleccionar en ambas condiciones de dieta: pobre (polen) y rica (huevos de *Ephestia*). Los tiempos de desarrollo y la supervivencia de los estadios juveniles obtenidos en nuestros ensayos se muestran comparados en la Tabla 3.2. En primer lugar, constatamos un desarrollo significativamente más largo y un tamaño corporal inferior (anchura del pronoto) para la dieta pobre tanto en las líneas seleccionadas como en las de referencia. Así, se estimó un retraso de más de cuatro días en la dieta basada en polen en comparación con el desarrollo general (de huevo a adulto) con huevos de *E. kuehniella* ( $13.81 \pm 0.16$  frente a  $18.13 \pm 0.49$  días, respectivamente) ( $t = 21.83$ ,  $gl = 1 / 301$ ,  $p < 0.001$ ). Por su parte, la anchura media del pronoto disminuyó en un 14.1% tanto en las hembras ( $t = 14.87$ ,  $p < 0.001$ ) como en los machos ( $t = 15.32$ ,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la duración del ciclo entre ambos sexos ni con la dieta rica ( $t = 0.40$ ,  $gl = 1 / 253$ ,  $p = 0.692$ ) ni con la pobre ( $t = 0.55$ ,  $gl = 1 / 46$ ,  $p = 0.585$ ). En cambio, en presencia de huevos de *Ephestia*, las poblaciones seleccionadas 1POL-13 y 2POL-11 mostraron tiempos de desarrollo más largos que las líneas aclimatadas y comerciales, siendo la silvestre la que más extendió su desarrollo. Respecto de la alimentación con polen, únicamente Agrobio se desarrolló más rápido que el resto de las poblaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos en presencia de polen hay que considerarlos con cautela, ya que fueron muy pocos los individuos que alcanzaron la edad adulta con este alimento, sobre todo en lo que respecta a las poblaciones sin seleccionar. Tal es así que la supervivencia de las ninfas cuando se alimentan de polen es considerablemente más alta en las líneas seleccionadas (27 - 28%) que en las poblaciones de referencia (8%), con una diferencia de 3.3 y 3.5 veces. Por el contrario, en el tratamiento con *Ephestia*, la supervivencia es similar entre la población comercial y las líneas seleccionadas (63 - 76%), situándose las tres ligeramente por encima de la población aclimatada (57%) y claramente ya sobre la línea recolectada en el monte Vesubio (39%). Esta notable variabilidad entre poblaciones en cuanto a la supervivencia de las ninfas a lo largo del ciclo en función de la dieta se representa con más claridad en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Supervivencia a lo largo del ciclo vital para las líneas seleccionadas y sin seleccionar de *Orius laevigatus* con dos dietas diferentes: huevos de *Ephestia kuehniella* (a) y polen (b).

La Tabla 3.3 muestra los resultados de longevidad, fecundidad total y fecundidad temprana ( $F10$ ) para ambos tratamientos, huevos de *Ephestia* y polen. En primer lugar se constató que, al alimentarse de polen, nuestras líneas mejoradas presentaron valores estadísticamente superiores tanto en longevidad como en fecundidad, sobre todo en el caso de 2POL-11, cuyas hembras vivieron unos 10 días más (31 días) que la línea aclimatada, la línea comercial y la población silvestre (20-22 días). Además, ambas líneas duplicaron el número de huevos puestos durante ese tiempo en comparación con las poblaciones de referencia (61 frente a 27-31 huevos / hembra). 1POL-11 mostró una longevidad con el polen significativamente más baja que 2POL-11 (26 días), al igual que ocurrió con la fecundidad total (47 huevos / hembra). Asimismo, las dos variedades seleccionadas alcanzaron 20 días con una elevada proporción de hembras vivas (57.7 y 84.4%, respectivamente), en contraste con el 33% del resto de poblaciones. Finalmente, se puede observar cómo estas líneas mejoradas mantuvieron un buen rendimiento reproductivo a lo largo de toda su vida adulta en comparación con las poblaciones de referencia (Figura 3.2b). Al analizar las poblaciones en condiciones óptimas (Tabla 3.3) no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas en lo que respecta a la longevidad, a la fecundidad total o a la supervivencia durante los 20 primeros días. Sin embargo, el valor de fecundidad temprana ( $F10$ ) fue significativamente mayor en 2POL-13, efecto que también se observó en su patrón de oviposición diferencial (Figura 3.2a).

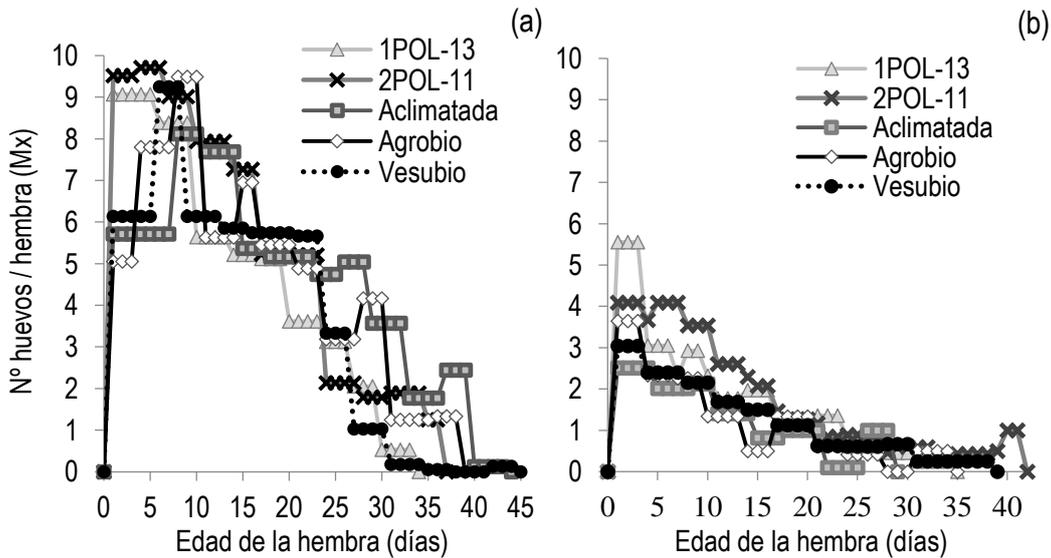
**Tabla 3.3.** Diferencias entre las poblaciones mediterráneas y comerciales de *O. laevigatus* en la longevidad, la fecundidad total ( $FT$ ) y temprana ( $F10$ ) y en la supervivencia de las hembras durante los primeros 20 días de oviposición al ser alimentadas con dos dietas diferentes.

Dieta	Población	N	Longevidad (días)	FT (huevos/♀)	F10 (huevos/♀)	% superv. 20 días
Huevos de <i>Ephestia kuehniella</i>	1POL-13	25	31.7±2.8 Aa	139.8±13.5 Ba	79.1±4.1 Bab	57.7
	2POL-11	24	28.3±2.5 Aa	147.4±13.9 Ba	93.4±3.7 Bb	56.2
	Aclimatada	25	31.6±2.5 Ba	149.2±13.8 Ba	65.7±4.3 Ba	72.0
	Agrobio	23	27.4±2.6 Ba	138.6±14.6 Ba	76.9±4.0 Ba	66.7
	Vesubio	23	27.1±2.6 Ba	113.2±14.8 Ba	71.8±5.4 Ba	47.8
				0.79 ns	1.01 ns	4.43**
Polen	1POL-13	21	25.6±1.5 Ab	47.3±2.4 Ab	35.1±1.8 Abc	57.7
	2POL-11	16	30.5±2.0 Ac	60.8±3.8 Ac	38.9±1.8 Ac	84.4
	Aclimatada	39	20.2±2.2 Aa	27.3±3.6 Aa	23.3±2.0 Aa	33.3
	Agrobio	32	21.0±2.5 Aa	31.4±6.1 Aa	29.3±5.2 Aab	33.3
	Vesubio	23	21.5±2.1 Aa	31.4±3.1 Aa	24.6±1.2 Aa	33.3
				5.16***	15.68***	7.43***

Las medias ( $\pm$  error estándar) seguidas de la misma letra mayúscula entre ambos tipos de dietas no son significativamente diferentes según el test de Student ( $p > 0.05$ ). Las medias ( $\pm$  error estándar) seguidas de la misma letra minúscula dentro de una columna (diferencias entre poblaciones) no son significativamente diferentes (ANOVA seguido del test HDS de Tukey); ns: no significativo; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Finalmente, los parámetros de la tabla de vida se muestran en la Tabla 3.4. La tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ) de las poblaciones seleccionadas fue similar (2POL-11) o incluso superior (1POL-13) a la de las líneas de referencia al alimentarlas con huevos, siendo Vesubio la de peor rendimiento. Un efecto aún más significativo se encontró en el tratamiento con polen, mostrando las líneas mejoradas 1POL-13 y 2POL-11 los valores más altos (0.066 - 0.073 frente a 0.003 -

0.010). Además, las poblaciones seleccionadas presentaron valores mejorados en la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) (6.3 - 8.5 frente a 1.1 - 1.3), la tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ) (1.07 - 1.08 frente a 1.00 - 1.01) y el tiempo de duplicación ( $D$ ) (9.6 - 10.6 días frente a 69.4 - 263). Por otro lado, se encontró una buena correlación entre fecundidad total ( $FT$ ) y fecundidad temprana ( $F10$ ) tanto a nivel individual ( $R^2 = 0.80$ ,  $gl = 1 / 203$ ,  $p < 0.001$ ) como a nivel poblacional ( $R^2 = 0.96$ ,  $gl = 1 / 8$ ,  $p < 0.001$ ), siendo el modelo exponencial el que mejor explica la relación entre ambas variables (Figura 3.3).

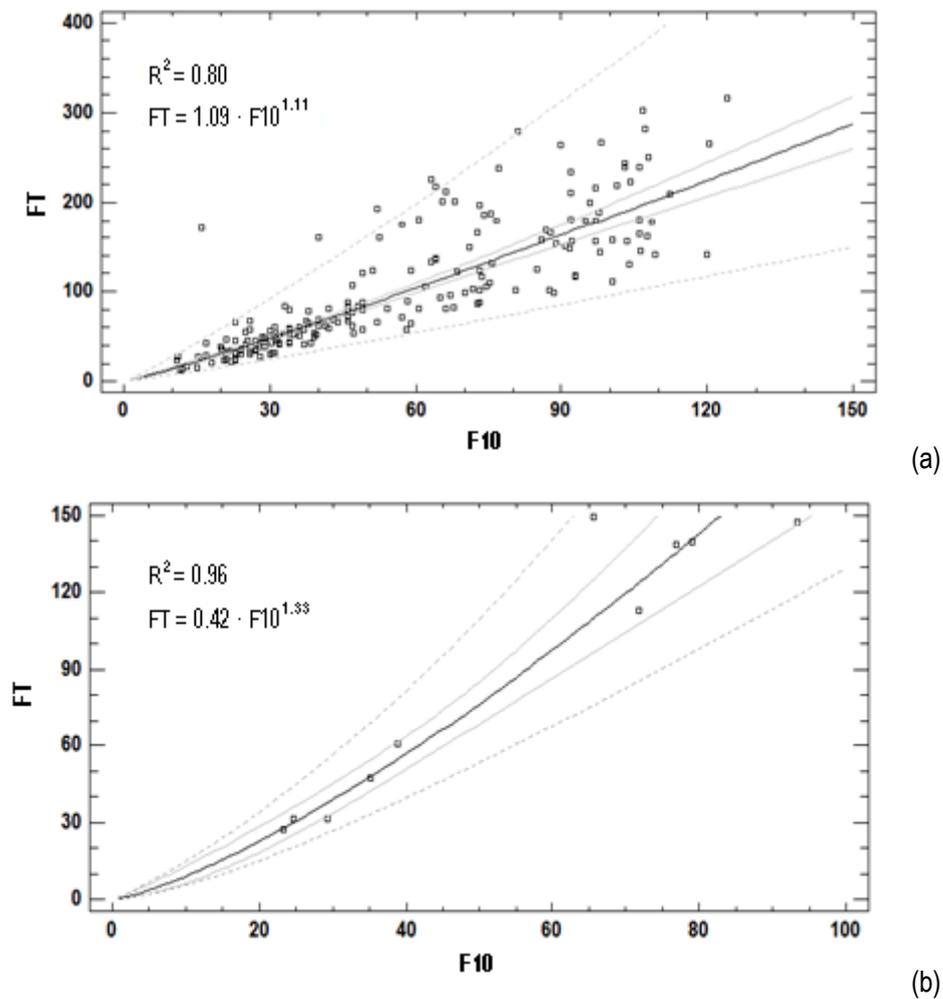


**Figura 3.2.** Fecundidad específica ( $M_x$ , por clases de edad) para poblaciones seleccionadas y sin seleccionar de *Orius laevigatus* alimentadas con dos dietas diferentes: huevos de *Ephestia kuehniella* (a) y una mezcla comercial de polen (b).

**Tabla 3.4.** Parámetros de tabla de vida [tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ), tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ), tiempo medio de generación ( $T$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $D$ )] para poblaciones seleccionadas y sin seleccionar de *Orius laevigatus* alimentadas con dos dietas diferentes.

Dieta	Población	$r_m$	$R_0$	$\lambda$	$T$ (días)	$D$ (días)
Huevos de <i>Ephestia kuehniella</i>	1POL-13	0.166 ± 0.003 e	44.21	1.18	22.86	4.18
	2POL-11	0.157 ± 0.002 d	55.79	1.17	25.59	4.41
	Aclimatada	0.147 ± 0.003 d	42.39	1.16	25.47	4.71
	Agrobio	0.155 ± 0.002 d	49.25	1.17	25.17	4.48
	Vesubio	0.110 ± 0.004 c	21.82	1.12	28.06	6.31
Polen	1POL-13	0.066 ± 0.002 b	6.30	1.07	28.10	10.58
	2POL-11	0.073 ± 0.002 b	8.49	1.08	29.48	9.56
	Aclimatada	0.003 ± 0.005 a	1.12	1.00	44.01	263.55
	Agrobio	0.010 ± 0.007 a	1.26	1.01	23.37	69.38
	Vesubio	0.007 ± 0.003 a	1.26	1.01	33.46	98.88

Medias ( $\pm$  error estándar) seguidas de la misma letra en una misma columna (entre poblaciones) no son diferentes significativamente (ANOVA seguido de test HDS de Tukey,  $p > 0.05$ ).



**Figura. 3.3.** Prueba de regresión entre la fecundidad total durante toda la vida de la hembra ( $FT$ ) y la fecundidad durante los diez primeros días desde la emergencia ( $F10$ ), usando datos de hembras individuales (a) o los valores medios de cada población (b). Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%.

## Discusión

La dependencia de la densidad de presas por parte de los enemigos naturales se ha señalado como uno de los retos más importantes a los que se enfrenta el control biológico aumentativo en los cultivos protegidos (Bielza *et al* 2020). De hecho, la presencia continua de la plaga en el cultivo repercute directamente en el funcionamiento eficaz de los agentes de control biológico (ACBs), ya que precisan de un aporte constante de alimento. En este sentido, el éxito de un depredador omnívoro como ACB depende de su habilidad para desarrollarse y reproducirse alimentándose de un rango más amplio de recursos alimenticios, principalmente los proporcionados por las plantas, como es el caso del polen, especialmente en condiciones de reducción de los niveles de presas (Symondson *et al* 2002, Lundgren 2009). Sin embargo, muchos depredadores experimentan una reducción considerable en su rendimiento cuando se alimentan de algún recurso diferente a sus presas principales, como ocurre en el caso de *O. laevigatus* (Cocuzza *et al* 1997, Oveja *et al* 2012). Así las cosas, el presente trabajo demuestra que es posible mejorar genéticamente a los depredadores para optimizar el aprovechamiento que hacen de una dieta subóptima. Nuestros

hallazgos tienen una relevancia especial para la práctica del control biológico, ya que se espera que las poblaciones seleccionadas mejoren su establecimiento y su persistencia en el cultivo, respondiendo mejor a la alimentación con polen, ya sea éste proporcionado por la propia planta o bien suplementado de forma artificial. Por otra parte, se sabe que explorar la variabilidad genética natural de una especie resulta fundamental para lograr la mejora de ésta como ACB (Lommen *et al* 2017, Kruitwagen *et al* 2018, Bielza *et al* 2020). Pues bien, a partir de los ensayos que se detallan en este capítulo se ha encontrado una variabilidad significativa en la fecundidad de las poblaciones comerciales y silvestres de *O. laevigatus* de partida cuando las hembras se alimentaron tanto de una dieta rica como de una pobre. Sin ir más lejos, en estudios recientes ya se pudo constatar la existencia de una amplia variabilidad en el balance hacia la zoofagia o la fitofagia entre individuos de otras especies de heterópteros depredadores (Dumont *et al* 2016, 2017, 2019). Ciertos trabajos anteriores en los que se evaluaba la capacidad reproductiva de *Orius* no solo con una dieta a base de polen sino también mediante huevos de *Ephestia* y muchas otras dietas óptimas y subóptimas (Cocuzza *et al* 1997, Tommasini *et al* 2004, Bonte y de Clercq 2008, Calixto *et al* 2013), se basaban en la evaluación de una única población, sin tener en cuenta la potencial variabilidad natural del rasgo en cuestión. En este sentido, nuestros resultados nacen de un estudio único y muy exhaustivo acerca de la variabilidad genética de la capacidad reproductiva de *O. laevigatus* cuando se alimenta con una dieta óptima y con otra nutricionalmente más deficitaria. Hasta donde sabemos, sólo un trabajo previo a éste informó de un estudio tan extenso acerca de la variabilidad natural en esta especie, aunque en ese caso versaba sobre la resistencia a insecticidas (Balanza *et al* 2019).

Por otra parte, en nuestros ensayos se observó una disminución media del 67% en la fecundidad temprana en la dieta basada en polen con respecto a la de huevos de *Ephestia*. Estos resultados para *O. laevigatus* son acordes a los obtenidos para ésta y otras especies de *Orius* reproducidas con una mezcla comercial de polen en condiciones similares (esto es,  $25 \pm 1$  °C y fotoperiodo 16:8 L: O): para una población comercial de *O. laevigatus* (Koppert), con un 60% de disminución en la fecundidad total (Cocuzza *et al* 1997); para una población silvestre de *O. laevigatus* (recolectada en Cabrils, España), con un 60% de disminución (Oveja *et al* 2012); para una línea comercial de *O. insidiosus* Say, con una disminución superior al 75% en la fecundidad diaria media (Bernardo *et al* 2017); para dos líneas recolectadas en el sur de África de *O. thripoborus* Hesse y *O. naivashae* Poppius, con una reducción de la fecundidad total del 54 y el 74%, respectivamente (Bonte *et al* 2012); o para una población silvestre de *O. tantillus* Motschulsky (recolectada en Bangalore, India), cuyas hembras no fueron capaces de poner huevos cuando se les alimentó con polen de maíz (Venkatesan *et al* 2008). En este contexto, es importante señalar que, aunque el polen es una fuente importante de nutrientes vegetales, la reducción de la fecundidad de *Orius* cuando se alimenta de él podría deberse a su escaso valor nutricional, en particular en lo que respecta al contenido en proteínas, lípidos y determinados minerales, así como a sus propiedades defensivas (Lundgren 2009), en comparación con los huevos de *Ephestia* (Montoro *et al* 2020). En cualquier caso, nuestros resultados revelan que la aptitud ante diferentes dietas no es un rasgo fijo dentro de una especie, existiendo una importante variabilidad intraespecífica. En general, el presente trabajo pone de manifiesto la importancia de estudiar varias poblaciones para poder examinar de manera precisa y veraz cualquier característica de una especie determinada (Balanza *et al* 2019). En nuestro caso, la fecundidad varió entre 51.2 y 105.1 huevos/hembra en una alimentación con presas y entre 14.2 y 34.9 con polen según la población, denotando una enorme variabilidad intraespecífica en *O. laevigatus* para este carácter independientemente de la dieta.

Como hemos visto, las poblaciones comerciales resultaron ser más fecundas que las silvestres al alimentarse tanto de polen como de presas. En ese sentido, es razonable que las poblaciones comerciales se adapten a los huevos de *Ephestia* como recurso alimenticio después de muchas

generaciones de estar siendo criadas masivamente con este alimento de alto valor nutricional. Es más, poner el acento en el volumen de producción suele provocar una pérdida de variabilidad debido a la dominancia de los individuos mejor adaptados a las condiciones de cría artificial sobre los demás, lo que provoca la pérdida de algunos alelos (Nunney *et al* 2002, Rasmussen *et al* 2018). En definitiva, esta adaptación se ha relacionado con una pérdida de variabilidad genética, haciendo que los insectos criados en condiciones controladas sean menos competitivos que los silvestres (Parra 2008). Sorprendentemente, las poblaciones comerciales de nuestros estudios mostraron un rendimiento también superior al consumir la mezcla de polen a pesar de no haber estado expuestas a este alimento durante muchas generaciones, a diferencia de las poblaciones silvestres. Estos resultados podrían sugerir que la selección para una fecundidad más alta presenta una elevada persistencia en el tiempo independientemente del valor nutricional de la dieta suministrada. Si bien no existen en la literatura estudios previos sobre la variabilidad intraespecífica de la fecundidad en alguna especie de *Orius* con diferentes dietas, la variabilidad interespecífica dentro del género hace pensar en la posibilidad de que exista cierta divergencia en la fecundidad independientemente de la dieta. Así, Bonte *et al* (2012) encontraron una fecundidad mayor en *O. thripoborus* que en *O. naivashae* en todas las dietas ensayadas, concretamente con huevos de *Ephestia*, polen y quistes de *Artemia*. En un trabajo anterior, *O. laevigatus* ponía más huevos que *O. albidipennis* alimentándose con huevos de *Ephestia*, con polen o con una mezcla de ambas dietas (Cocuzza *et al* 1997). En la misma línea, el rango en fecundidad  $O. majusculus > O. insidiosus > O. laevigatus > O. niger$  se mantuvo para dos presas diferentes, huevos de *Ephestia* y adultos de *F. occidentalis* (Tommasini *et al* 2004).

En otro orden de cosas, la fecundidad más baja en las poblaciones silvestres con una dieta basada en polen podría explicarse también por su alimentación con huevos de *Ephestia* durante 2 a 5 generaciones previo al inicio de los bioensayos. Esta breve exposición podría haber provocado cierta adaptación a la dieta óptima que, aunque no lograda del todo, sí habría hecho que perdiesen cierta habilidad a la hora de explotar el polen como alimento. Como prueba de este extremo, Castañé *et al* (2014) ya observaron una reducción en la aptitud reproductiva de una serie de poblaciones silvestres de *O. laevigatus* después de las primeras generaciones de adaptación a la cría en cautividad.

Del mismo modo, el conjunto de poblaciones que dio lugar a la línea base 1POL mostró una fecundidad media más elevada que las que fundaron la línea 2POL, tanto sobre presas como sobre polen. Paradójicamente, la línea final seleccionada 1POL-13 mostró un rendimiento reproductivo inferior a 2POL-11. Esto refuerza la validez de nuestro enfoque de cría selectiva, consistente en seleccionar las mejores hembras sobre el polen de cada población evaluada, en lugar de elegir sólo las poblaciones con mayor fecundidad sobre el polen. En este último caso, podríamos haber seleccionado el 20% de poblaciones con mejor rendimiento en la dieta con polen ( $> 27.5$  huevos / hembra), todas pertenecientes al grupo 1POL. En lugar de ello, hemos preferido empezar con un acervo genético más amplio, asumiendo la tolerancia al polen como un carácter poligénico y, por tanto, como un rasgo multifactorial, y permitiendo así que los posibles rasgos enmascarados se expresen a lo largo del proceso de cría. Es probable que éste sea el origen de la mayor aptitud reproductiva en polen tanto de 1POL-13 como sobre todo de 2POL-11, no sólo en términos de fecundidad sino también en cuanto a longevidad o a los parámetros de la tabla de vida evaluados. Balanza *et al* (2019) llevaron a cabo un programa de cría similar, con el objetivo de conseguir líneas de *O. laevigatus* resistentes a imidacloprid y tiametoxam, sobre la base de una amplia variabilidad intraespecífica. Su extraordinario éxito también refuerza nuestros resultados, y nos anima a explorar y explotar la variabilidad de nuevas características tanto en éste como en otros ACBs.

En general, el rendimiento reproductivo de las razas mejoradas 1POL-13 y 2POL-11 fue superior al del resto de poblaciones sometidas a estrés nutricional, como se refleja en los valores significativamente más altos para la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ) (0.07 frente a 0.003 - 0.01) y para la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) (6.3 - 8.5 frente a 1.1 - 1.3). Este potencial biótico superior se debió principalmente a una mayor supervivencia de los juveniles, así como a una fecundidad total superior. De hecho, cuando se alimentó a las ninfas exclusivamente con polen, sólo unos pocos individuos de las poblaciones de referencia fueron capaces de completar el ciclo, mientras que más de una cuarta parte de 1POL-13 y 2POL-11 alcanzaron la edad adulta. Vacante *et al* (1997) informaron de resultados aún peores en una población comercial de *O. laevigatus* con una mezcla de polen similar a la nuestra como dieta, con sólo el 18% de las ninfas alcanzando el tercer estadio ninfal y ninguna de ellas completando el ciclo. Sin embargo, cuando utilizaban polen de pimienta como alimento, la tasa de supervivencia subía hasta el 65%, con tiempos de desarrollo totales similares a los nuestros (17.6 días). Por el contrario, Bonte y de Clercq (2011) encontraron un 33.9% de supervivencia cuando utilizaron polen de abeja húmedo y congelado como dieta en sus experimentos, aunque se observaron tiempos de desarrollo totales similares a los nuestros (casi 19 días). Así pues, es probable que nuestras cepas seleccionadas rindan aún más si se alimentan con un polen de mayor calidad, como puede ser el polen fresco de pimienta, lo cual se aproximaría más a su rendimiento en campo.

Otro rasgo reproductivo claramente superior en nuestras poblaciones tolerantes al polen es, como hemos visto, la fecundidad. En concreto, la fecundidad temprana ( $F_{10}$ ) fue mayor para las cepas seleccionadas 1POL-13 y 2POL-11 en comparación con las poblaciones de referencia (Tabla 3.3) y también con las poblaciones silvestres de partida (Tabla 3.1). Sin embargo, fue para la fecundidad durante toda la vida para la que se obtuvo una ganancia genética superior, siendo el número de huevos puestos por las hembras de la línea 2POL-11 el doble que el de las hembras de la línea aclimatada, de la población comercial y de la silvestre (Tabla 3.1). Tal es así que, después de los primeros 10 días, las poblaciones de referencia apenas seguían poniendo huevos (6 más, como máximo), mientras que las líneas mejoradas producían entre 12 y 22 huevos adicionales por hembra. Este patrón de oviposición sostenido (Figura 3.2b) confirma la capacidad superior de nuestras poblaciones seleccionadas para explotar el polen como recurso nutritivo, más que ser consecuencia de una alimentación optimizada antes de alcanzar la fase adulta, ya que las ninfas fueron alimentadas con una dieta restringida, consistente en una mezcla de polen y huevos de *Ephestia*, hasta completar el ciclo. Las especies de *Orius* son consideradas, como vimos en el capítulo 2, *income breeders* más que *capital breeders*, ya que tienden a explotar los recursos alimenticios de los que disponen en el momento y los utilizan para reproducirse, en lugar de almacenarlos durante los estadios juveniles para utilizarlos en etapas futuras (Davis *et al* 2016, Mendoza *et al* 2020). Es más, cabe esperar, más bien, en este insecto un efecto residual de una nutrición más rica durante las etapas juveniles sobre la reproducción temprana. Por lo tanto, su fecundidad superior a lo largo de la vida adulta es el mejor indicador de la capacidad de nuestras líneas mejoradas genéticamente para rendir mejor con una dieta pobre como el polen.

La longevidad con una dieta basada en polen también fue mayor en nuestras razas tolerantes al polen, que vivieron entre 5 y 10 días más que las poblaciones de referencia. La teoría del envejecimiento (en inglés, *theory of ageing*) sugiere que los organismos maximizan su rendimiento balanceando de forma óptima sus limitados recursos energéticos entre reproducción (fecundidad) y supervivencia o mantenimiento en el tiempo (longevidad) (Kirkwood y Rose 1991, Hughes y Reynolds 2005). Sin embargo, nuestras líneas seleccionadas no necesitaron contrarrestar con una menor reproducción su aumento en longevidad bajo estrés nutritivo, razón por la que sus patrones de senescencia (disminución de la tasa de supervivencia con la edad) y reproductivos (disminución de la oviposición con la edad) están por encima de los exhibidos por las poblaciones de referencia.

En otras palabras, su fecundidad más elevada no se produce a expensas de una longevidad más corta, lo que refuerza la hipótesis de una mayor capacidad de explotación de un recurso nutricional deficitario. Además, una mayor longevidad es muy importante para su desempeño como ACBs. Y es que, cuanto más tiempo sobreviva el depredador a base de polen, más posibilidades tendrá de encontrar a sus presas y, en definitiva, mayor será la tasa de depredación. Este aumento en la tasa de supervivencia con la edad también puede apreciarse en el mayor porcentaje de hembras vivas después de 20 días desde la emergencia del adulto. De hecho, después de este tiempo sobrevivieron significativamente más hembras de las dos variedades tolerantes al polen (58 y 84% para 1POL-13 y 2POL-11, respectivamente) que de las demás poblaciones (33%) (Tabla 3.3).

Además, nuestras cepas seleccionadas mostraron un tamaño corporal similar (1POL-13) o incluso superior (2POL-11) en comparación con las poblaciones de referencia cuando se alimentaron de polen. Esto es algo muy importante, ya que, como ya vimos en el capítulo anterior (Capítulo 2), un mayor tamaño corporal puede afectar de manera sustancial a las características biológicas y ecológicas de un depredador. De hecho, nuestra población mejorada de *O. laevigatus* para un tamaño corporal más grande, BIG30, mostró una fecundidad más alta con un alimento superior nutricionalmente (huevos de *Ephestia*), así como una fecundidad y una longevidad más elevadas con un alimento nutricionalmente inferior como es el polen de abeja, todo ello en comparación con poblaciones sin seleccionar y comerciales (Mendoza *et al* 2020). Por otro lado, se sabe que un tamaño mayor puede incrementar la capacidad depredadora de ácaros e insectos depredadores, mejorando su rendimiento como ACB (Vangansbeke *et al* 2019).

Es importante destacar que la población aclimatada mostró un rendimiento inferior al de las cepas seleccionadas al alimentarse de polen, lo que apunta a que la ganancia genética alcanzada en nuestras líneas seleccionadas se debió al proceso de selección y no a la plasticidad fenotípica natural de *O. laevigatus* para tolerar la restricción nutricional. No en vano, esta línea aclimatada se sometió a una nutrición restringida durante unas 50 generaciones, la misma dieta que recibieron las líneas seleccionadas, y contaba con unos antecedentes genéticos iniciales equivalentes. Y sin embargo, pese a sufrir condiciones nutricionales estresantes durante muchas generaciones, la población aclimatada presentó valores similares a los de las poblaciones comerciales y silvestres para los parámetros del ciclo vital como son el tiempo de desarrollo y la supervivencia de las ninfas (Tabla 3.2), la longevidad y la fecundidad (Tabla 3.3), así como para los parámetros generales de la tabla de vida (Tabla 3.4). Por lo tanto, no se observó ningún proceso de aclimatación en esta línea sin seleccionar, lo cual implica que tampoco ocurrió así en el caso de las líneas mejoradas.

En condiciones nutricionales óptimas, es decir, alimentándose con huevos de *Ephestia*, el tiempo de desarrollo fue ligeramente mayor en las poblaciones seleccionadas que en las poblaciones aclimatadas y comerciales, pero a cambio la supervivencia fue también similar o superior (Tabla 3.2). Las pequeñas diferencias en la longevidad y en la fecundidad a lo largo de toda la vida no explicaron las diferencias significativas observadas entre las poblaciones (Tabla 3.3). Sin embargo, el rendimiento general, medido como la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ) o como la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), indica una aptitud superior por parte de las razas tolerantes al polen incluso alimentándose de presas (Tabla 3.4). Además, las líneas seleccionadas mostraron una fecundidad temprana también superior, lo que puede ser muy beneficioso tanto para el rendimiento en campo como para su cría en masa. En primer lugar, la elevada reproducción temprana poco después de la liberación del depredador en el cultivo podría contribuir a un establecimiento anticipado y a un control preventivo más eficaz de la plaga. Por otra parte, esta oviposición precoz puede asegurar la reproducción y reducir el riesgo de eventuales factores adversos, como son las condiciones ambientales extremas (temperaturas altas, baja humedad) o las aplicaciones de plaguicidas, las cuales representan una amenaza para su supervivencia. Además, la reproducción anticipada es,

como decimos, un rasgo deseable para la producción en masa de un enemigo natural. En este sentido, se puede aumentar la productividad y por lo tanto reducir los costes si las hembras, en su época reproductiva, se mantienen durante periodos de tiempo más cortos pero produciendo un mayor número de huevos.

Cabe destacar que el aumento de la fecundidad temprana observado tanto en la dieta rica como en la pobre fue el resultado de una selección colateral a nuestro proceso de selección. En la figura 3.2 se pudo ver que el pico de oviposición fue más alto y ocurrió antes en las líneas seleccionadas 1POL-13 y 2POL-11 que en las poblaciones de referencia, independientemente de la dieta. En este sentido, la selección estuvo orientada a aumentar la tolerancia al polen, y se llevó a cabo eligiendo a las hembras con mayor fecundidad con este alimento, utilizando la fecundidad durante los primeros 10 días simplemente para facilitar el proceso, al acortar el tiempo de evaluación de la capacidad reproductiva. Como se ha mencionado anteriormente, la selección consiguió, por un lado, incrementar significativamente los parámetros relativos al ciclo vital con una dieta subóptima, pero al mismo tiempo también mejoró la reproducción temprana con ambas dietas, lo cual es un rasgo muy interesante para cualquier agente de control biológico, como ya se ha discutido.

Cabe la posibilidad de que la adaptación a un alimento diferente a su presa conlleve cierto coste ecológico que afecte negativamente a la adaptación al alimento presa (Bielza *et al* 2020). De acuerdo con Dumont *et al* (2017), existe una variabilidad intraespecífica en el equilibrio en la preferencia por una dieta de origen animal o de origen vegetal en los depredadores zoofitófagos. Así, algunos individuos o poblaciones pueden especializarse en el consumo de presas, mientras que otros lo hacen en el consumo de algún recurso vegetal. Por ejemplo, en el depredador zoofitófago *C. verbasci*, se seleccionó una variedad poco zoófaga que se alimentaba sobre todo de material vegetal, en concreto a partir de polen, mientras que otra variedad más zoófaga prefería a su presa como recurso alimenticio (Dumont *et al* 2019). En consecuencia, la cepa especializada para una mayor fitofagia era menos eficaz en el control de las poblaciones de la plaga que la cepa más zoófaga (Dumont *et al* 2019). En el presente estudio, por el contrario, las líneas tolerantes al polen 1POL-13 y 2POL-11 se comportan de forma similar o incluso con un rendimiento superior a las poblaciones sin seleccionar cuando se alimentan de presa, en este caso huevos de *Ephestia*. Análogamente, Bonte y de Clercq (2010) tampoco observaron ningún impacto en la tasa de depredación del trips *F. occidentalis* en sus poblaciones de *O. laevigatus* criadas con polen. Estos resultados son alentadores en el sentido de que incrementan las posibilidades de que nuestras poblaciones tolerantes al polen mantengan su rendimiento elevado al alimentarse de su principal presa, el trips de las flores. No obstante, es necesario seguir investigando al respecto para saber si las poblaciones seleccionadas mantienen intacta su capacidad depredadora y, por lo tanto, sus características como ACB.

En resumen, gracias a este trabajo ha sido posible hallar una variabilidad significativa en la fecundidad entre las poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus* tanto en presencia de una dieta rica como bajo un alimento más pobre, subrayando así la importancia de tener en cuenta la variabilidad natural a la hora de evaluar cualquier atributo de una especie. Además, esta divergencia intraespecífica reveló un potencial de selección hacia una mayor capacidad para nutrirse a partir de cualquier recurso de origen animal o vegetal, equilibrando la zoofitofagia. Así, sobre la base de esta variabilidad, se inició la selección de dos líneas que, en última instancia, darían lugar a las razas seleccionadas 1POL-13 y 2POL-11. Ambas mostraron una mayor aptitud reproductiva al alimentarse de polen en comparación con las poblaciones silvestres y comerciales, sin que eso conlleve coste ecológico alguno en la alimentación con presa, al mostrar valores similares o incluso superiores a las poblaciones de referencia en sus parámetros del ciclo vital en presencia de un alimento presa. Por último, se pudo demostrar que esta mejora se debió a la

ganancia genética adquirida durante el proceso y no a la plasticidad fenotípica de la propia especie para tolerar la restricción nutricional.

No hay duda de que la capacidad superior de nuestras líneas seleccionadas para aprovechar mejor una dieta subóptima como el polen contribuirá a aumentar su rendimiento en campo como agente de control biológico, mejorando así su resiliencia en condiciones de escasez de presas, especialmente en cultivos con baja cantidad o calidad de polen. Además, como veremos en el capítulo 6 de esta tesis, es de esperar que estas líneas seleccionadas respondan mejor a la alimentación suplementaria en el cultivo, la cual suele consistir en algún recurso de inferior valor nutritivo como es el polen. Adicionalmente, los productores podrían reducir los costes de la cría de este insecto a gran escala en las biofábricas complementando su dieta habitual basada en huevos de *Ephestia* con polen, una fuente de alimento mucho más barata incluso que la *Artemia*.

Las investigaciones adicionales que se están llevando a cabo tanto con nuestras poblaciones seleccionadas para una mayor tolerancia al polen como para las no seleccionadas acerca de las tasas de depredación o la respuesta funcional, que comentaremos en el capítulo 5, así como sobre la tolerancia al hambre o al frío o su adaptación a otras formas de alimentación subóptima, nos permitirán dilucidar las contribuciones potenciales de nuestras líneas tolerantes al polen de cara a mejorar el control biológico del trips de las flores.

Independientemente de todo ello, la selección artificial está llamada a desempeñar un papel fundamental en la mejora del rendimiento de los ACBs. De hecho, aunque la mejora genética no se ha explotado plenamente aún en el ámbito de la Entomología Aplicada, se espera que la integración de enfoques genéticos y genómicos permita desarrollar programas de mejora más eficaces (Leung *et al* 2020). En este sentido, se han propuesto una serie de rasgos para mejorar la eficacia y la solidez de los programas de control biológico y desencadenar una adopción a mayor escala de los mismos, especialmente en sistemas y cultivos en los que su aplicación es más problemática (Bielza *et al* 2020).

## Referencias

Aragón-Sánchez M, Román-Fernández LR, Martínez-García H, Aragón-García A, Pérez-Moreno I, Marco-Mancebón VS. 2018. Rate of consumption, biological parameters, and population growth capacity of *Orius laevigatus* fed on *Spodoptera exigua*. *Biocontrol* 63: 785-794. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9906-4>.

Arijs Y, de Clercq P. 2004. Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *Biocontrol* 49: 505–516. <https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000036440.02590.fa>.

Balanza V, Mendoza JE, Bielza P. 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomol Exp Appl* 167: 626-635. <https://doi.org/10.1111/eea.12813>.

Bernardo AMG, de Oliveira CM, Oliveira RA, Vacacela HE, Venzon M, Pallini A, Janssen A. 2017. Performance of *Orius insidiosus* on alternative foods. *J Appl Entomol* 141: 702-707. <https://doi.org/10.1111/jen.12390>.

Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>.

- Biondi A, Zappalà L, di Mauro A, Garzia GT, Russo A, Desneux N, Siscaro G. 2016. Can alternative host plant and prey affect phytophagy and biological control by the zoophytophagous mired *Nesidiocoris tenuis*? *Biocontrol* 61: 79-90. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9700-5>.
- Bonte M, de Clercq P. 2008. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J Econ Entomol* 101: 1127-1133. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[1127:DARFOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[1127:DARFOO]2.0.CO;2).
- Bonte M, de Clercq P. 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol* 55: 625-629. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9275-0>.
- Bonte M, de Clercq P. 2011. Influence of predator density, diet and living substrate on developmental fitness of *Orius laevigatus*. *J Appl Entomol* 135: 343-350. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01554.x>.
- Bonte J, Vangansbeke D, Maes S, Bonte M, Conlong D, de Clercq P. 2012. Moisture source and diet affect development and reproduction of *Orius thripoborus* and *Orius naivashae*, two predatory anthocorids from Southern Africa. *J Insect Sci* 12: 1. <https://doi.org/10.1673/031.012.0101>.
- Brenard N, Sluydts V, Christianen E, Bosmans L, de Bruyn L, Moerkens R, Leirs H. 2019. Biweekly supplementation with *Artemia* spp. cysts allows efficient population establishment by *Macrolophus pygmaeus* in sweet pepper. *Entomol Experim Appl* 167: 406-414. <https://doi.org/10.1111/eea.12776>.
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. 2012a. Biological control based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci Technol* 22: 1398-1416. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494>.
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. 2012b. Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. *Biocontrol* 57: 809-817. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9455-1>.
- Calixto A, Bueno V, Montes F, Silva A, van Lenteren J. 2013. Effect of different diets on reproduction, longevity and predation capacity of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Biocontrol Sci Technol* 23: 1245-1255. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822850>.
- Castañé C, Bueno VH, Carvalho LM, van Lenteren JC. 2014. Effects of founder population size on the performance of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) colonies. *Biol Control* 69: 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.11.009>.
- Cocuzza GE, De Clercq P, van de Veire M, de Cock A, Degheele D, Vacante V. 1997. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomol Exp Appl* 82(1): 101-104. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00118.x>.
- Davis RB, Javoiš J, Kaasik A, Ōunap E, Tammaru T. 2016. An ordination of life histories using morphological proxies: capital versus income breeding in insects. *Ecology* 97: 2112-2124. <https://doi.org/10.1002/ecy.1435>.
- Dumont F, Aubry O, Lucas E. 2018. From evolutionary aspects of zoophytophagy to biological control. *Front Ecol Evol* 6: 221. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00221>.

- Dumont F, Lucas E, Reale D. 2016. Evidence of genetic basis of zoophagy and nymphal developmental time in isogroup lines of the zoophytophagous mullein bug, *Campylomma verbasci*. *Biocontrol* 61: 425-435. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9721-8>.
- Dumont F, Lucas E, Reale D. 2017. Coexistence of zoophytophagous and phytozoophagous strategies linked to genotypic diet specialization in plant bug. *PLoS ONE* 12: e0176369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176369>.
- Dumont F, Reale D, Lucas E. 2019. Can isogroup selection of highly zoophagous lines of a zoophytophagous bug improve biocontrol of spider mites in apple orchards? *Insects* 10: 303. <https://doi.org/10.3390/insects10090303>.
- Hughes KA, Reynolds RM. 2005. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol* 50: 421-445. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130409>.
- Ingegno BL, Pansa MG, Tavella L. 2011. Plant preference in the zoophytophagous generalist predator *Macrolophus pygmaeus* (Heteroptera: Miridae). *Biol Control* 58: 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.003>
- Janssen A, Sabelis MW. 2015. Alternative food and biological control by generalist predatory mites: the case of *Amblyseius swirskii*. *Exp Appl Acarol* 65: 413-418. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9901-8>.
- Kirkwood TB, Rose MR. 1991. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos T Roy Soc B* 332 (1262): 15-24. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0028>.
- Kruitwagen A, Beukeboom LW, Wertheim B. 2018. Optimization of native biocontrol agents, with parasitoids of the invasive pest *Drosophila suzukii* as an example. *Evol Appl* 11: 1473-1497. <https://doi.org/10.1111/eva.12648>.
- Leman A, Messelink GJ. 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experi Appli Acar* 65: 511-524. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9859-y>.
- Leung K, Ras E, Ferguson K, Ariëns S, Babendreier D, Bijma P, Bourtzis K, Brodeur J, Bruins M, Centurión A, Chattington S, Chinchilla-Ramírez M, Dicke M, Fatouros N, González-Cabrera J, Groot T, Haye T, Knapp M, Koskinioti P, Le Hesran S, Lirakis M, Paspati A, Pérez-Hedo M, Plouvier W, Schlotterer C, Stahl J, Thiel A, Urbaneja A, van de Zande L, Verhulst E, Vet L, Visser S, Werren J, Xia S, Zwaan B, Magalhães S, Beukeboom L, Pannebakker B. 2020. Next Generation Biological Control: The Need for Integrating Genetics and Evolution. *Preprints 2019: 2019110300*. <https://doi.org/10.20944/preprints201911.0300.v1>.
- Lommen ST, Jong PW, Pannebakker BA. 2017. It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control-a review. *Entomol Exp Appl* 162 (2): 108-123. <https://doi.org/10.1111/eea.12510>.
- Lundgren JG. 2009. Relationships of natural enemies and non-prey foods progress in biological control. *Springer Science, Dordrecht*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9235-0>.

- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biol Control* 148: 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>.
- Messelink GJ, Bennison J, Alomar O, Ingegno BL, Tavella L, Shipp L, Palevsky E, Wäckers FL. 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *Biocontrol* 59: 377-393. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9579-6>.
- Montoro M, de Clercq P, Overgaard J, Sigsgaard L. 2020. Fitness consequences of artificial diets with different macronutrient composition for the predatory bug *Orius majusculus*. *Entomol Exp Appl*. <https://doi.org/10.1111/eea.12881>.
- Nunney L, Leppla NC, Bloem KA, Luck RF. 2002. The population genetics of mass-rearing. En: Quality control for mass-reared arthropods. Proceedings of the eighth and ninth workshops of the IOBC working group on quality control of mass-reared arthropods, 9-12 Oct 1995, Santa Barbara, CA and 2-4 Mar 1998, Cali, Colombia, pp 43-49.
- Oveja MF, Arnó J, Gabarra R. 2012. Effect of supplemental food on the fitness of four omnivorous predator species. *IOBC/WPRS Bull* 80: 97-101.
- Oveja MF, Riudavets J, Arnó J, Gabarra R. 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *Biocontrol* 61: 47-56. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9690-3>.
- Parra JRP. 2008. Mass rearing of natural enemies. En: Capinera JL (Ed), *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6>.
- Rasmussen LB, Jensen K, Sørensen JG, Sverrisdóttir E, Nielsen KL, Overgaard J, Holmstrup M, Kristensen TN. 2018. Are commercial stocks of biological control agents genetically depauperate? A case study on the pirate bug *Orius majusculus* Reuter. *Biol Control* 127: 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.016>.
- Richards PC, Schmidt JM. 1996. The effects of selected dietary supplements on survival and reproduction of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Can Entomol* 128: 171-176. <https://doi.org/10.4039/Ent128171-2>.
- Sánchez JA, Alcázar A, Lacasa A, Llamas A, Bielza P. 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. *IOBC/WPRS Bull* 23: 21-30.
- Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annu Rev Entomol* 47: 561-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>.
- Taberner A, Castañera P, Silvestre E, Bopazo J. 1993. Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. *Comput Appl Biosci* 9: 535-540. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/9.5.535>.
- Tommasini MG, van Lenteren JC, Burgio G. 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. *Bull Insectol* 57: 79-93.

- Urbaneja A, Tapia G, Stansly P. 2005. Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae). *Biocontrol Sci Tech* 15: 513-518. <https://doi.org/10.1080/09583150500088777>.
- Urbaneja-Bernat P, Alonso M, Tena A, Bolckmans K, Urbaneja A. 2013. Sugar as nutritional supplement for the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *Biocontrol* 58: 57-64. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9466-y>.
- Urbaneja-Bernat P, Mollá O, Alonso M, Bolckmans K, Urbaneja A, Tena A. 2014. Sugars as complementary alternative food for the establishment of *Nesidiocoris tenuis* in greenhouse tomato. *J Appl Entomol* 139: 161-167. <https://doi.org/10.1111/jen.12151>.
- Vacante V, Cocuzza GE, De Clercq P, Van de Veire M, Tirry L. 1997. Development and survival of *Orius albidipennis* and *O. laevigatus* (Het.: Anthocoridae) on various diets. *Entomophaga* 42: 493. <https://doi.org/10.1007/BF02769809>.
- van Lenteren JC. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *Biocontrol* 57 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>.
- van Lenteren JC, Alomar O, Ravensberg WJ, Urbaneja A. 2020. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. En: Gullino ML, Albajes R, Nicot PC (eds), *Integrated pest and disease management in greenhouse crops, plant pathology in the 21<sup>st</sup> Century* 9. Springer International Publishing, Cham, pp 409-439. <https://doi.org/10.1007/0-306-47585-5>.
- Vandekerckhove B, de Clercq P. 2010. Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. *Biol Control* 53: 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.005>.
- Vangansbeke D, Duarte MV, Gobin B, Tirry L, Wäckers F, de Clercq P. 2019. Cold-born killers: exploiting temperature-size rule enhances predation capacity of a predatory mite. *Pest Manag Sci*. <https://doi.org/10.1002/ps.5713>.
- Venkatesan T, Jalali SK, Srinivasamurthy K, Bhaskaran TV. 2008. Development, survival and reproduction of an anthocorid predator (*Orius tantillus*) on artificial and natural diets. *Indian J Agr Sci* 78: 102-105.
- Yano E, Watanabe K, Yara K. 2002. Life history parameters of *Orius sauteri* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae) reared on *Ephestia kuehniella* eggs and the minimum amount of the diet for rearing individuals. *J Appl Entomol* 126: 389-394. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00598.x>.

## Respuesta funcional mejorada sobre larvas y adultos de *Frankliniella occidentalis* en una línea de *Orius laevigatus* seleccionada artificialmente para un tamaño más grande

Performance as biological control agents depends on several characteristics of the natural enemy species, which in turn may differ among strains within a species. Among those characteristics, body size has a key impact on most biological and ecological traits of a certain predator. We have recently reported the successful achievement of an *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) genetic line showing a significant larger body size. This large-sized strain exhibited superior reproductive fitness. However, continued selection towards a specific character might in turn result in trade-offs, such as reduced predation capacity, which may impair its control efficiency. Therefore, the predation capacity of our large-sized strain was tested prior its use in biological control programmes. On the other hand, a larger body size may expand the prey range, including larger species or prey life stages. Thus, our larger *O. laevigatus* strain might have a superior predation rate and range. To test that, functional responses at different densities of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) (adults and larvae) and *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (nymphs) were studied in our large-sized *O. laevigatus* strain in comparison with a commercial population. As a result, the predator's body size was significantly related to functional response parameters. The genetically improved strain with larger body size showed a markedly superior predation capacity, both on thrips larvae and especially on adult thrips, although not on aphids. Therefore, the larger body size of our selected strain may increase its effectiveness as biological control agent of thrips.

Como ya hemos visto, el control biológico aumentativo es una práctica habitual en muchos cultivos, especialmente en cultivos protegidos (Sánchez *et al* 2000). En ellos, diferentes enemigos naturales se liberan para controlar a las principales plagas, si bien son los depredadores generalistas los que desempeñan un papel más relevante. Entre estos depredadores, el género *Orius* Wolff (Hemiptera: Anthocoridae) se usa en todo el mundo, mientras que es la especie *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) la más utilizada en Europa y otros países de África y Asia, principalmente para controlar a las poblaciones de trips.

El rendimiento como agentes de control biológico (ACB) depende de diversas características de la especie en cuestión, las cuales, a su vez, pueden diferir entre las cepas de una misma especie. De todas ellas, en el Capítulo 2 hemos podido comprobar que el tamaño corporal tiene un impacto clave en la mayoría de los rasgos biológicos y ecológicos de cualquier especie (Kingsolver y Huey 2008, Chown y Gaston 2010). En el caso específico de un depredador, el tamaño desempeña un

papel importante en las relaciones entre depredador y presa (Kalinkat *et al* 2015), de manera que el rango de presas que un depredador es capaz de atacar está fuertemente relacionado con el tamaño corporal. En consecuencia, la relación entre el tamaño corporal de ambos contendientes se considera a menudo un buen indicador de la dinámica depredador-presa.

Esto justifica que se planteara esta tesis con el tamaño del cuerpo como uno de los principales rasgos a considerar en la mejora genética de los ACBs (Capítulo 2, Bielza *et al* 2020). Nuestro grupo de investigación viene desarrollando programas de cría selectiva para varios rasgos que son clave en el rendimiento en campo de *O. laevigatus*, como son la resistencia a insecticidas (Balanza *et al* 2019, 2021) o una mejor aptitud para alimentarse con una dieta alternativa (Capítulo 3, Mendoza *et al* 2020a). Además, en el Capítulo 2 de esta tesis (Mendoza *et al* 2020b) hemos informado de la obtención con éxito de una cepa con un tamaño corporal significativamente mayor. Cabe recordar que esta raza mostró una capacidad reproductiva superior (en longevidad y fecundidad) a la de las poblaciones silvestres y comerciales, tanto con una dieta nutricionalmente superior como los huevos de *Ephestia*, como con una dieta deficitaria como el polen de abeja.

Ahora bien, también se ha discutido con anterioridad la posibilidad de que la selección continuada de un carácter específico pueda provocar cambios perjudiciales en otros rasgos, lo que se conoce como coste ecológico o *trade-offs*. Un claro ejemplo de ello podría ser la reducción en la capacidad para interactuar con sus presas naturales, lo que podría mermar su eficacia en el control biológico. Es por eso que la capacidad de depredación de nuestra población de gran tamaño debe ser evaluada en este sentido como paso previo a su uso en programas de control biológico.

Por otro lado, un mayor tamaño corporal podría implicar una expansión del rango de presas objetivo por parte del depredador, incluyendo a especies más grandes o a diferentes estadios de vida de la presa. De este modo, una talla superior podría incrementar la capacidad destructiva de ácaros e insectos depredadores, mejorando su rendimiento en el ejercicio del control biológico (Vangansbeke *et al* 2019). Siguiendo esta línea, nuestra primera hipótesis planteó que nuestra versión de mayor tamaño de *O. laevigatus* podría contar con una tasa de depredación superior y un rango de presas más amplio, ya que está demostrado que un aumento en el tamaño medio de los depredadores se correlaciona con un incremento en el rango de tamaño óptimo de sus presas (Sabelis y van Rijn 1997, Woodward *et al* 2005), así como con una tasa de depredación per cápita superior (Emmerson y Raffaelli 2004). Además, Brose *et al* (2006) ya señalaron cómo el tamaño del depredador y el de la presa aumentan de manera conjunta.

El presente estudio consiste en evaluar si nuestra línea mejorada de *Orius* para un tamaño más grande muestra una capacidad de depredación mejorada, tanto en lo que respecta a la tasa de mortalidad como al rango de presas óptimas. Para comprobarlo, se estudió la respuesta funcional a diferentes densidades de dos presas alternativas en comparación con su presa principal, el segundo estadio del trips, utilizando como referencia una población comercial de *O. laevigatus*. Dado que el tamaño del cuerpo es un factor importante que determina las interacciones tróficas entre el depredador y su presa (Wilbur 1988), se espera que los parámetros de respuesta funcional (tasa de ataque y tiempo de manipulación de la presa) varíen en función de la relación de tamaño entre depredador y presa (Brose 2006), lo que nos permitirá dilucidar cuál es la capacidad depredadora potencial de nuestra línea mejorada de *O. laevigatus* como consecuencia de la ganancia genética adquirida durante el proceso de selección.

## Materiales y métodos

### Cría de insectos

La población de *O. laevigatus* seleccionada artificialmente para un mayor tamaño corporal, en adelante BIG30, se obtuvo mediante un elaborado programa de mejora genética que ya hemos detallado ampliamente en el Capítulo 2 (Mendoza *et al* 2020b). Como referencia, se utilizó una población comercial suministrada por Agrobio SL (Almería, España, ORIcontrol®, en adelante, Agrobio). Ambas poblaciones de depredadores se mantuvieron a base de huevos congelados *ad libitum* de *E. kuehniella* en condiciones controladas a  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y fotoperiodo 16:8 L: O.

El pulgón verde, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), se obtuvo de un sistema de cría desarrollado en la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) a partir de diferentes poblaciones de campo capturadas entre 2014 y 2015 en huertos de producción de melocotón (*Prunus persica* L.) y nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* L.) (Mezei *et al* 2020). Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó una muestra mixta (después de algunas generaciones) y sincronizada de pulgones de segundo estadio (3-4 días de edad) criada en plantas de pimiento, *Capsicum annuum* cv. *herminio* L.

Por su parte, las muestras del trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) se obtuvieron también de un sistema de cría establecido en la UPCT, a partir de poblaciones de campo que habían sido recogidas originalmente en invernaderos ecológicos del sureste de España entre 2009 y 2010, y que se mezclaron luego según la metodología de Guillén *et al* (2014). Finalmente, se proporcionaron muestras sincronizadas de segundo estadio (6-7 días de edad) y de adultos jóvenes (15-17 días de edad) para la realización de los ensayos de respuesta funcional.

### Capacidad depredadora y respuesta funcional

Se utilizaron ninfas de segundo estadio de *M. persicae* así como adultos y larvas de segundo estadio de *F. occidentalis* como presas para evaluar la respuesta funcional de las poblaciones de *O. laevigatus* ensayadas.

Para estudiar la capacidad de depredación sobre *M. persicae* se establecieron repeticiones de 5, 10, 20 y 30 ninfas de 2º estadio en recipientes de tipo salsera de polipropileno de 38 mm de diámetro con una sección circular (también de 38 mm de diámetro) de una hoja de pimiento centrada en su base, con el envés hacia arriba y sobre una capa de agar al 1%. Para cubrir cada recipiente se utilizó una tapa ventilada por medio de una fina malla metálica. Antes del inicio de los experimentos, las hembras de *O. laevigatus* recién emergidas (en las últimas 24 horas) estuvieron en contacto con pulgones durante 24 horas para luego permanecer en estado de inanición durante 24 horas más, tiempo durante el cual se mantuvieron juntas en botes de plástico que contenían cáscara de trigo sarraceno como refugio para evitar el canibalismo y un vial lleno de agua y sellado con algodón como fuente de humedad. Finalmente, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada uno de los recipientes de ensayo. Además, se evaluó un control con diez ninfas de pulgón por repetición para comprobar su supervivencia en ausencia del depredador.

En el caso de *F. occidentalis*, las larvas de 2º estadio o los individuos adultos se transfirieron a viales de plástico de 5 mL con una sección rectangular (30 x 5 mm) de hoja de pimiento en su interior y sellados por medio de un tapón debidamente perforado que permitiese la aireación. Para los trips de 2º estadio se evaluaron densidades de 20, 30, 50 y 100 individuos (la última sólo para BIG30, según nuestros bioensayos preliminares) por vial, así como un control con diez individuos

por repetición y sin hembras de orius. Para los adultos, se ensayaron densidades de 5, 10 y 30 individuos, además de un control negativo. Finalmente, después de 24 horas de contacto entre los adultos de *O. laevigatus* y una población de trips y tras 24 horas de ayuno, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada vial de plástico.

Se ensayaron diez repeticiones para cada población de *Orius*, para cada densidad de presas y para cada tipo de presa. Después de 24 horas se retiró a todos los depredadores de su escenario experimental, anotando a continuación el número de presas muertas. Finalmente, se congelaron las hembras de *Orius* y se midió la anchura del pronoto con un micrómetro óptico a 50 aumentos.

### Análisis estadístico

El tipo de respuesta funcional se determinó mediante un análisis de regresión logística a partir de la proporción de presas consumidas ( $N_C$ ) en función de la densidad inicial de presas ( $N_0$ ), utilizando el procedimiento de modelización de datos categóricos (PROC CATMOD) facilitado por Statistical Analysis System (SAS Institute 2001), a partir de la siguiente ecuación (Trexler y Travis 1993):

$$\frac{N_C}{N_0} = \frac{\exp(P_0 + P_1 N_0)}{1 + \exp(P_0 + P_1 N_0)} \quad (1)$$

, donde  $N_C$  es el número de presas consumidas,  $N_0$  es la densidad inicial de presas, y  $P_0$  y  $P_1$  son los coeficientes de determinación constante y lineal, respectivamente. Para determinar el tipo de respuesta funcional, se utilizó una prueba de razón de verosimilitud logarítmica con un valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para 1 grado de libertad como diferencia, verificando así que los coeficientes de la Ecuación 1 son significativamente distintos de cero (Trexler y Travis 1993). Para una respuesta funcional de tipo I, la curva de  $N_C / N_0$  frente a  $N_0$  tendrá una forma lineal si el término lineal no es significativamente diferente de cero; un valor negativo y significativo indicaría una respuesta de tipo II, en la que la proporción de presas consumidas disminuye paulatinamente a medida que aumenta el número inicial de presas ofrecidas; y un valor positivo y significativo indicaría una respuesta funcional de tipo III, que se caracteriza porque la proporción de presas consumidas está directamente relacionada con la densidad (Juliano 2001).

A continuación, se ajustó la ecuación de discos de Holling (Holling 1959) a los resultados utilizando el procedimiento de regresión no lineal de mínimos cuadrados (PROC NLIN, SAS Institute 2001), con el fin de estimar los valores de los parámetros relativos al depredador, tal y como se indica a continuación:

$$N_C = \frac{\alpha N_0 T}{1 + \alpha N_0 T_h} \quad (2)$$

donde  $\alpha$  es la tasa de ataque instantánea de un depredador o eficacia de búsqueda,  $T$  es la cantidad total de tiempo disponible para la búsqueda (24 h en este experimento) y  $T_h$  es el tiempo de manipulación para cada presa capturada, es decir, la proporción del tiempo de exposición que un depredador emplea en identificar, perseguir, matar, consumir y digerir a la presa. Los valores de  $T_h$  obtenidos se utilizaron para calcular la tasa máxima de ataque como  $T/T_h$  (Hassel 1978), que representa el número máximo de individuos de la especie presa que podría consumir una hembra de *O. laevigatus* al cabo de 24 horas. De este modo se puede obtener una proporción óptima entre

el número de depredadores y el de la plaga, lo que puede ser muy útil a la hora de optimizar la aplicación de una suelta inoculativa (Wang *et al* 2019).

Las curvas del número de presas consumidas por cada hembra de *O. laevigatus* a diferentes densidades de presa se representaron por medio del software Excel (Microsoft Corporation 2018).

Por otro lado, se llevó a cabo un test de regresión simple entre la proporción de presas muertas y la anchura del pronoto para determinar la influencia del tamaño de las hembras en su capacidad depredadora.

Además, se comprobó la normalidad de todos los recuentos y proporciones mediante la prueba de Shapiro-Wilk, así como la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad) mediante la prueba de Levene. Las diferencias entre las densidades de presas fueron objeto de un ANOVA. Cuando se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, se separaron las medias mediante un test HDS de Tukey para  $p < 0.05$ . Por otro lado, se usaron test de muestras relacionadas de Wilcoxon (prueba de rango con signos) para encontrar diferencias entre las tasas de depredación de BIG30 y las de Agrobio. Las diferencias entre poblaciones en cuanto a la anchura del pronoto se determinaron mediante una prueba t de Student de dos colas. Por último, mediante un ANOVA de un factor se comparó el número de presas muertas recuperadas de los controles. Para la prueba de regresión, los análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Student, se transformaron los recuentos y las proporciones a sus valores de raíz cuadrada y arcoseno, respectivamente, en caso de que no se cumplieren los supuestos de normalidad y homogeneidad. En todo momento, las hembras muertas se excluyeron del análisis.

## Resultados

En primer lugar, el tamaño del cuerpo (anchura del pronoto) de las hembras de *O. laevigatus* utilizadas como depredadores en nuestros ensayos varió significativamente entre las diferentes poblaciones estudiadas ( $t = 8.398$ ,  $gl = 215$ ,  $p < 0.001$ ), con  $0.825 (\pm 0.008)$  mm para la población grande mejorada BIG30 y  $0.779 (\pm 0.007)$  mm para la población comercial, Agrobio. Estos resultados concuerdan con los presentados en el capítulo 2, lo que demuestra la persistencia de la ganancia genética obtenida después de las numerosas generaciones transcurridas entre ambos grupos de ensayos (más de un año de diferencia entre ambos).

Independientemente del número de presas ofrecidas a cada ejemplar de *O. laevigatus*, la tasa de depredación diaria sobre larvas de trips fue estadísticamente superior en BIG30 (media  $\pm$  error estándar:  $85.0 \pm 6.8$  %) que en Agrobio ( $67.5 \pm 2.7$  %) (prueba de rango con signos de Wilcoxon:  $n = 77$ ,  $Z = 1106.0$ ,  $p < 0.001$ ). Las hembras de *Orius* con un tamaño más grande consumieron un 66% más de larvas de trips que las comerciales cuando se las confinó con 50 trips a cada una (Tabla 4.1). Aún mayor fue la diferencia entre ambas poblaciones cuando la presa elegida fue el trips adulto ( $76.7 \pm 6.6$  % para BIG30 y  $38.5 \pm 7.6$  % para Agrobio,  $n = 59$ ,  $Z = 817.5$ ,  $p < 0.001$ ), con un 145% más de capacidad depredadora en las hembras de BIG30 que en las de Agrobio cuando se facilitaron 30 adultos a cada una de ellas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones en cuanto a la tasa de depredación sobre las ninfas de pulgón ( $n = 79$ ,  $Z = 764.5$ ;  $p = 0.735$ ), con una media del  $64.8 (\pm 7.0)$  % de ninfas de pulgón consumidas en el caso de BIG30 y de un  $66.1 (\pm 8.3)$  % para Agrobio.

**Tabla 4.1.** Número de presas atacadas y consumidas por cada hembra de *Orius laevigatus* en función de la densidad de diferentes tipos de presa.

Presa	Densidad de presas	Número de presas consumidas (media $\pm$ error estándar)	
		Agrobio	BIG30
<i>Myzus persicae</i>	5	4.30 $\pm$ 0.26 Aa	4.40 $\pm$ 0.34 Aa
	10	8.10 $\pm$ 0.57 Ab	7.30 $\pm$ 0.30 Ab
	20	11.30 $\pm$ 1.61 Ac	10.80 $\pm$ 0.44 Ac
	30	13.00 $\pm$ 1.51 Ac	13.30 $\pm$ 1.20 Ac
2° estadio de <i>Frankliniella occidentalis</i>	20	16.30 $\pm$ 0.93 Aa	20.00 $\pm$ 1.11 Ba
	30	24.60 $\pm$ 1.56 Ab	29.60 $\pm$ 0.99 Bb
	50	26.70 $\pm$ 1.29 Ab	44.38 $\pm$ 2.27 Bc
	100	-	54.70 $\pm$ 3.56 c
Adulto de <i>Frankliniella occidentalis</i>	5	2.70 $\pm$ 0.33 Aa	4.50 $\pm$ 0.17 Ba
	10	3.80 $\pm$ 0.47 Aa	8.20 $\pm$ 0.44 Bb
	30	7.10 $\pm$ 1.18 Ab	17.40 $\pm$ 0.83 Bc

Medias ( $\pm$  error estándar) seguidas de la misma letra minúscula dentro de una columna para cada presa (diferencias entre densidades) y de la misma letra mayúscula en la misma fila (diferencias entre poblaciones) no son diferentes significativamente (test HDS de Tukey,  $p > 0.05$ ).

Por otro lado, el tamaño de las hembras se relacionó directamente con la tasa de depredación cuando se les ofrecieron presas en exceso. Así, cuando recibieron 50 larvas de trips cada una, la correlación entre tamaño y tasa de depredación fue considerable ( $R^2 = 0.86$ ,  $gl = 1 / 16$ ,  $p < 0.001$ , modelo lineal). Además, el número de hembras que alcanzó el 100% de depredación en BIG30 fue casi cuatro veces superior al de Agrobio (33 hembras, con una media  $\pm$  error estándar de  $0.832 \pm 0.016$  mm de anchura, y 9 hembras, de  $0.827 \pm 0.020$  mm, respectivamente), siendo todas ellas hembras de un tamaño considerable.

Con respecto a la densidad de presas y a la tasa de depredación de las hembras de *O. laevigatus*, se encontró entre ellas una relación positiva, sólida y relativamente constante para ambos estadios del trips, la larva de segundo estadio (ANOVA:  $F = 62.73$ ,  $gl = 3 / 69$ ,  $p < 0.001$ ) y el trips adulto ( $F = 19.67$ ,  $gl = 2 / 54$ ,  $p < 0.001$ ), independientemente de la población analizada (Tabla 4.1), así como para los pulgones ( $F = 28.36$ ,  $gl = 3 / 72$ ,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, a una densidad de presas elevada (50 al día), el mayor consumo per cápita se obtuvo para BIG30 sobre larvas de trips, cuyas hembras mataron al 88.8 ( $\pm 4.5$ ) % de las presas suministradas, mientras que solamente el 53.4 ( $\pm 2.6$ ) % de las larvas fueron consumidas por las hembras de Agrobio. Esta diferencia entre poblaciones hizo que fuera necesario ensayar una dosis más alta (100 larvas de trips por hembra) en la línea mejorada, con el fin de alcanzar una asíntota en la respuesta funcional sobre esta presa.

El coeficiente lineal ( $P_1$ ) de la regresión logística de las hembras de *O. laevigatus* presentó en todo caso un valor negativo, independientemente del tipo de presa y para ambas líneas analizadas del depredador, Agrobio y BIG30, indicando una respuesta funcional de tipo II (Tabla 4.2). Este tipo de respuesta se representa con una curva hiperbólica, coincidiendo la densidad más baja de presas con el origen de coordenadas. A partir de ahí, la tasa de depredación de *O. laevigatus* aumenta primero de forma casi lineal conforme crece la densidad de presas, ralentizándose luego de forma gradual hasta alcanzar un límite superior, una meseta o asíntota (Figura 4.1). Pues bien, tanto la pendiente de la curva como los valores de la asíntota fueron considerablemente más altos para la

población BIG30 que para Agrobio cuando se alimentó a sus hembras con larvas o adultos de trips. En cambio, no se observaron diferencias cuando se les ofrecieron pulgones como presa.

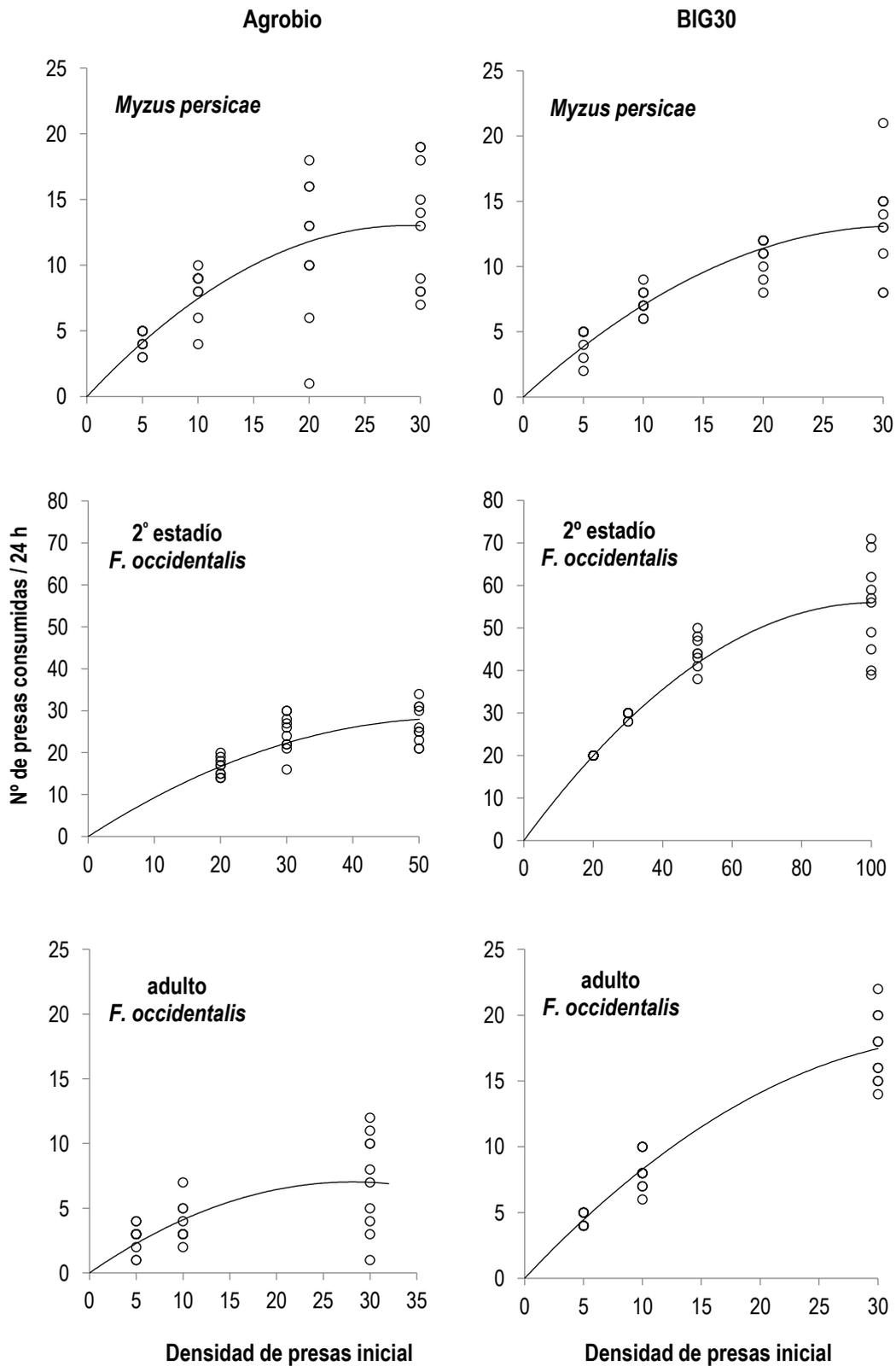
**Tabla 4.2.** Estimaciones de máxima verosimilitud a partir de regresiones logísticas de la proporción de diferentes tipos de presas atacados por hembras de *Orius laevigatus* en función de la densidad inicial de presas.

Población	Presa	Parámetros	Estimación $\pm$ EE	$\chi^2$	$p$ -valor
Agrobio	<i>Myzus persicae</i>	$P_0$	1.936 $\pm$ 0.244	63.05	<0.0001
		$P_1$	-0.075 $\pm$ 0.010	56.17	<0.0001
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	2.875 $\pm$ 0.260	122.49	<0.0001
		$P_1$	-0.054 $\pm$ 0.006	79.34	<0.0001
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	0.115 $\pm$ 0.232	0.24	0.6208
		$P_1$	-0.043 $\pm$ 0.010	19.73	<0.0001
BIG30	<i>Myzus persicae</i>	$P_0$	1.685 $\pm$ 0.243	48.25	<0.0001
		$P_1$	-0.066 $\pm$ 0.010	43.91	<0.0001
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	4.780 $\pm$ 0.270	313.70	<0.0001
		$P_1$	-0.046 $\pm$ 0.003	258.00	<0.0001
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	2.277 $\pm$ 0.321	50.30	<0.0001
		$P_1$	-0.065 $\pm$ 0.012	30.14	<0.0001

$P_0$ : coeficiente constante,  $P_1$ : coeficiente lineal, EE: error estándar,  $\chi^2$ : valores de Chi-cuadrado con un grado de libertad.

Para determinar la magnitud de la respuesta funcional de *O. laevigatus* se usaron los parámetros de tasa de ataque y tiempo de manipulación (Fathipour *et al* 2017). En nuestros bioensayos, las dos poblaciones ensayadas respondieron de forma diferencial también en ellos al aumento en la densidad de presas (Tabla 4.3). Así, BIG30 mostró valores de tasa de ataque más altos y valores para el tiempo de manipulación más bajos que la población comercial, independientemente del estadio del trips ofrecido como presa. Sin embargo, estas diferencias fueron significativas sólo en el caso del tiempo de manipulación de la presa. En este sentido, la población BIG30 presentó el menor tiempo de manipulación para las larvas de trips, con un valor casi un 50% más bajo. Y aún mayor fue la diferencia entre nuestras poblaciones para este parámetro cuando se les ofrecieron adultos de trips, empleando las hembras de BIG30 un 72% menos de tiempo que las de Agrobio para someter a este tipo de presa. De hecho, las hembras comerciales dedicaron más tiempo a manipular adultos de trips que cuando se enfrentaban al pulgón, mientras que las hembras de BIG30 manejaron más fácilmente al trips adulto que al áfido. Además, la tasa de depredación máxima teórica ( $T/T_h$ ) de BIG30 fue más del doble que la de Agrobio para las larvas de trips (89.2 y 42.9, respectivamente) y casi se cuadruplicó cuando con el trips adulto (40.1 frente a 11.3).

La mortalidad de las presas fue muy baja en el control. En concreto, el número de insectos muertos observado en los controles dentro de los viales estuvo en el rango del 0 al 3% en relación a los datos de mortalidad registrados para el mismo tipo de presa y para una densidad similar pero en presencia de la hembra de orius. En ningún caso se observaron diferencias significativas en la mortalidad de los tres tipos de presa recogidas de los controles ( $F = 1.81$ ,  $gl = 2 / 57$ ,  $p = 0.173$ ).



**Figura 4.1.** Respuesta funcional de las hembras de *O. laevigatus* de Agrobio (izquierda) y BIG30 (derecha) a diferentes densidades de presas. Los puntos de valores y las líneas sólidas ajustadas representan el número de presas muertas y las predicciones según el modelo de Holling (1959), respectivamente.

**Tabla 4.3.** Parámetros de respuesta funcional (RF) de *Orius laevigatus* sobre diferentes presas.

Población	Presa	RF	$\alpha \pm EE$ (95% IC)	$T_h \pm EE$ (95% IC)	$T/T_h$	$R^2$	$gl$
Agrobio	<i>Myzus persicae</i>	II	$0.052 \pm 0.014$ (0.024 - 0.080)	$1.182 \pm 0.260$ (0.655 - 1.709)	20.30	0.48	39
	2° estadio de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.057 \pm 0.014$ (0.030 - 0.083)	$0.559 \pm 0.095$ (0.363 - 0.754)	42.93	0.51	29
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.026 \pm 0.009$ (0.008 - 0.044)	$2.125 \pm 0.632$ (0.830 - 3.419)	11.29	0.40	29
BIG30	<i>Myzus persicae</i>	II	$0.045 \pm 0.007$ (0.031 - 0.059)	$1.074 \pm 0.166$ (0.738 - 1.411)	22.35	0.73	39
	2° estadio de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.062 \pm 0.007$ (0.049 - 0.076)	$0.269 \pm 0.027$ (0.215 - 0.324)	89.22	0.82	36
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.043 \pm 0.004$ (0.034 - 0.052)	$0.599 \pm 0.098$ (0.399 - 0.798)	40.07	0.91	29

EE: error estándar, IC: intervalos de confianza,  $\alpha$ : tasa de ataque ( $h^{-1}$ ),  $T_h$ : tiempo de manejo (h),  $T/T_h$ : tasa máxima de depredación.  $R^2$  es el coeficiente de determinación obtenido como  $R^2 = 1 - (\text{suma de cuadrados de los valores residuales} / \text{suma total de cuadrados})$ , y  $gl$  son los grados de libertad del análisis de la varianza (ANOVA) para el procedimiento de regresión no lineal (PROC NLIN, SAS Institute 2001) con el que se estimó el valor de los parámetros de la respuesta funcional.

## Discusión

La respuesta funcional es uno de los métodos por excelencia para determinar la eficacia de un depredador frente a una presa (Wiedenmann y Smith 1997). Este método se refiere a los cambios en el número de presas ingeridas por un depredador en cada unidad de tiempo con respecto a la densidad inicial de la presa (Solomon 1949; Holling 1959), y muestra si un depredador es capaz de regular la densidad de su presa o no (Jervis y Kidd 1996). Holling (1959) identificó tres tipos básicos de respuesta funcional en general. La respuesta de Tipo I se caracteriza por un aumento lineal con una tasa de ataque constante sobre todas las densidades de presa hasta que se alcanza el punto de saciedad. En la respuesta de Tipo II, la tasa de ataque disminuye a medida que aumenta la densidad de presas. Por último, el Tipo III está representado por una curva de tipo sigmoidal en la que la tasa de ataque aumenta con el incremento de la densidad de presas. Sea cual sea el tipo de respuesta funcional exhibido, cuando un depredador está limitado por el tiempo disponible aparece una meseta o asíntota a altas densidades de presa, estando ésta determinada por la relación entre el tiempo total y el tiempo de manejo de una presa. Pues bien, nuestros resultados revelan que el aumento del tamaño corporal de nuestra población seleccionada de *O. laevigatus* desembocó en una mejora en el rendimiento sobre sus presas naturales, tanto sobre la larva del trips como, sobre todo, sobre el adulto.

En primer lugar, el coeficiente lineal ( $P_1$ ) de la regresión logística de las hembras de *O. laevigatus* a 26 °C fue negativo independientemente de la presa y de la población ensayada, indicando una respuesta funcional de tipo II. Con el aumento de la densidad de presas, el consumo neto de presas de las dos poblaciones de *O. laevigatus* analizadas aumentó hasta alcanzar una asíntota. Este tipo de respuesta funcional se ha registrado en numerosas ocasiones con anterioridad para *O. laevigatus* [sobre *F. occidentalis* y *Trialeurodes vaporariorum* W. (Hemiptera: Aleyrodidae): Montserrat *et al* 2000; sobre *Aphis gossypii* G.: Hassanpour *et al* 2020], pero también para otras

especies relacionadas, como por ejemplo *O. insidiosus* S. sobre *Aphis glycines* M. (Hemiptera: Aphididae) (Rutledge y O'Neil 2005) y sobre *A. gossypii* (Veiga *et al* 2014), *O. majusculus* sobre *F. occidentalis* y *T. vaporariorum* (Montserrat *et al* 2000), *O. tricolor* W. sobre *Tuta absoluta* M. (Queiroz *et al* 2015), *O. strigicolis* P. sobre *Bemisia tabaci* y *T. vaporariorum* (Rehman *et al* 2020), u *O. albidipennis* R. sobre *Thrips tabaci* L. (Thysanoptera: Thripidae) (Madadi *et al* 2007) y *Aphis fabae* S. (Hemiptera: Aphididae) (Rashedi *et al* 2020). En nuestro estudio, el escenario de ensayo consistió en pequeños viales de plástico, lo que puede acelerar la eficacia de búsqueda por parte del depredador, permitiéndoles atacar de forma reiterada a las presas que inicialmente pudieran escapar (Rehman *et al* 2020).

*O. laevigatus* se considera un depredador generalista que ataca a un amplio espectro de presas. No obstante, los resultados de nuestro estudio con poblaciones comerciales y mejoradas muestran que el tipo de presa puede tener un impacto considerable en el rendimiento de un depredador. De hecho, la capacidad depredadora de nuestros antocóridos mostró grandes variaciones cuando se les ofrecieron distintos tipos de presa. Nuestros resultados apuntan a la larva de segundo estadio de *F. occidentalis* como el alimento más adecuado para este insecto, entre los tres tipos de presas artrópodas estudiadas, tanto para Agrobio como para BIG30. Esta preferencia sobre otras presas se deduce por el mayor número de presas muertas, por las elevadas tasas de ataque ( $\alpha$ ) y por los cortos tiempos de manipulación ( $T_h$ ) de las dos poblaciones depredadoras cuando se les alimenta con larvas de trips, lo que se traduce en un menor tiempo de búsqueda de presas y en mayores tasas de depredación. Estos hallazgos acerca de la preferencia de *Orius* coinciden con estudios anteriores no sólo sobre otras poblaciones de *O. laevigatus* (Arnó *et al* 2008, Bonte y de Clercq 2010) sino también sobre otras especies de *Orius*, como *O. insidiosus* (Tommasini y Nicoli 1994), *O. sauteri* (Kohno y Kashio 1998), *O. thripoborus* H. y *O. naivashae* P. (Bonte *et al* 2015).

La forma de la respuesta funcional de tipo II mostrada por esta especie en nuestros bioensayos, independientemente de la presa ofrecida, es una prueba más de la fuerte afinidad de *O. laevigatus* por el segundo estadio del trips, dado que la función de depredación evoluciona desde curvas que se saturan claramente con el aumento de la densidad de la presa en el caso del pulgón o el trips adulto, hasta funciones de tipo no saturada, de "raíz cuadrada", cuando se proporcionan larvas de trips. Recientemente, Anderson *et al* (2016) demostraron que la forma de la respuesta funcional cambia con la relación en tamaño de depredador y presa, estando los depredadores pequeños más limitados por los tiempos de manipulación que los grandes, lo que a su vez permitía explicar las ligeras diferencias encontradas entre las curvas de respuesta funcional. En otras palabras, los depredadores más pequeños tendían a mostrar una respuesta funcional de tipo II, mientras que los depredadores más grandes mostraban una respuesta funcional de tipo I para la misma presa. En nuestros resultados, sin embargo, todas las respuestas funcionales fueron de tipo II, y sólo la de BIG30 sobre el trips adulto tiende a dibujar una línea no saturada (Figura 4.1). Por el contrario, Isenhour y Yeorgan (1981) encontraron una clara evidencia de saturación en *O. insidiosus* cuando utilizaron trips adultos como presa en lugar de larvas. También van den Meiracker y Sabelis (1999) comprobaron que la respuesta funcional de las hembras adultas de *O. insidiosus* al atacar a larvas de 2º estadio de *F. occidentalis* nunca llegó a saturarse, sino que continuó creciendo linealmente, dentro de un rango realista de densidades de presa (0-20 trips / cm<sup>2</sup>), como resultado de un tiempo de manipulación muy bajo.

Un aspecto crucial en el éxito de la depredación por parte de un depredador es la vulnerabilidad de la presa al ataque. En ese sentido, es razonable suponer que los adultos del trips tengan una habilidad superior para escapar a la depredación, ya que están dotados de alas y pueden moverse más rápido. Esto hace que sean más difíciles de capturar de forma exitosa, posibilitando que el depredador se abstenga de atacar antes incluso de estar completamente saciado, ya que la

energía necesaria para realizar el ataque podría superar a la que obtiene al alimentarse (van den Meiracker y Sabelis 1999). Las larvas de trips, en cambio, son más vulnerables que los adultos a la depredación dada su movilidad más reducida, más lenta, por lo que tienen menos posibilidades de eludir la depredación (Sabelis y van Rijn 1997, van den Meiracker y Sabelis 1999, Funderburk *et al* 2000). La aparente preferencia por las larvas del trips observada en nuestros insectos es coherente con los hallazgos de Funderburk *et al* (2000), Ramachandran *et al* (2001) y Reitz *et al* (2006), quienes registraron un número menor de larvas de trips que de adultos en sus ensayos de campo usando a *O. insidiosus* como depredador en invernaderos de pimiento y de algodón. Aún más comparables a los nuestros fueron los resultados de laboratorio obtenidos por Báez *et al* (2004) y Chow *et al* (2008) también con *O. insidiosus*, pero en este caso detectando un éxito de captura más bajo con trips adultos en placas de Petri, independientemente del tiempo de ensayo y de la densidad de presas. Estos resultados sugieren que, aunque *Orius* spp. podría no mostrar una preferencia activa entre las etapas de vida de su presa, el grado de movilidad de los distintos estadios del trips puede afectar a su vulnerabilidad a la depredación.

La forma de la curva de la respuesta funcional depende de varias características como son el ritmo de encuentro, la tasa de ataque o el tiempo de manipulación de la presa por parte del depredador (Holling 1965, Hassell 1978). Estas características pueden variar en una especie como resultado del tamaño del depredador o de la presa, de la interferencia entre depredadores o de la presencia de presas alternativas (Aljetlawi *et al* 2004). Para estimar la eficacia de un depredador en relación con su presa, se considera que el tiempo de manipulación es un parámetro clave porque muestra cuánto tiempo emplea un depredador en capturar, someter, matar y digerir una sola presa (Atlihan *et al* 2010). Por lo tanto, la variabilidad significativa hallada en el tiempo de manipulación entre las poblaciones de nuestros ensayos, manifiesta que cualquier componente de los ya mencionados en referencia al tiempo de manipulación podría haberse visto influenciado por el proceso de selección seguido hasta lograr el aumento deseado en el tamaño corporal del insecto. En consecuencia, y acorde a los resultados, se espera que nuestra línea BIG30 de *O. laevigatus* de gran tamaño sea más eficiente en la caza tanto de ninfas de segundo estadio como de adultos que una población comercial o silvestre de tamaño medio como Agrobio. En este contexto, ya se señaló la existencia de un escalado de los parámetros de respuesta funcional con el tamaño del depredador (Ball *et al* 2015), ya que un depredador de una talla superior en relación con su presa es capaz de encontrar y capturar recursos a mayor velocidad, y además requiere menos tiempo para su digestión. Según Sabelis (1992), la mayoría de los depredadores generalistas seleccionan sus presas en función de su tamaño relativo, lo que explicaría las diferencias en los tiempos de manipulación observados entre nuestras poblaciones de *O. laevigatus* cuando se alimentaron de ambos estadios de vida del trips. En este caso, BIG30 requirió la mitad del tiempo de manipulación que Agrobio para las larvas de trips y, lo que es más importante, casi cuatro veces menos tiempo para los trips adultos. En definitiva, los tiempos de manipulación más bajos en BIG30 revelan que los insectos de esta raza son más activos y pasan más tiempo buscando presas y alimentándose de ellas, mientras que las hembras de Agrobio necesitaban más tiempo para actividades no relacionadas con la búsqueda de alimento, como el descanso entre períodos de búsqueda.

Aunque la capacidad de depredación superior sobre ambos estadios del trips por parte de BIG30 es notable, la respuesta funcional mejorada sobre el trips adulto es especialmente relevante para el control biológico. En nuestro estudio, la cepa BIG30 de *O. laevigatus* duplicó el número adultos de trips consumidos por Agrobio. Además, BIG30 obtuvo un consumo máximo de presas ( $T/T_h$ ) sobre esta presa casi tan elevado como el alcanzado por la población comercial sobre el segundo estadio de esta plaga. Más aún, en BIG30, el consumo de presas se incrementó a medida que aumentaba la densidad de trips adultos sin llegar a saturarse de forma clara, mientras que la respuesta funcional de Agrobio muestra una asíntota definida, así como bajas tasas de consumo

de trips adultos independientemente de la densidad de presa (24 - 57 %). Anteriormente, Cocuzza *et al* (1997) encontraron números similares a los nuestros para *Agrobio* utilizando otra población comercial de *O. laevigatus*, con niveles de saciedad de 7 adultos por hembra al día. Sin embargo, Tommasini *et al* (2004) y Shakya *et al* (2010) registraron valores casi tan altos como los nuestros para BIG30 en sus ensayos con *O. laevigatus*, *O. majusculus*, *O. niger* y *O. insidiosus*, oscilando entre 10.2 y 13.9 trips adultos por depredador en 24 horas. Por lo tanto, y en consonancia con Funderburk *et al* (2000) y Reitz *et al* (2006), cabe esperar que se produzca un control más tardío de las poblaciones de trips adultos por parte de las poblaciones comerciales y silvestres de *O. laevigatus*. Aunque se ha informado de que la mayoría de especies de *Orius* son capaces de alimentarse del adulto de *F. occidentalis* (van den Meiracker y Ramakers 1991, Sabelis y van Rijn 1997, Tommasini *et al* 2004), el tiempo que dedican las hembras de la población de *Agrobio* a consumir esta presa no haría sino confirmar que el trips adulto no es una presa alternativa óptima para las poblaciones comerciales de *O. laevigatus*, al contrario de lo que ocurre con BIG30 (58 - 90% de depredación en función de la disponibilidad de presas), claramente superior en tamaño y peso corporal que la media de poblaciones silvestres y comerciales (Capítulo 2, Mendoza *et al* 2020b). Por lo tanto, y de acuerdo con nuestros resultados, se espera una mayor eficacia por parte de BIG30 en el control de las poblaciones de trips que de cualquier otra combinación depredador-presa utilizada en este estudio. Una buena capacidad de depredación sobre el trips adulto, además de sobre las larvas, permite que la proporción del ciclo de vida del trips susceptible de ser controlada biológicamente de forma efectiva se amplíe, añadiendo a los 4.4 días de media que duran las larvas de primer y segundo estadio, 28.8 días de longevidad media de los adultos a 25 °C (Vangansbeke *et al* 2016). En cualquier caso, el rango de presas más amplio mostrado por nuestra línea mejorada genéticamente para un tamaño más grande es de gran relevancia en cualquier programa de control biológico en el que sea necesario reducir el nivel de la plaga por debajo de un umbral inmediatamente después de la suelta del depredador. En otras palabras, especialmente cuando el tiempo para la supresión de la población de la plaga debe ser corto, estas características de depredación son cruciales a la hora de determinar la relación inicial depredador-presa (Sabelis y van Rijn 1997, van den Meiracker y Sabelis 1999).

Vangansbeke *et al* (2019) también consiguieron recientemente aumentar el tamaño de un ácaro depredador, *Amblydromalus limonicus* (Garman y McGregor) (Acari: Phytoseiidae), a través de un proceso de cría a baja temperatura. De forma similar a lo ocurrido en nuestro caso, esta mejora en el tamaño se tradujo en una mayor capacidad para someter a una presa más grande, en su caso a la larva de segundo estadio de *F. occidentalis*, a la cual originalmente apenas era capaz de someter el fitoseido. No obstante, si bien también se señaló este hallazgo como muy beneficioso para el control biológico, a diferencia de nuestra población mejorada genéticamente, el mayor tamaño adquirido en este caso era un carácter fenotípico, sin un origen genético o adaptativo, demostrando a la postre un efecto transgeneracional limitado.

La respuesta funcional de tipo II se considera la que mejor explica la teoría del aprovechamiento óptimo del alimento, que supone que los depredadores se decantarán por presas grandes para maximizar la ganancia de energía y la tasa de crecimiento de sus poblaciones a lo largo del tiempo (van Leeuwen *et al* 2007). Nuestras observaciones anteriores sugieren que *O. laevigatus* depreda la primera presa que puede capturar y consumir sin problemas para satisfacer sus necesidades nutricionales, basando su búsqueda en la relación entre el tamaño del depredador y el de la presa. Sin embargo, nuestra población BIG30 se decanta más por los trips adultos que por los pulgones en su elección de presas de mayor tamaño, como demuestra el hecho de que el aumento de tamaño no ha provocado un cambio ni en la forma de la curva ni en los parámetros de respuesta funcional para los pulgones presa en ninguna de las dos poblaciones analizadas. En este caso es inevitable resaltar la relevancia de la conexión evolutiva entre depredador y presa, relegando a un

segundo plano lo relativo a la relación de tamaño. Esto queda más claro si comparamos la tasa de depredación sobre trips y pulgones en especies más grandes y más pequeñas que *O. laevigatus*, como *O. majusculus* y *O. albidipennis*, respectivamente. Así, si Blaeser *et al* (2004) encontraron una afinidad mucho más alta por *F. occidentalis* en *O. albidipennis* que en *O. majusculus*, Alvarado *et al* (1997) y Henaut *et al* (2000), por su parte, observaron que *O. majusculus* es un depredador especialista de pulgones. Y es que, además del tamaño de la presa, es importante tener en cuenta otros factores, como las tácticas de defensa, a la hora de seleccionar y atacar a una presa (de Clercq y Degheele 1994, Eubanks y Denno 2000). Por ejemplo, Butler y O'Neil (2006) y Desneux *et al* (2006) registraron ciertos mecanismos de defensa en el pulgón de la soja, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), contra *O. insidiosus*, los cuales fueron más evidentes y efectivos que los observados en el caso de *F. occidentalis*. En la misma línea, Henaut *et al* (2000) detectaron que todos los contactos realizados por *O. majusculus* a lo largo del cuerpo del pulgón tenían como resultado que el depredador fuera fácilmente rechazado por una respuesta de pateo del pulgón por medio de sus patas traseras. Este fenómeno podría explicar el hecho de que, en contraste con lo que ocurre con el trips, el aumento del tamaño del depredador con respecto al pulgón no haya conducido a un cambio ni en la forma de la curva ni en los parámetros de respuesta funcional entre las dos poblaciones de *Orius* probadas. En línea con estos resultados, en trabajos anteriores *O. laevigatus* empleó 1 h 33 min en manipular una presa subóptima como las pupas de mosca blanca, pero sólo 17 min para el segundo estadio del trips (Montserrat *et al* 2000), datos similares a los observados en el presente estudio para pulgones y larvas de trips, respectivamente.

En definitiva, todos estos resultados elevan a nuestra línea mejorada a un estatus de depredador de orden superior, lo que tendría una consecuencia directa a la hora de abordar su suelta a una dosis efectiva en el campo. Así, Funderburk *et al* (2000) ya demostraron que tanto las larvas como los adultos del trips en el cultivo de pimiento sin tratar se acercaban a su extinción en cuestión de días cuando el ratio entre el depredador (*O. insidiosus*) y el total de trips era de aproximadamente 1:40. Tal hallazgo, junto con la tasa de depredación de 12.5 trips al día notificada por Tommasini y Nicoli (1993) representan resultados que se sitúan cerca del nivel de nuestra asíntota para Agrobio y de su consumo diario de trips (29.9 y 16.9 trips al día, respectivamente, interpolando una media entre adultos y ninfas), y por tanto muy por debajo de los valores obtenidos por BIG30 (67.1 y 36.1 al día, respectivamente). Por consiguiente, un ratio depredador-presa de 1:80 o incluso inferior podría alcanzar para lograr un control eficaz de las poblaciones de trips en el caso de nuestra línea de *O. laevigatus* genéticamente mejorada, lo que supondría una ventaja importante en términos de ahorro económico tanto para el agricultor como para los proveedores comerciales.

Por otro lado, las elevadas tasas de depredación observadas en nuestro estudio (hasta 54 larvas de trips por depredador y día en BIG30) pueden deberse al entorno de búsqueda relativamente simple (un vial de sólo 5 mL). Un estudio de Isenhour y Yeorgan (1981) apoya esta idea, toda vez que hallaron una menor tasa de depredación cuando ofrecieron trips a *O. insidiosus* en superficies foliares más grandes (65 cm<sup>2</sup>) que en otras más pequeñas (3.8 cm<sup>2</sup>). Así pues, estos valores constituyen una representación cuestionable de los niveles medios de depredación en condiciones naturales y deben por ello interpretarse con cuidado, dada la dificultad de los trips para evitar la depredación (Kareiva 1990). Sin embargo, Báez *et al* (2004) encontraron que casi la totalidad de la depredación (87 - 100%) transcurre en el interior de la flor, y por tanto en un área de un tamaño reducido. Además, los antocóridos del presente estudio fueron capaces de matar a sus presas sin consumirlas completamente (observación experimental), aunque éste es un comportamiento muy común entre los antocóridos y, de hecho, se ha indicado que aumenta su eficacia como ACBs (Isenhour y Yeorgan 1981, de Clercq y Degheele 1994). En cualquier caso, las elevadas tasas de depredación observadas eran de esperar teniendo en cuenta que nuestras hembras estuvieron privadas de alimento durante 24 horas, y al mismo tiempo sugieren una rápida explotación de

recursos alimenticios diferentes por parte de nuestros depredadores, por ejemplo durante un eventual periodo de escasez de presas (Bielza *et al* 2020). Por esta razón, incluso la fuerte dependencia de su presa por parte de *O. laevigatus* (reflejada en la preferencia que muestra por los estadios juveniles del trips y la fuerte influencia de la densidad de presas) no representa un riesgo para nuestra línea seleccionada para un tamaño más grande, una vez se ha demostrado en ella la capacidad de alimentación a base de presas alternativas como *M. persicae* y, sobre todo, el adulto del trips, en comparación con la población disponible comercialmente. Sea como fuere, creemos que nuestros resultados pueden tener cierto valor como aproximación a la estimación de la capacidad depredadora de nuestra raza seleccionada, aunque recomendamos llevar a cabo un estudio mucho más profundo al respecto, especialmente en condiciones de campo y semicampo.

En conclusión, el tamaño corporal de *O. laevigatus* se ha relacionado significativamente con los parámetros de la respuesta funcional. La raza mejorada genéticamente para un tamaño superior mostró una capacidad de depredación también netamente superior tanto sobre larvas como sobre adultos del trips. En consecuencia, el mayor tamaño corporal de nuestra población seleccionada puede incrementar su eficacia como agente de control biológico. Sin embargo, se necesitan más estudios en condiciones de semicampo y de campo como paso previo a su uso extensivo en cultivos comerciales.

## Referencias

- Aljetlawi AA, Sparrevik E, Leonardsson K. 2004. Prey-predator size-dependent functional response: derivation and rescaling to the real world. *J Anim Ecol* 73: 239-252. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00800.x>.
- Alvarado P, Batala O, Alomar O. 1997. Efficiency of four Heteroptera as predators of *Aphis gossypii* and *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae). *BioControl* 42: 215-226. <https://doi.org/10.1007/BF02769899>.
- Anderson TL, Linares C, Dodson KN, Semlitsch RD. 2016. Variability in functional response curves among larval salamanders: comparisons across species and size classes. *Can J Zool* 94: 23-30. <https://doi.org/10.1139/cjz-2015-0149>.
- Arnó J, Roig J, Riudavets J. 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisa tabaci* and estimation of their prey preference. *Biol Control* 44: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.009>.
- Atlihan R, Kaydan MB, Yarimbatman A, Okut H. 2010. Functional response of the coccinellid predator *Adalia fasciatopunctata* revelierei to walnut aphid (*Callaphis juglandis*). *Phytoparasitica* 38:23-29. <https://doi.org/10.1007/s12600-009-0075-y>.
- Báez I, Reitz SR y Funderburk JE. 2004. Predation by *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) on life stages and species of *Frankliniella* flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in pepper flowers. *Environ Entomol* 33 (3): 662-670. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.3.662>.
- Balanza V, Mendoza JE, Bielza P. 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomol Experim Appl* 167 (7): 626-635. <https://doi.org/10.1111/eea.12813>.

- Balanza V, Mendoza JE, Cifuentes D, Bielza P. 2021. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Manag Sci* 77: 2539-2546. <https://doi.org/10.1002/ps.6288>.
- Ball SL, Woodcock BA, Potts SG, Heard MS. 2015. Size matters: body size determines functional responses of ground beetle interactions. *Basic Appl Ecol* 16: 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2015.06.001>.
- Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>.
- Blaeser P, Sengonça C, Zegula T. 2004. The potential use of different predatory bug species in the biological control of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *J Pest Sci* 77: 211-219. <https://doi.org/10.1007/s10340-004-0057-2>.
- Bonte M, de Clercq P. 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 55: 625-629. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9275-0>.
- Bonte M, de Hauwere L, Des Conlong, de Clercq P. 2015. Predation capacity, development and reproduction of the southern African flower bugs *Orius thripoborus* and *O. naivashae* (Hemiptera: Anthocoridae) on various prey. *Biol Control* 86: 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.007>.
- Brose U, Jonsson T, Berlow EL, Warren P, Banasek-Richter C, Bersier L, Blanchard JL, Brey T, Carpenter SR, Blandenier MC, Cushing L, Dawah HA, Dell T, Edwards F, Harper-Smith S, Jacob U, Ledger ME, Martinez ND, Memmott J, Mintenbeck K, Pinnegar JK, Rall BC, Rayner TS, Reuman DC, Ruess L, Ulrich W, Williams RJ, Woodward G, Cohen JE. 2006. Consumer-resource body-size relationships in natural food webs. *Ecology* 87: 2411-2417. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2411:CBRINF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2411:CBRINF]2.0.CO;2).
- Butler CD, O'Neil RJ. 2007. Life history characteristics of *Orius insidiosus* (Say) fed diets of soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura and soybean thrips, *Neohydatothrips variabilis* (Beach). *Biol Control* 40: 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.12.006>.
- Chow A, Chau A, Heinz KM. 2008. Compatibility of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) with *Amblyseius (Iphiseius) degenerans* (Acari: Phytoseiidae) for control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse roses. *Biol Control* 44: 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.11.002>.
- Chown SL, Gaston KJ. 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biol Rev* 85: 139-169. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00097.x>.
- Cocuzza GE, de Clercq P, Lizzio S, van de Veire M, Tirry L, Degheele D, Vacante V. 1997. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* at three constant temperatures. *Entomol Exp Appl* 85: 189-198. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00249.x>
- De Clercq P, Degheele D. 1994. Laboratory measurement of predation by *Podisus maculiventris* and *P. sagitta* (Hemiptera: Pentatomidae) on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 87: 76-83. <https://doi.org/10.1093/jee/87.1.76>.

- Desneux N, O'Neil RJ, Yoo HJS. 2006. Suppression of population growth of the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura, by predators: the identification of a key predator and the effects of prey dispersion, predator abundance, and temperature. *Environ Entomol* 35: 1342-1349. <https://doi.org/10.1093/ee/35.5.1342>.
- Emmerson MC, Raffaelli D. 2004. Predator-prey body size, interaction strength and the stability of a real food web. *J Anim Ecol* 73: 399-409. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00818.x>.
- Eubanks MD, Denno RF. 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* 25: 140-146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00243.x>.
- Fathipour Y, Karimi M, Farazmand A, Talebi AA. 2017. Age-specific functional response and predation rate of *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) on two-spotted spider mite. *Syst Appl Acarol UK* 22 (2): 159-169. <https://doi.org/10.11158/saa.22.2.1>.
- Funderburk J, Stavinsky J, Olson S. 2000. Predation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in field pepper by *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 29 (2): 376-382. <https://doi.org/10.1093/ee/29.2.376>.
- Guillén J, Navarro M, Bielza, P. 2014. Cross-resistance and baseline susceptibility of spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 107 (3): 1239-1244. <https://doi.org/10.1603/EC13397>.
- Hassanpour M, Yaghmaee A, Golizadeh A, Rafiee-Dastjerdi H, Mottaghinia L. 2020. Functional response and consumption rate of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) feeding on the melon aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) at three different temperatures. *J Crop Prot* 9 (1): 101-113.
- Hassel MP. 1978. The dynamics of arthropod predator-prey systems. Princeton, University Press, Princeton, NJ, 237 pp.
- Henaut Y, Alauzet C, Ferran A, Williams T. 2000. Effect of nymphal diet on adult predation behaviour in *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *J Econ Entomol* 93 (2): 252-255. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.252>.
- Holling CS. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Can Entomol* 91: 385-389. <https://doi.org/10.4039/Ent91385-7>.
- Holling CS. 1965. The functional response of predators to prey density and its role in mimicry and population regulation. *Mem Ent Soc Can* 45: 3-60. <https://doi.org/10.4039/entm9745fv>.
- Ishenhour DJ, Yeagan KV. 1981. Predation by *Orius insidiosus* on the soybean thrips, *Sericothrips variabilis*: Effect of prey stage and density. *Environ Entomol* 10: 496-500. <https://doi.org/10.1093/ee/10.4.496>.
- Jervis MA, Kidd NAC. 1996. Phytophagy. En: Jervis MA y Kidd NAC (eds), *Insect natural enemies: Practical approaches to their study and evaluation*. Chapman y Hall, UK, pp 375-394. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0013-7>.

- Juliano SA. 2001. Non-linear curve fitting: predation and functional response curves. En: Scheiner SM y Gurevitch J (Eds), Design and analysis of ecological experiments. Chapman y Hall, pp 178-196.
- Kalinkat G, Jochum M, Brose U, Dell AI. 2015. Body size and the behavioral ecology of insects: linking individuals to ecological communities. *Curr Opin Insect Sci* 9: 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.017>.
- Kareiva P. 1990. The spatial dimension in pest-enemy interactions. En: Mackauer M, Ehler LE, Roland J (eds), Critical issues in biological control, Intercept, Andover, pp 213-227.
- Kingsolver JG, Huey RB. 2008. Size, temperature and fitness: three rules. *Evol Ecol Res* 10: 251-268.
- Kohno K, Kashio T. 1998. Development and prey consumption of *Orius sauteri* (Poppius) and *O. minutus* (L) (Heteroptera: Anthocoridae) fed on *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Appl Entomol Zool* 33: 227-230. <https://doi.org/10.1303/aez.33.227>.
- Madadi H, Enkegaard A, Brodsgaard H, Kharrazi-Pakdel A, Mohaghegh J, Ashouri A. 2007. Host plant effects on the functional response of *Neoseiulus cucumeris* to onion thrips larvae. *J Appl Entomol* 131: 728-733. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01206.x>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020a. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. *J Pest Sci* 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01291-x>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020b. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biol Control* 148: 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>.
- Mezei I, Bielza P, Siebert MW, Torne M, Gómez LE, Valverde-García P, Belando A, Moreno I, Grávalos C, Cifuentes D, Sparks TC. 2020. Sulfoxaflor efficacy in the laboratory against imidacloprid-resistant and susceptible populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*: Impact of the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Physiol* 166: 104582. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104582>.
- Microsoft Corporation. 2018. Microsoft Excel. Disponible en <https://office.microsoft.com/excel>.
- Montserrat M, Albajes R, Castañe C. 2000. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environ Entomol* 29: 1075-1082. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.5.1075>.
- Queiroz OS, Ramos RS, Gontijo LM, Picanço MC. 2015. Functional response of three species of predatory pirate bugs attacking eggs of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Entomol* 44: 246-251. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu026>.
- Ramachandran S, Funderburk J, Stavisky J, Olson S. 2001. Population abundance and movement of *Frankliniella* species and *Orius insidiosus* in field pepper. *Agric For Entomol* 3: 1-10. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.2001.00097.x>.
- Rashedi A, Rajabpour A., Sohani NZ, Rasekh A. 2020. Prey stage preference and functional response of *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae). *Int J Trop Insect Sci* 40: 13-19. <https://doi.org/10.1007/s42690-019-00045-2>.

- Rehman SU, Zhou X, Ali S, Asim Rasheed M, Islam Y, Hafeez M, Aamir Sohail M, Khurram H. 2020. Predatory functional response and fitness parameters of *Orius strigicollis* Poppius when fed *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* as determined by age-stage, two-sex life table PeerJ 8: e9540. <http://doi.org/10.7717/peerj.9540>.
- Reitz SR, Funderburk JE, Waring SM. 2006. Differential predation by the generalist predator *Orius insidiosus* on congeneric species of thrips that vary in size and behaviour. Entomol Exp Appl 119: 179-188. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00408.x>.
- Rutledge CE, O'Neil RJ. 2005. *Orius insidiosus* (Say) as a predator of the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura. Biol Control 33: 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.01.001>.
- Sabelis MW. 1992. Predatory arthropods. En: Crawley ML (Ed), Natural enemies: The population biology of predators, parasites and diseases. Blackwell, Oxford, pp 225-264. <https://doi.org/10.1002/9781444314076>.
- Sabelis MW, van Rijn PCJ. 1997. Predation by insects and mites. En: Lewis T (ed), Thrips as crop pests .CAB International, Wallingford, UK, pp 259-354.
- Sánchez JA, Alcázar A, Lacasa A, Llamas A, Bielza P. 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. IOBC/WPRS Bull 23: 21-30.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT user's guide. Cary, NC: SAS Institute.
- Shakya S, Coll M, Weintraub PG. 2010. Incorporation of intraguild predation into a pest management decision-making tool: The case of thrips and two pollen-feeding predators in strawberry. J Econ Entomol 103: 1086-1093. <https://doi.org/10.1603/EC09373>.
- Solomon ME. 1949. The natural control of animal populations. J Anim Ecol 18: 1-35.
- Tommasini MG, Nicoli G. 1993. Adult activity of four *Orius* species reared on two preys. IOBC-WPRS Bull 16: 181-184.
- Tommasini MG, van Lenteren JC, Burgio G. 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. Bull Insectol 57: 79-93.
- Trexler JC y Travis J. 1993. Nontraditional regression analysis. Ecology 74: 1629-1637. <https://doi.org/10.2307/1939921>.
- Van den Meiracker RAF, Sabelis MW. 1999. Do the functional of predatory arthropods reach a plateau level? A case study of *Orius insidiosus* with western flower thrips as prey. Entomol Exp Appl 90: 225-234. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00452.x>.
- Van Leeuwen E, Jansen VAA, Bright PW. 2007. How population dynamics shape the functional response in a one-predator-two-prey system. Ecology 88: 1571-1581. <https://doi.org/10.1890/06-1335>.
- Vangansbeke D, Nguyen DT, Audenaert J, Verhoeven R, Gobin B, Tirry L, De Clercq P. 2016. Supplemental food for *Amblyseius swirskii* in the control of thrips: feeding friend or foe? Pest Manag Sci 72: 466-473. <https://doi.org/10.1002/ps.4000>.

Vangansbeke D, Duarte MV, Gobin B, Tirry L, Wäckers F, de Clercq P. 2019. Cold-born killers: exploiting temperature-size rule enhances predation capacity of a predatory mite. *Pest Manag Sci* 76: 1841-1846. <https://doi.org/10.1002/ps.5713>.

Veiga ACP, de Laurentis VL, Vacari AM, Volpe HXL, Ramalho DG, De Bortoli AA. 2014. Behavior of *Orius insidiosus* preying on *Aphis gossypii* reared on transgenic and conventional cotton varieties. *Acta Scientiarum* 36: 273-279. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17466>.

Wang S-X, Di N, Chen X, Zhang F, Biondi A, Desneux N, Wang S. 2019. Life history and functional response to prey density of the flower bug *Orius sauteri* attacking the fungivorous sciarid fly *Lycoriella pleuroti*. *J Pest Sci* 92: 715-722. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1032-7>.

Wiedenmann RN y Smith JW. 1997. Attributes of natural enemies in ephemeral crop habitats. *Biol Control* 10: 16-22. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0544>.

Woodward G, Ebenman B, Emmerson M, Montoya JM, Olesen JM, Valido A, Jens M, Warren PH. 2005. Body size in ecological networks. *Trends Ecol Evol* 20: 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.005>.

## Evaluación de la respuesta funcional en una población de *Orius laevigatus* seleccionada artificialmente para una mayor tolerancia a la alimentación con polen

A situation of prey shortage after the release of a natural enemy or under certain conditions throughout the crop cycle often negatively affects its establishment, and thus impairs the efficacy of augmentative biological control. Omnivorous predators, which are able to feed on a wide range of both animal and plant resources, provide a suitable approach to overcome this situation. We have recently informed about the successful achievement of an *Orius laevigatus* F. (Hemiptera: Anthocoridae) genetic line with a significantly enhanced fitness feeding on pollen. This pollen-tolerant strain exhibited superior reproductive and longevity records under constrained nutritional conditions. However, continued selection towards a specific character might in turn result in trade-offs, such as reduced predation capacity on their natural prey, which may impair its control efficiency. On the other hand, their higher performance on a suboptimal diet might be derived from a superior capability to exploit any available nutritional resource. Therefore, the predation rates and the extent of the range of prey of our pollen-tolerant population were tested prior its use in biological control programmes. To do that, functional responses at different densities of *Frankliniella occidentalis* P. (Thysanoptera: Thripidae) (adults and larvae) and *Myzus persicae* S. (Hemiptera: Aphididae) (nymphs) were studied in our improved *O. laevigatus* strain in comparison with a commercial population. As a result, no trade-offs were observed in predation rates on adults or larvae of western flower thrips in our pollen-tolerant variety. More importantly, it also showed higher predation capacity on aphid nymphs, thus demonstrating an expanded prey range and therefore a superior ability to exploit suboptimal quality resources. Implications of such enhanced features as a generalist predator on the dependence on the prey densities and the derived agronomic and industrial benefits are also discussed.

**E**l control biológico aumentativo ha demostrado ser un método eficiente y robusto de control de plagas en los cultivos de invernadero. Sin embargo, existen severas limitaciones para su implementación en algunos cultivos, áreas y/o periodos del año que comprometen su eficacia y dificultan su ampliación a otros cultivos o zonas agrícolas (Messelink y Janssen 2014, Bielza *et al* 2020), entre las cuales destaca la escasez de presas en ciertos momentos del ciclo del cultivo. Una respuesta recurrente a este contratiempo es el uso de enemigos naturales omnívoros en lugar de depredadores especialistas, los cuales son capaces de explotar una mayor variedad de recursos, incluidos los proporcionados por la propia planta, en circunstancias en las que no pueden acceder a un número de presas necesario para mantener sus efectivos poblacionales (Tommasini y Maini 2001, Symondson *et al* 2002, Lundgren *et al* 2009). Un ejemplo de programa

de control biológico aumentativo de gran éxito basado en depredadores omnívoros es el encarnado por el antocórido *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae), que forma parte de un sistema perfectamente implementado en numerosos cultivos de invernadero en los que lleva a cabo un control muy efectivo de las poblaciones del trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) (Chambers *et al* 1993, Sánchez *et al* 2000, van der Blom *et al* 2009, van Lenteren 2012). La clave de su eficacia radica en la posibilidad de realizar la suelta de este insecto de forma temprana, cuando la floración en la planta de pimiento está por debajo del 50%, dada su capacidad para alimentarse de la savia de la planta, del néctar de las flores y sobre todo del polen, un recurso nutricionalmente más rico, ya que permite la reproducción y el desarrollo de este enemigo natural (Cocuzza *et al* 1997b, Urbaneja *et al* 2005, Ingegno *et al* 2011, Bouagga *et al* 2018, Mendoza *et al* 2020a). De hecho, en general, el polen de abeja es un recurso prometedor en tanto que garantiza el mantenimiento de los niveles efectivos de numerosas especies de depredadores omnívoros (Messelink *et al* 2009, Vandekerkhove y de Clercq 2010), razón por la que se le ha tenido en cuenta como alimento alternativo suplementado en el cultivo (Leman y Messelink 2015), todo ello sin olvidar el bajo coste del polen si lo comparamos con los huevos de *Ephestia kuehniella* Z. (Lepidoptera: Pyralidae) o los quistes de *Artemia franciscana* K. (*Anostraca: Artemiidae*), muy utilizados en control biológico aumentativo (Ramakers y Voet 1995, de Clercq 2008, Messelink *et al* 2009, Brenard *et al* 2019, Benson y Labbe 2021).

Sin embargo, los atributos nutricionales de una dieta de origen vegetal tanto para *O. laevigatus* como para la mayoría de los enemigos naturales son inferiores a los de una dieta basada en su presa preferida, lo que afecta negativamente al potencial reproductivo del depredador y, por tanto, a su respuesta numérica (Cocuzza *et al* 1997b, Bernardo *et al* 2017, Mendoza *et al* 2020ab). En consecuencia, su establecimiento temprano en el cultivo se ve perjudicado, y el control frente a niveles bajos de densidad de la plaga ya no será tan efectivo como se pretendía. En este sentido, no siempre es posible encontrar nuevas especies de enemigos naturales capaces de mejorar el rendimiento de nuestro insecto y, por otro lado, estas especies están adaptadas a su entorno en virtud de la selección natural, mientras que las condiciones en las que los agentes de control biológico deben realizar su acción beneficiosa suelen ser muy diferentes a las naturales (Bielza *et al* 2020). Por ello, una nueva posibilidad de avance en el control biológico emerge con la mejora genética de los agentes de control biológico, una vez se ha probado la posibilidad de potenciar las características ideales para su desempeño en diferentes sistemas agrícolas gracias a la selección artificial (Balanza *et al* 2019, 2020, Dumond *et al* 2019, Mendoza *et al* 2020ab, Leung *et al* 2020).

Teniendo todo esto en cuenta, se llevó a cabo un amplio estudio, publicado por nuestro grupo de investigación y recogido en el Capítulo 3 de esta tesis, acerca de la variabilidad genética de la fecundidad en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus* cuando se les somete a una dieta basada exclusivamente en polen de abeja (Mendoza *et al* 2020a). Dicho estudio incluía un programa de mejora genética de este depredador en condiciones subóptimas de alimentación para obtener dos líneas (1POL-11 y 2POL-13) con mayor potencial reproductivo en condiciones de escasez o ausencia de presas. También se exploraron las relaciones y el coste ecológico que el proceso de mejora pudo suponer para otros componentes del potencial biótico, como el tiempo de desarrollo, la mortalidad juvenil o la longevidad, así como para el tamaño. Precisamente teniendo en cuenta que se halló un tamaño similar o incluso superior en estas líneas mejoradas (sobre todo en el caso de 2POL-11) con respecto a una serie de poblaciones de referencia (Mendoza *et al* 2020b), y que en estudios previos se había informado de una fuerte correlación entre la capacidad depredadora y el tamaño del depredador (Emmerson y Raffaelli 2004, Capítulo 4), este capítulo se centra en comprobar la eficacia como agentes de control biológico (ACBs) de nuestras líneas mejoradas para una mayor tolerancia al polen. Para ello, se han realizado una serie de bioensayos con el fin de estimar la respuesta funcional de *O. laevigatus* sobre su principal presa objetivo, el

trips de las flores, distinguiendo entre larvas y adultos, toda vez que este último estadio representa un reto frecuente para el depredador debido a su elevada movilidad y su tamaño más grande (Funderburk *et al* 2000, Báez *et al* 2004, Capítulo 4). Además, se ha evaluado la capacidad de depredación sobre una presa alternativa no preferida, el pulgón *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (Alvarado *et al* 1997, Messelink *et al* 2011, Bouagga *et al* 2018), para dilucidar si el proceso de cría ha tenido algún impacto en el espectro de presas típicamente atacadas por este insecto, lo que incide, a su vez, en la alternancia de presas. Según Murdoch (1969), la alternancia de presas por parte del depredador se asocia en general a una estabilidad en la dinámica de poblaciones. Así, un depredador polífago como *O. laevigatus* dotado con la habilidad de alternar entre presas sería capaz de regular la abundancia relativa de éstas y, de este modo, mediar en la coexistencia de diferentes tipos de presas (Murdoch 1969). Pero además, al atacar a múltiples presas tendría la capacidad de desestabilizar las interacciones con su presa principal. El resultado, en ambos casos, es un control de plagas más eficiente y estable en el tiempo (Krivan 1996). Con el fin de caracterizar a nuestras poblaciones mejoradas en este sentido, es necesario desgranar en detalle la interacción depredador-presa, incluyendo las respuestas funcionales y numéricas que incluyan la densidad de sus presas potenciales, en este caso trips y pulgones. Paralelamente, una vez demostrados los beneficios que tiene la adición de presas alternativas para el desarrollo de un depredador generalista en el cultivo (Sabelis y van Rijn 1997, Duarte *et al* 2015, Janssen y Sabelis 2015), estudiar la respuesta funcional sobre el pulgón nos ayudará a averiguar si una herramienta tan bien implementada en el control biológico como los sistemas *banker plants* o plantas reservorio inoculadas con pulgón (Huang *et al* 2011, Kumar *et al* 2020) puede o no servir como complemento funcional para optimizar la liberación en campo de nuestras líneas mejoradas, especialmente en situaciones de escasez de presas. Finalmente, se discute en este capítulo el impacto potencial de estas nuevas variedades de *O. laevigatus* en las biofábricas de insectos, así como su aplicabilidad en distintos cultivos.

## Materiales y métodos

### Cría de insectos

La población de *O. laevigatus* con una tolerancia al polen mejorada, en adelante 2POL-11, se obtuvo junto con 1POL-13 mediante un proceso de selección bien estructurado, y después se mantuvo con una dieta restringida que consistió en una mezcla de polen comercial deshidratado y huevos congelados de *E. kuehniella* a un tercio de su cantidad óptima, tal y como se explica en Mendoza *et al* (2020a) y en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral. De las dos poblaciones seleccionadas, se eligió a 2POL-11 en lugar de a 1POL-13 por la mayor ganancia obtenida en los caracteres del ciclo vital y en los parámetros reproductivos para la primera de ellas, tanto con una dieta óptima (huevos de *Ephesia*) como con una dieta subóptima (polen) (Mendoza *et al* 2020a, Capítulo 3). Como referencia o control se utilizó una población comercial de Agrobio mantenida *ad libitum* mediante huevos de *Ephesia* (Almería, España, ORIcontrol®). El mantenimiento y la multiplicación de estas poblaciones se llevó a cabo en condiciones controladas a  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y fotoperiodo 16:8 L: O.

Como presas para las poblaciones de *O. laevigatus* evaluadas se utilizaron ninfas de segundo estadio de *M. persicae*, así como adultos y ninfas de segundo estadio de *F. occidentalis*.

*M. persicae* se obtuvo de un sistema de cría llevado a cabo en la UPCT a partir de diferentes poblaciones de campo recogidas después de la floración, entre 2014 y 2015, en huertos de producción de melocotón (*Prunus persica* L) y nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* L) de toda España, tal y como se indica en Mezei *et al* (2020). Para llevar a cabo estos experimentos, se

utilizó una mezcla (después de varias generaciones) sincronizada de larvas de segundo estadio (3 ó 4 días de edad) criadas en plantas de pimiento, *Capsicum annuum* L (cv *herminio*).

También a partir de un sistema de cría establecido en la UPCT, se suministró una muestra de *F. occidentalis*, en este caso a partir de poblaciones de campo recogidas en invernaderos ecológicos del sureste de España, entre 2009 y 2010, y posteriormente mezcladas como se explica en Guillén *et al* (2014). Para la realización de los bioensayos se proporcionaron muestras sincronizadas de larvas de segundo estadio (6 - 7 días de edad) y de adultos jóvenes (15 - 17 días de edad).

### Capacidad depredadora y respuesta funcional

Para estudiar la capacidad de depredación sobre *M. persicae* se establecieron repeticiones de 5, 10, 20 y 30 ninfas de segundo estadio en recipientes de tipo salsera de polipropileno, de 38 mm de diámetro, con una sección circular (también de 38 mm de diámetro) de una hoja de pimiento centrada en su base, siempre con el envés hacia arriba y situada sobre una capa de agar al 1%. Cada recipiente se cubrió mediante una tapa ventilada gracias a una fina malla metálica. Antes del inicio de los experimentos, las hembras de *O. laevigatus* recién emergidas (en las últimas 24 h) estuvieron en contacto con pulgones durante un día para luego permanecer en estado de inanición durante un día más, tiempo durante el cual permanecieron en botes de plástico que contenían cáscara de trigo sarraceno como refugio para evitar el canibalismo y un vial lleno de agua y sellado con algodón como fuente de humedad. Finalmente, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada uno de los recipientes de ensayo. Además, se evaluó un control con diez ninfas de pulgón en cada repetición con el fin de comprobar su supervivencia en ausencia del depredador.

En el caso de *F. occidentalis*, tanto las larvas de segundo estadio como los individuos adultos se transfirieron a viales de plástico de 5 mL con una sección rectangular (30 x 5 mm) de hoja de pimiento en su interior, y sellados por medio de un tapón debidamente perforado que permitiese la aireación. Para los trips de segundo estadio se evaluaron densidades de 10, 20, 30 y 50 individuos por vial, así como un control con diez individuos por repetición y sin hembras de orius. Para los adultos se ensayaron densidades de 5, 10 y 30 individuos por vial, así como un control negativo. Finalmente, después de 24 horas de contacto entre los adultos de *O. laevigatus* y una población de trips, y tras 24 horas de ayuno, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada vial de plástico.

Se ensayaron diez repeticiones para cada población de *Orius*, para cada densidad de presas y de cada tipo de presa. Después de 24 horas, se retiró a los depredadores del escenario experimental, anotando el número de presas muertas. Finalmente, se congeló a las hembras de *Orius* y se midió la anchura del pronoto con un micrómetro óptico a 50 aumentos.

### Análisis estadístico

El tipo de respuesta funcional se determinó mediante un análisis de regresión logística a partir de la proporción de presas consumidas ( $N_c$ ) en función de la densidad inicial de presas ( $N_0$ ), utilizando el procedimiento de modelización de datos categóricos (PROC CATMOD) facilitado por Statistical Analysis System (SAS Institute 2001), a partir de la siguiente ecuación (Trexler y Travis 1993):

$$\frac{N_c}{N_0} = \frac{\exp(P_0 + P_1 N_0)}{1 + \exp(P_0 + P_1 N_0)} \quad (1)$$

, donde  $N_C$  es el número de presas consumidas,  $N_0$  es la densidad inicial de presas, y  $P_0$  y  $P_1$  son los coeficientes de determinación constante y lineal, respectivamente. Para hallar el tipo de respuesta funcional se verificó que el coeficiente de determinación lineal de la ecuación 1 era significativamente diferente de cero (Trexler y Travis 1993) mediante una prueba de verosimilitud logarítmica expresada como un valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con un grado de libertad. Así, para una respuesta funcional de tipo I, la curva de  $N_C / N_0$  frente a  $N_0$  tendrá una forma lineal si el término  $P_1$  de la ecuación no es significativamente distinto de cero; un valor negativo y significativo indicaría una respuesta de tipo II, en la que la proporción de presas consumidas disminuye paulatinamente a medida que aumenta el número inicial de presas ofrecidas; y un valor positivo y significativo indicaría una respuesta funcional de tipo III, que se caracteriza porque la proporción de presas consumidas está directamente relacionada con la densidad (Juliano 2001).

A continuación se ajustó la ecuación de discos de Holling (Holling 1959) a los resultados obtenidos mediante un procedimiento de regresión no lineal de mínimos cuadrados (PROC NLIN, SAS Institute 2001), con el fin de estimar los valores de los parámetros de la respuesta funcional, es decir, relativos al depredador, tal y como se indica a continuación:

$$N_C = \frac{\alpha N_0 T}{1 + \alpha N_0 T h} \quad (2)$$

, donde  $\alpha$  es la tasa de ataque instantánea de un depredador o eficacia de búsqueda,  $T$  es la cantidad total de tiempo disponible para la búsqueda (24 horas en este experimento) y  $T_h$  es el tiempo de manipulación para cada presa capturada, es decir, la proporción del tiempo de exposición que un depredador emplea en identificar, perseguir, matar, consumir y digerir a una presa. Los valores de  $T_h$  obtenidos se utilizaron para calcular la tasa máxima de ataque como  $T/T_h$  (Hassel 1978), que representa el número máximo de individuos presa que podrían ser consumidos por una hembra de *O. laevigatus* al cabo de 24 horas. De este modo se puede obtener una proporción óptima entre el número de depredadores y el de la plaga, lo que puede ser muy útil a la hora de optimizar la aplicación de una suelta inoculativa (Wang *et al* 2019).

Las curvas del número de presas consumidas por *O. laevigatus* a diferentes densidades de presa se representaron por medio del software Excel (Microsoft Corporation 2018).

Se llevó a cabo un test de regresión simple entre la proporción de presas muertas y la anchura del pronoto para determinar la influencia del tamaño de las hembras en su capacidad depredadora. Además, se comprobó la normalidad de todos los recuentos y proporciones mediante la prueba de Shapiro-Wilk, así como la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad) mediante la prueba de Levene. Las diferencias entre las densidades de presas fueron objeto de un ANOVA. Cuando se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, se separaron las medias mediante un test HDS de Tukey para  $p < 0.05$ . Por otro lado, se usaron test de muestras relacionadas de Wilcoxon para encontrar diferencias entre las tasas de depredación de 2POL-11 y las de Agrobio. Las diferencias entre poblaciones en cuanto a la anchura del pronoto se determinaron mediante una prueba t de Student de dos colas. Por último, mediante un ANOVA de un factor se comparó el número de presas muertas recuperadas de los controles. Para la prueba de regresión, los análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Student, se transformaron los recuentos y las proporciones a sus valores de raíz cuadrada y arcoseno, respectivamente, en caso de que no se cumplieren los supuestos de normalidad y homogeneidad. En todo momento, las hembras muertas se excluyeron del análisis.

## Resultados

El tamaño del cuerpo en cuanto a la anchura del pronoto de las hembras de *O. laevigatus* usadas como depredadores varió de forma consistente entre las dos líneas genéticas usadas en nuestro estudio ( $t = 6.160$ ,  $gl = 218$ ,  $p < 0.001$ ), con  $0.750 (\pm 0.006)$  mm para la cepa seleccionada tolerante al polen 2POL-11 y  $0.779 (\pm 0.007)$  mm para la población comercial Agrobio.

**Tabla 5.1.** Número de presas consumidas por cada hembra de *Orius laevigatus* en función de la densidad de diferentes tipos de presa.

Presa	Densidad de presas	Número de presas consumidas (media $\pm$ error estándar)	
		Agrobio	2POL-11
<i>Myzus persicae</i>	5	4.30 $\pm$ 0.26 Aa	5.00 $\pm$ 0.00 Ba
	10	8.10 $\pm$ 0.57 Ab	9.10 $\pm$ 0.23 Ab
	20	10.90 $\pm$ 0.80 Ac	13.30 $\pm$ 0.26 Bc
	30	13.40 $\pm$ 0.76 Ac	15.70 $\pm$ 0.37 Bd
2° estadio de <i>Frankliniella occidentalis</i>	10	9.70 $\pm$ 0.15 Aa	9.80 $\pm$ 0.13 Aa
	20	16.30 $\pm$ 0.70 Ab	18.20 $\pm$ 1.00 Ab
	30	24.60 $\pm$ 1.41 Ac	26.20 $\pm$ 0.81 Ac
	50	26.70 $\pm$ 1.44 Ac	30.50 $\pm$ 0.85 Ad
Adulto de <i>Frankliniella occidentalis</i>	5	2.70 $\pm$ 0.33 Aa	3.00 $\pm$ 0.26 Aa
	10	3.80 $\pm$ 0.47 Aa	4.10 $\pm$ 0.59 Aa
	30	7.10 $\pm$ 1.18 Ab	9.10 $\pm$ 0.66 Ab

Medias ( $\pm$  error estándar) seguidas de la misma letra minúscula dentro de una columna para cada presa (diferencias entre densidades) y de la misma letra mayúscula en la misma fila (diferencias entre poblaciones) no son diferentes significativamente (test HDS de Tukey,  $p > 0.05$ ).

Sin embargo, pese a su tamaño más pequeño, 2POL-11 mostró una tasa de depredación diaria claramente superior sobre ninfas de *M. persicae*, especialmente cuando la densidad de presas ofrecidas a cada ejemplar de *O. laevigatus* fue más elevada, con un valor medio ( $\pm$  error estándar) del  $77.4 \pm 6.3$  %, mientras que para Agrobio se registró una tasa de depredación del  $65.9 \pm 7.3$  % (prueba de rango con signo de Wilcoxon:  $n = 80$ ,  $Z = 535.0$ ,  $p < 0.05$ ). Cuando se ofrecieron larvas de segundo estadio y adultos de trips como presa, el patrón observado fue similar, aunque sin diferencias significativas entre las poblaciones en estos casos (larvas:  $n = 80$ ,  $Z = 657.5$ ,  $p = 0.166$ ; adultos:  $n = 60$ ,  $Z = 396.0$ ,  $p = 0.427$ ). En cualquier caso, las hembras mejoradas de *O. laevigatus* consumieron un 17, un 14 y un 28% más de pulgones, larvas y adultos de trips, respectivamente, que las comerciales a la densidad más alta evaluada (Tabla 5.1). Esta ausencia de correlación entre la tasa de depredación y el tamaño de las hembras se confirmó a altas densidades de presa ( $\geq 30$  presas ofrecidas / hembra), con sólo un 10.2% de la variación de la tasa de depredación explicada por la anchura del pronoto según un modelo de regresión lineal ( $R^2 = 0.102$ ,  $gl = 1 / 78$ ,  $p < 0.01$ ). De hecho, 26 hembras de 2POL-11 alcanzaron el 100% de depredación en comparación con las 16 que lo hicieron en Agrobio a pesar de su menor tamaño medio ( $0.752 \pm 0.012$  mm y  $0.808 \pm 0.018$  mm de anchura, respectivamente,  $t = 5.535$ ,  $gl = 40$ ,  $p < 0.001$ ).

Por otro lado, se encontró una relación positiva, sólida y relativamente constante entre la densidad de presas y la tasa de depredación de las hembras de *O. laevigatus* tanto para el pulgón (ANOVA:  $F = 67.34$ ,  $gl = 3 / 72$ ,  $p < 0.001$ ) como para el trips adulto ( $F = 17.85$ ,  $gl = 2 / 54$ ,  $p < 0.001$ ), independientemente de la población analizada (Tabla 5.1).

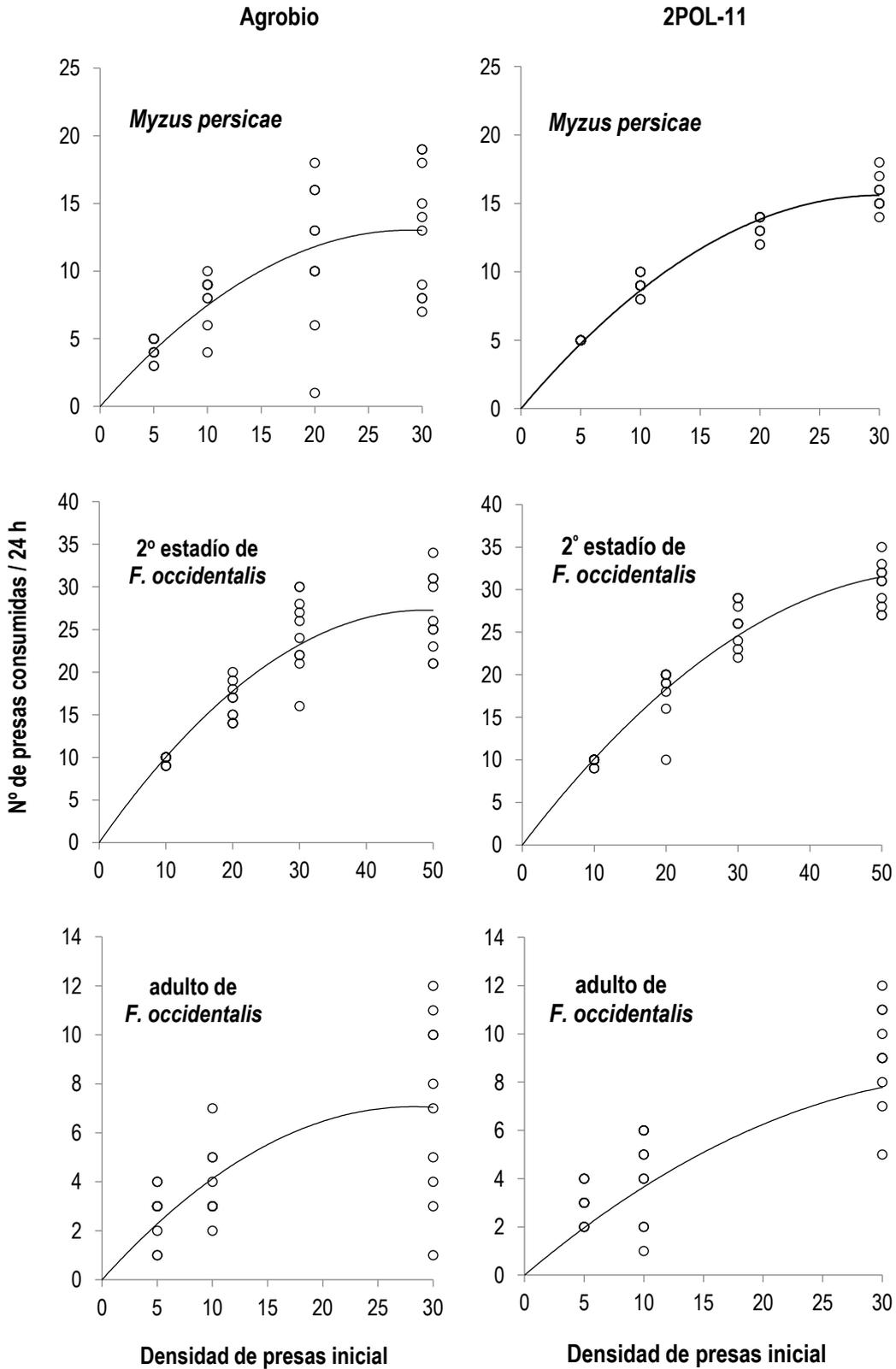
El coeficiente de determinación lineal ( $P_1$ ) de la regresión logística de las hembras de *O. laevigatus* sobre larvas de *M. persicae*, así como sobre larvas de segundo estadio y sobre adultos de trips, fue negativo en las dos poblaciones analizadas, Agrobio y 2POL-11, indicando la existencia de una respuesta funcional de tipo II para todas ellas (Tabla 5.2). Este tipo de respuesta se caracteriza, como se discutió en el Capítulo 4, por una curva hiperbólica en la que la tasa de depredación aumenta primero de forma casi lineal con el aumento en la densidad de presas, y a continuación se ralentiza paulatinamente hasta alcanzar un límite superior, una meseta o asíntota (Figura 5.1). No obstante, cabe destacar que el valor de la asíntota es ligeramente superior en 2POL-11 que en Agrobio independientemente de la presa ofrecida.

**Tabla 5.2.** Estimaciones de máxima verosimilitud a partir de regresiones logísticas de la proporción de distintas presas atacadas por hembras de *O. laevigatus* en base a la densidad inicial de presa.

Población	Presa	Parámetros	Estimación $\pm$ EE	$\chi^2$	$p$ -valor
Agrobio	<i>Myzus persicae</i>	$P_0$	1.939 $\pm$ 0.252	59.03	<0.0001
		$P_1$	-0.075 $\pm$ 0.010	52.41	<0.0001
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	3.115 $\pm$ 0.236	174.78	<0.0001
		$P_1$	-0.059 $\pm$ 0.006	114.15	<0.0001
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	0.115 $\pm$ 0.232	0.24	0.6208
		$P_1$	-0.043 $\pm$ 0.010	19.73	<0.0001
2POL-11	<i>Myzus persicae</i>	$P_0$	3.074 $\pm$ 0.320	92.29	<0.0001
		$P_1$	-0.103 $\pm$ 0.012	68.23	<0.0001
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	3.981 $\pm$ 0.295	182.23	<0.0001
		$P_1$	-0.071 $\pm$ 0.007	112.45	<0.0001
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	$P_0$	0.220 $\pm$ 0.230	0.92	0.3383
		$P_1$	-0.036 $\pm$ 0.009	14.26	0.0002

$P_0$ : coeficiente constante,  $P_1$ : coeficiente lineal, EE: error estándar,  $\chi^2$ : valores de chi-cuadrado con un grado de libertad.

Los coeficientes de tasa de ataque ( $\alpha$ , también denominada eficacia de búsqueda) y tiempo de manipulación ( $T_h$ ) fueron los parámetros utilizados para determinar la magnitud de la respuesta funcional de *O. laevigatus* (Fathipour *et al* 2017). Así, en nuestros bioensayos, las dos poblaciones ensayadas respondieron de forma similar al incremento en la densidad de presas, ajustándose estos dos parámetros de forma razonable a la respuesta funcional de tipo II (Tabla 5.3). La tasa de ataque más baja y los tiempos de manipulación más altos se registraron para el trips adulto, oscilando éstos entre 0.025 - 0.026 h<sup>-1</sup> y 1.3 - 2.1 h, respectivamente. En el extremo opuesto, menos de un tercio de este tiempo lo dedicaron las hembras de orius a alimentarse de las larvas de trips (0.4 - 0.5 h), con diferencia la presa más adecuada para ambas poblaciones estudiadas. Por otro lado, en la población comercial no se observaron diferencias significativas para la tasa de ataque entre el pulgón y el trips adulto, por lo que se puede considerar a ambas como presas no preferidas. Sin embargo, en la raza mejorada, 2POL-11, la tasa de ataque fue significativamente más baja sobre el trips adulto, indicando un rendimiento superior sobre el pulgón. Con respecto a la tasa de depredación máxima teórica ( $T/T_h$ ), ésta fue ligeramente superior en 2POL-11 que en Agrobio para los tres tipos de presas facilitadas, siendo la mejora adquirida superior para el trips adulto (un 64% más).



**Figure 5.1.** Respuesta funcional de las hembras de *O. laevigatus* de Agrobio (izqda) y 2POL-13 (dcha) a diferentes densidades de presas. Los puntos de valores y las líneas sólidas ajustadas representan el número de presas muertas y las predicciones según el modelo de Holling (1959), respectivamente.

**Tabla 5.3.** Parámetros de respuesta funcional (RF) de *Orius laevigatus* sobre diferentes presas.

Población	Presa	RF	$\alpha \pm EE$ (95% IC)	$T_h \pm EE$ (95% IC)	$T/T_h$	$R^2$	$gl$
Agrobio	<i>Myzus persicae</i>	II	$0.050 \pm 0.007$ (0.035 - 0.064)	$1.132 \pm 0.147$ (0.834 - 1.429)	21.20	0.75	39
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.057 \pm 0.007$ (0.042 - 0.072)	$0.512 \pm 0.068$ (0.374 - 0.649)	46.88	0.77	39
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.026 \pm 0.009$ (0.008 - 0.044)	$2.125 \pm 0.632$ (0,830 - 3.419)	11.29	0.40	29
2POL-11	<i>Myzus persicae</i>	II	$0.056 \pm 0.003$ (0.050 - 0.062)	$0.822 \pm 0.044$ (0,733 - 0,911)	29.20	0.96	39
	2º estadio de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.057 \pm 0.005$ (0.047 - 0.066)	$0.411 \pm 0,042$ (0,326 - 0,497)	58.39	0.89	39
	Adulto de <i>F. occidentalis</i>	II	$0.025 \pm 0.005$ (0.015 - 0.034)	$1,295 \pm 0,328$ (0,623 - 1,968)	18.53	0.72	29

EE: error estándar, IC: intervalos de confianza,  $\alpha$ : tasa de ataque ( $h^{-1}$ ),  $T_h$ : tiempo de manejo (h),  $T/T_h$ : tasa máxima de depredación ( $n^\circ$  de presas / hembra  $\cdot$  día).  $R^2$  es el coeficiente de determinación calculado como  $R^2 = 1 - (\text{suma de cuadrados de los valores residuales} / \text{suma total de cuadrados})$ .  $gl$  son los grados de libertad del análisis de la varianza (ANOVA) para el procedimiento de regresión no lineal (PROC NLIN, SAS Institute 2001) con el que se estimó el valor de los parámetros de la respuesta funcional.

La mortalidad de las presas fue muy baja en los viales del control negativo. En concreto, el número de insectos muertos observado en los controles estuvo en el rango de 1.3 - 2.6 % respecto de los números observados en tratamientos similares llevados a cabo con una hembra de *O. laevigatus* y 10 presas por vial, sin que se hayan observado diferencias significativas entre los tres tipos de presas ( $F = 2.24$ ,  $gl = 2 / 57$ ,  $p = 0.116$ ).

## Discusión

La cría continuada de un enemigo natural con una dieta diferente a la habitual puede provocar cambios en su fisiología o en su comportamiento. A su vez, esto puede conducir a una menor capacidad del enemigo natural para interactuar con su presa objetivo y, por tanto, a una menor eficiencia de control (Thompson y Hagen 1999, Grenier y de Clercq 2003). Para comprobar si esta posibilidad ha surgido como una consecuencia de nuestro proceso de selección para obtener una raza de *O. laevigatus* más tolerante al polen, se realizaron una serie de experimentos acerca de la tasa de depredación (número de presas consumidas por el depredador por unidad de tiempo) para dilucidar, por un lado, si se produjo algún cambio en la respuesta funcional del insecto y, por otro, si hubo algún cambio interesante en el rango de presas de esta nueva línea genética.

La tasa de depredación viene determinada por varios parámetros como la eficacia de búsqueda, el ratio de encuentro, la tasa de éxito y el tiempo de manipulación, con los tres primeros incluidos en la tasa de ataque (Holling 1959). Pues bien, en nuestros experimentos no encontramos diferencias ni en las tasas de ataque ni en los tiempos de manipulación de los adultos o de las larvas de trips entre nuestra raza mejorada de *O. laevigatus* y la población comercial. Por lo tanto, se puede concluir que no se ha producido coste ecológico alguno en la tasa de depredación de nuestros depredadores mejorados sobre sus presas favoritas como consecuencia del proceso de selección seguido hasta conseguir un rendimiento más elevado en la alimentación con polen. Por otra parte,

el tiempo de manipulación observado para los trips adultos fue significativamente mayor (2.2 - 4.2 veces), y la tasa de ataque fue la mitad para esta presa que para el segundo estadio del trips, con valores ligeramente más favorables para la raza seleccionada en comparación con la comercial. Asimismo, las tasas de ataque sobre el trips adulto también fueron la mitad de las obtenidas sobre pulgón, pero únicamente en 2POL-11 se observaron diferencias significativas entre ambas presas, revelando así una capacidad superior en esta línea seleccionada para someter a las ninfas de *Myzus*. En trabajos anteriores, *O. laevigatus* empleó hasta 1 h y 33 min en manipular una presa inadecuada como son las pupas de mosca blanca, pero sólo 17 min para el segundo estadio del trips (Montserrat *et al* 2000). Nuestros insectos, por su parte, emplearon alrededor de una hora en manipular cada ninfa de pulgón, hasta 1-2 horas para matar un trips adulto y menos de media hora para someter a una larva de trips. De todo ello se deduce, pues, que el trips adulto no es la presa más adecuada para *O. laevigatus* incluso después de la mejora conseguida tras nuestro proceso de selección (el tiempo de manipulación se redujo a la mitad). No en vano, como ya se discutió en el Capítulo 4, los trips adultos tienen mayor movilidad que sus larvas y, por tanto, pueden escapar al ataque del depredador, lo que hace que mueran más larvas independientemente de la densidad ofrecida. Por otro lado, también se sabe que el trips adulto se defiende moviendo rápidamente su abdomen y emitiendo una gota de líquido (Lewis 1997). Estas son algunas causas probables de las mayores tasas de ataque observadas contra las larvas y los mayores tiempos de manipulación registrados para el trips adulto, un patrón que se mantiene para nuestra población seleccionada a pesar de la especialización trófica adquirida para un mejor rendimiento con polen.

En cuanto a las ligeras diferencias en la tasa de depredación señaladas entre Agrobio y 2POL-11, es probable que éstas se deban a los mayores tiempos de manipulación detectados para la primera de ellas en los tres tipos de presas (1.2 - 1.6 veces), lo que se traduce en un menor tiempo dedicado a la búsqueda de presas en este caso. De hecho, se registró esta misma diferencia en la tasa de depredación máxima teórica entre poblaciones (1.2 - 1.6 veces) independientemente de la presa ofrecida, lo que sitúa a nuestra población tolerante al polen como un depredador de orden superior. Estos resultados son consistentes con los observados previamente (Capítulo 3, Mendoza *et al* 2020a) para las mismas poblaciones comerciales y seleccionadas cuando se alimentaban con una dieta óptima como huevos de *E. kuehniella*. Dado que en estas condiciones de alimentación se observó a las poblaciones tolerantes al polen anticipando su primera puesta de huevos, parece lógico que requieran de una tasa de depredación superior en el momento de la emergencia de los adultos, que es la edad a la que se han ensayado las hembras en este trabajo, sea cual sea el recurso que se les proporcione.

Otra evidencia de los tiempos de manipulación más cortos observados en 2POL-11 es claramente perceptible si atendemos a la curva de respuesta funcional, la cual describe la tasa de depredación en función de la densidad de presa y constituye el nexo de unión entre la dinámica del depredador y de la presa (Capítulo 4, Solomon 1949, Holling 1959). En nuestro caso, la respuesta funcional muestra en Agrobio una aceleración negativa más pronunciada hacia la asíntota como resultado de sus tiempos de manejo más largos, lo que conduce a tasas de depredación máximas teóricas más bajas en comparación con las de la raza tolerante al polen. Sin embargo, ambas poblaciones de *O. laevigatus* exhibieron una respuesta funcional de tipo II con independencia de la presa ofrecida, la cual se ha considerado en la literatura como típica de insectos depredadores (van den Meyracker y Sabellis 1999). En cualquier caso, un depredador con una respuesta funcional de tipo II constituye un instrumento muy útil para el control biológico inundativo, ya que es capaz de suprimir a la plaga en un intervalo de tiempo relativamente corto (Yang *et al* 2015). En este sentido, hay en la bibliografía numerosos estudios en los que *O. laevigatus* depreda sobre distintas plagas de invernadero, y en todo caso se comporta de acuerdo a este tipo de respuesta funcional (*F. occidentalis*: Montserrat *et al* 2000; *Tetranychus urticae* K.: Hassanpour *et al* 2016; *Aphis*

*glycines* M.: Hassanpour *et al* 2020; *Bemisia tabaci* G.: Pehlivan *et al* 2020). Y lo mismo ocurre para otras especies de *Orius* (*O. majusculus* R. sobre *F. occidentalis* y *Trialeurodes vaporariorum* W.: Montserrat *et al* 2000; *O. insidiosus* S. sobre *Aphis glycines*: Rutledge y O'Neil 2005; *O. albidipennis* R. sobre *Thrips tabaci* L.: Madadi *et al* 2007; *O. albidipennis* R. en *Aphis fabae* S.: Rashedi *et al* 2020; *O. niger* W. y *O. minutus* L. en *Tetranychus urticae* y *Thrips tabaci*: Fathi y Nouri-Ganbalani 2010; *O. insidiosus* en *A. gossypii* G.: Veiga *et al* 2014; *O. tricolor* W. con *Tuta absoluta* M.: Queiroz *et al* 2015; u *O. strigicolis* P. sobre *B. tabaci* y *T. vaporariorum* W.: Rehman *et al* 2020).

Cuando el control natural no es suficiente y para poder llevar a cabo un control efectivo a corto plazo se requiere de sueltas estacionales inoculativas o aumentativas, un enemigo natural debe ser particularmente rápido (con poca o ninguna demora) en su respuesta ante cualquier aumento repentino e impredecible en el número de presas, poseer una alta capacidad de dispersión, ser capaz de cambiar a presas más abundantes, agregarse en parches con alta densidad de presas y ser capaz de sobrevivir a bajas densidades de presas o incluso en periodos de ausencia de estas (Albajes *et al* 1999). Especialmente estas dos últimas cualidades hacen de nuestra raza tolerante al polen un buen depredador generalista, así como un eficiente especialista en trips, a pesar del desplazamiento trófico (hacia la fitozoofagia) que el proceso de mejora genética ha supuesto para ella, probablemente debido a su mayor plasticidad conductual y de desarrollo frente a ambientes y densidades de presa muy cambiantes. De hecho, no se encontraron diferencias en las tasas de depredación sobre el trips adulto entre las poblaciones comerciales y las mejoradas, ni a bajas ni a altas densidades de presas. En lo que respecta a las larvas de trips de *F. occidentalis*, Riudavets y Castañé (1998) y Bonte y de Clercq (2010) notificaron tasas de depredación en las hembras comerciales de *O. laevigatus* de unas 20 larvas de segundo estadio del trips durante 24 horas, valores en cualquier caso inferiores a los nuestros, especialmente en comparación con 2POL-11. Por el contrario, Montserrat *et al* (2000) observaron tasas de depredación de 15 larvas de trips durante sólo seis horas después de un periodo de inanición de 24 horas. Con respecto al trips adulto, Cocuzza *et al* (1997a) encontraron números bajos similares a los nuestros utilizando otra población comercial de *O. laevigatus*, con niveles de saciedad de 7 trips adultos por hembra en 24 horas. Por su parte, Tommasini *et al* (2004) y Shakya *et al* (2010) registraron valores ligeramente superiores en sus ensayos con *O. laevigatus*, *O. majusculus*, *O. niger* y *O. insidiosus*, oscilando entre 10.2 y 13.9 trips adultos por hembra y día.

Como ya se ha mencionado, una característica notable que nuestra población genéticamente mejorada ha adquirido a través del proceso de selección es la capacidad superior para cazar y alimentarse de una presa alternativa, en este caso de las etapas juveniles de *M. persicae*. En este contexto, a partir de sus experimentos de semicampo, Bouagga *et al* (2018) informaron de que las sueltas combinadas de *O. laevigatus* y *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) fueron capaces de regular eficazmente las poblaciones de *F. occidentalis* y *B. tabaci*, mientras que las de *M. persicae* quedaron completamente fuera de control, provocando el colapso de todas las plantas. Se ha planteado la posibilidad de que la preferencia de estos antocóridos por los trips se deba más a que depredador y presa tienen hábitats solapados que a una preferencia inherente a *Orius* spp por este tipo de presa (Hansen *et al* 2003, Báez *et al* 2004). Sin embargo, el control efectivo de esta plaga por parte de estas especies se ha demostrado ampliamente en cultivos de campo e invernadero (Sabelis y Van Rijn 1997, Riudavets y Castañé 1998, Funderburk *et al* 2000, Sánchez y Lacasa 2006), así como también se ha informado de casos fallidos al enfrentarse a otras presas como la mosca blanca (Arnó *et al* 2008) y especialmente los pulgones (Báez *et al* 2004, Messelink *et al* 2011, Messelink y Janssen 2014, Wang *et al* 2014, Bouagga *et al* 2018). En nuestro estudio, sin embargo, se registró una tasa de depredación significativamente más alta en 2POL-11 cuando se usaron pulgones como presa, especialmente a altas densidades, sugiriendo

así la posibilidad de alternar entre el trips y otras plagas que presumiblemente puedan concurrir en el cultivo de pimiento. Con todo, Alvarado *et al* (1997) y Hassanpour *et al* (2020) informaron de un número medio de 17 - 38 pulgones atacados por cada hembra de *O. laevigatus* de un total de 64 presas ofrecidas a 25 °C, aunque en este caso se utilizaron como presas individuos de *A. gossypii* de primer y segundo estadio, que apenas tienen la mitad del tamaño de las ninfas de segundo estadio de *M. persicae* usadas en nuestros experimentos (Sampaio *et al* 2008). De hecho, cuando Veiga *et al* (2014) evaluaron la respuesta funcional de *O. insidiosus* sobre ninfas de cuarto estadio de dos líneas diferentes de *A. gossypii*, ya con un tamaño similar a las nuestras, encontraron una tasa de depredación máxima de sólo 13-14 pulgones por hembra. Más concretamente, también se registraron tasas de depredación en *O. thripoborus* H. y *O. naivashae* P. sobre ninfas de *M. persicae* de solo 3 - 5 ninfas al día (Bonte y de Clercq 2015), valores claramente inferiores a los de nuestros ensayos con 2POL-11.

Esta ampliación observada en el rango de presas apropiadas en nuestra población seleccionada puede responder simplemente a una diferenciación en la estrategia de alimentación o simplemente a una optimización a la hora de someter al pulgón. Los depredadores hemípteros generalistas suelen atacar a presas móviles: son capaces de detectar movimientos y cazar a presas tan rápidas como el trips (Eubanks y Denno 2000), mientras que tienden a moverse de forma aleatoria por las plantas para encontrar presas estacionarias como los pulgones o las moscas blancas (Desneux y O'Neil 2008). Así, cabe la posibilidad de que nuestra cepa mejorada haya adquirido una capacidad optimizada para explorar y alimentarse en las hojas del pimiento además de en las flores, y por tanto lejos del polen que les sirve de suplemento. Esto estaría en línea con la mayor tolerancia a la inanición observada en nuestra línea mejorada en comparación con las poblaciones comerciales y silvestres (Mendoza *et al*, datos pendientes de publicación). En cualquier caso, es esperable que la habilidad para detectar, capturar y manipular un determinado tipo de presa (en este caso el pulgón) varíe entre los individuos de una población, por lo que es susceptible de seleccionarse de forma paralela durante nuestro proceso de mejora para una mayor tolerancia al polen. No en vano, los individuos tienen que hacer frente a una amplia gama de recursos que pueden variar en su calidad, cantidad y distribución (Bolnick *et al* 2003), de manera que, por ejemplo, la selección de aquellos individuos dotados de un estilete con la capacidad de succionar el polen de forma más eficiente podría llevar aparejada una mayor capacidad para someter al pulgón y alimentarse de él. Sea como fuere, la naturaleza de la respuesta funcional superior sobre los pulgones observada en 2POL-11 está aún por desvelarse, lo que abre nuevas vías de investigación en este sentido.

Dado que la calidad nutricional difiere entre los distintos tipos de presas (Eubanks y Denno 1999), las presas alternativas pueden complementarse nutricionalmente entre sí y formar juntas una dieta que dé mejores resultados que cada presa por separado (Evans *et al* 1999). Aunque un insecto generalista como *O. laevigatus* muestra preferencia por el trips como presa (por lo que debe estar siempre incluido en la dieta), cuando éste no es suficientemente abundante se pueden incorporar a la dieta presas subóptimas como el pulgón. En definitiva, la adquisición de una dieta más amplia podría permitirle a nuestra población mantener una presencia más estable en el agroecosistema, cambiando entre tipos de presas a medida que éstas varíen en abundancia con el tiempo (Wang *et al* 2014), lo cual es una característica valiosa para el control biológico, ya sea para su suelta o para la conservación de las poblaciones beneficiosas. Mediante la utilización de recursos alternativos, nuestros depredadores pueden incrementar su densidad al principio de la temporada (Butler y O'Neil 2007), antes incluso del surgimiento de las plagas, para posteriormente pasar a alimentarse de la plaga principal (Settle *et al* 1996).

Partiendo de esta misma base, la mayor capacidad de aprovechamiento de los pulgones por parte de nuestros insectos seleccionados, abre la posibilidad de utilizar los llamados *banker plants* o

plantas reservorio que, inoculadas con el pulgón del cereal *Ropalosiphum padi* L., promoverían el establecimiento a largo plazo de nuestro depredador en el cultivo. Estos sistemas están muy bien implementados en el control biológico de plagas, toda vez que sus beneficios en la instalación de numerosas especies de parasitoides están ampliamente documentados (Yano 2006, van Driesche *et al* 2008). El precedente más cercano lo encontramos en el Campo de Cartagena, donde en 2010 se intercalaron líneas de cereal en un cultivo de pimiento ecológico para más tarde infestar el cereal con pulgones específicos, favoreciendo la instalación de enemigos naturales de *M. persicae* que permitieron su control (Giménez-Marzo 2021). Esta estrategia, junto con la suplementación de las sueltas con polen, permitiría no sólo la supervivencia sino también la reproducción y, por tanto, la multiplicación de las poblaciones liberadas en el cultivo. La base de esta estrategia la puso de manifiesto Holt (1977) al demostrar que la adición de una nueva presa a un sistema formado por un depredador y una presa principal permitió incrementar las poblaciones del depredador compartido, lo que dio lugar a mayores tasas de depredación sobre ambos tipos de presas. Así, ambas presas reducían la abundancia de la otra en el equilibrio, incluso cuando no competían entre sí en absoluto. Este fenómeno se conoce como la hipótesis de la "competencia aparente" (Harmon y Andow 2004). En nuestro caso, si la presa añadida al sistema resulta inocua para la planta, ésta podría beneficiarse del impacto que aquélla ocasiona indirectamente a las poblaciones de trips a través del incremento provocado en la población del depredador. Pues bien, *R. padi* representa la presa no perjudicial ideal ya que, por un lado, no desencadenaría un aumento en los niveles de la plaga y, por otro, reduciría la dispersión por parte del depredador en ausencia del trips, en contraposición a lo que ocurre con el polen (Hulshof *et al* 2003, Skirvin *et al* 2007, Vangansbeke *et al* 2014, Leman y Messelink 2015). De hecho, van Rijn (2002) ya señaló cierta reducción en la asíntota de la respuesta funcional cuando se añadía suficiente cantidad de alimento alternativo a un sistema formado por el ácaro *Neoseiulus cucumeris* O. y por larvas de *F. occidentalis* y polen de *Typha latifolia* L. como depredador, presa y alimento suplementario, respectivamente. Del mismo modo, pese a que Calixto *et al* (2013) no hallaron diferencias cuando ofrecieron larvas de *F. occidentalis* a *O. insidiosus*, ya fuera solas o en combinación con polen de abeja, sí que informaron de una reducción significativa en la longevidad de las hembras, lo que a su vez afectó negativamente a las tasas de depredación. En cualquier caso, el incremento significativo de la longevidad con una dieta basada en polen que nuestro proceso de selección ha proporcionado a 2POL-11 (Capítulo 3, Mendoza *et al* 2020a), sitúa a nuestra población mejorada en una posición privilegiada a la hora de abordar este tipo de problemas.

La necesidad de recursos alternativos ante una baja densidad de presas en *O. laevigatus* ya había sido constatada como resultado de su baja eficacia (Burgio *et al* 2004), y también se han descrito los beneficios de la diversificación de la dieta en la tasa de desarrollo, así como en la fecundidad y en la persistencia del depredador (Wang *et al* 2014, Montserrat *et al* 2000). Y lo que es más importante, se ha comprobado que la adición de recursos alternativos como los dos presentados aquí (pulgones y polen) consigue mitigar la depredación intragremial en sistemas combinados de enemigos naturales (Holt y Huxel 2007), como ocurre con *O. laevigatus* y *A. swirskii*, favoreciendo su coexistencia y, por tanto, reduciendo la presión global de múltiples especies de plagas sobre los cultivos. Resulta entonces crucial dilucidar el impacto potencial del manejo del polen y de los pulgones como alimentos suplementarios en nuestra raza mejorada, tanto en sus parámetros de respuesta funcional como en sus interacciones con otros enemigos naturales, cuando se alimentan de sus presas favoritas. No en vano, Schausberger y Croft (2000) ya teorizaron acerca de la posibilidad de que la especialización de la dieta pueda afectar a la agresividad y a la preferencia de presas en el contexto de las relaciones intragremiales. En cualquier caso, este es un tema que se trata de forma específica en el Capítulo 6 de esta tesis.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede pensar en nuestra línea seleccionada de *O. laevigatus* como una valiosa herramienta de control integrado de plagas que se puede implementar de forma eficaz en cultivos productores de polen, pero también en cultivos menos o no productores de polen, todo ello a través de estrategias de suplementación con polen o por medio del empleo de plantas reservorio de pulgones. De hecho, Dissevelt *et al* (1995) observaron una diferencia clara en el desarrollo de las poblaciones de varias especies de *Orius* en cultivos productores de polen, como la fresa, la berenjena, el pimiento o el melón, en comparación con otros cultivos sin polen, como el pepino o el crisantemo. Por otro lado, van Rijn y Sabelis (1997) describieron cómo los antocóridos se vuelven por lo general más abundantes en períodos de mayor disponibilidad de polen. Además, en el cultivo de crisantemo, el polen de *Typha* frecuentemente se espolvorea como fuente de alimento adicional para favorecer la coexistencia de ácaros depredadores como estrategia de control del trips *F. occidentalis* (Skirvin *et al* 2006, Hoogerbrugge *et al* 2008). Y en los cultivos de pepino en los que las plantas macho y, por tanto, la disponibilidad de polen son escasas, se ha propuesto también añadir alimento suplementario como presas alternativas o polen para mejorar la eficacia de los enemigos naturales (Messelink *et al* 2014, Oveja *et al* 2016). Estos ejemplos podrían suponer un buen precedente para la aplicación de nuestra línea mejorada de *Orius* tolerante al polen en este tipo de cultivos, así como su coexistencia con *A. swirskii*. No en vano, cuando se libera al orius en un cultivo ya establecido, éste se distribuye normalmente en focos, por lo que el alimento también podría proporcionarse localmente en estos mismos focos donde se sueltan los depredadores. Esto permitiría a los antocóridos acaparar el alimento y reducir el riesgo de que éste acabe dando lugar a un aumento en la población de la plaga, como sugieren van Rijn *et al* (2002).

Por último, las elevadas tasas de depredación de nuestro estudio (hasta 30 larvas de trips por depredador y día en 2POL-11) pueden explicarse por la relativa sencillez del entorno de búsqueda empleado. Como se discutió en el Capítulo 4, los estudios de Isenhour y Yeargan (1981) apoyan esta idea, en tanto que encontraron una menor tasa de depredación cuando se ofrecían trips a *O. insidiosus* en superficies de hojas más grandes (65 cm<sup>2</sup>) que en otras más pequeñas (3.8 cm<sup>2</sup>). En nuestro estudio, un escenario a tan pequeña escala como los viales de plástico, puede tener poca similitud con determinados experimentos desarrollados en condiciones naturales. Efectivamente, este pequeño escenario experimental pudo acelerar la eficacia de búsqueda de los depredadores, permitiéndoles atacar repetidamente a presas que inicialmente pudieran escapar (Rehman *et al* 2020). Estos valores son, por tanto, cuestionables a la hora de generar buenas representaciones de los niveles medios de depredación natural y deberían, por eso, interpretarse con cautela, teniendo en cuenta las nulas posibilidades que tienen los trips de evitar la depredación (Kareiva 1990). Sin embargo, Báez *et al* (2004) encontraron que la depredación ocurre casi en su totalidad (87 - 100%) en el interior de la flor, y por tanto en un área natural de pequeño tamaño. Además, los antocóridos de nuestros experimentos mataron a sus presas sin consumirlas completamente, aunque éste es un comportamiento muy común en los antocóridos, e incluso se ha sugerido que aumenta su eficacia como ACBs (Isenhour y Yeargan 1981, de Clercq y Degheele 1994). Con todo, insistimos en el valor de nuestros resultados como primer paso para estimar la capacidad depredadora de una línea mejorada como la nuestra, aunque recomendamos que se lleven a cabo más estudios en esta línea.

En conclusión, nuestra población seleccionada para un mejor rendimiento con polen, lejos de mostrar coste ecológico alguno en la capacidad depredadora como resultado de nuestro proceso de selección, presenta características mejoradas como depredador generalista en comparación con una población comercial tan contrastada como la de Agrobio. La respuesta funcional obtenida en presencia de su presa preferida, el trips de las flores tanto en su forma larvaria como en su estado adulto, es similar o incluso superior en nuestra línea de insectos. Pero la principal ganancia

adquirida a través del proceso de mejora llevado a cabo es un rango de presas más amplio, atendiendo al rendimiento significativamente mejorado de la población seleccionada cuando se le suministra una presa *a priori* menos adecuada como es el pulgón. Este atributo, junto con el rendimiento superior con una dieta basada exclusivamente en polen, hace que nuestras líneas mejoradas sean menos dependientes de la densidad de su presa principal, lo que ofrece ventajas tanto a nivel agronómico como desde el punto de vista industrial. En primer lugar, permite un establecimiento más eficaz al inicio del cultivo del pimiento y una mayor resistencia frente a situaciones de reducción en los niveles de población del trips, así como una coexistencia mejorada con otros enemigos naturales. En segundo lugar, su aplicación es aprovechable en el manejo de cultivos en los que la producción de polen es escasa o nula, como el pepino y el crisantemo, en este caso asistida por una suplementación con *banker plants* de pulgones o con polen de abeja. Finalmente, teniendo en cuenta la menor dependencia de un alimento altamente nutritivo como son los huevos de *Ephestia*, la cría a gran escala en biofábricas de nuestra línea seleccionada podría suponer un ahorro sustancial también para los proveedores comerciales. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios en condiciones de semicampo y de campo antes de su uso extensivo en cultivos comerciales.

## Referencias

- Albajes R, Gullino ML, van Lenteren JC, Elad Y. 1999. Integrated pest and disease management in greenhouse crops, Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 545.
- Alvarado P, Batala O, Alomar O. 1997. Efficiency of four Heteroptera as predators of *Aphis gossypii* and *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae). *BioControl* 42: 215-226. <https://doi.org/10.1007/BF02769899>.
- Arnó J, Roig J, Riudavets J. 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisa tabaci* and estimation of their prey preference. *Biol Control* 44: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.009>.
- Báez I, Reitz SR y Funderburk JE. 2004. Predation by *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) on life stages and species of *Frankliniella* flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in pepper flowers, *Environ Entomol* 33 (3): 662-670. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.3.662>.
- Benson CL, Labbe RM. 2021. Exploring the role of supplemental foods for improved greenhouse biological control. *Ann Entomol Soc Am* 20 (20): saab005. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab005>.
- Bernardo AMG, de Oliveira CM, Oliveira RA, Vacacela HE, Venzon M, Pallini A, Janssen A. 2017. Performance of *Orius insidiosus* on alternative foods. *J Appl Entomol* 141: 702-707. <https://doi.org/10.1111/jen.12390>.
- Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>.
- Bolnick DI, Svanback R, Fordyce JA, Yang LH, Davis JM, Hulsey CD, Forister ML. 2003. The ecology of individuals: incidence and implications of individual specialization. *Am Nat* 161: 1-28. <https://doi.org/10.1086/343878>.

- Bonte M, de Clercq P. 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 55: 625-629. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9275-0>.
- Bonte M, de Hauwere L, Des Conlong, de Clercq P. 2015. Predation capacity, development and reproduction of the southern African flower bugs *Orius thripoborus* and *O. naivashae* (Hemiptera: Anthocoridae) on various prey *Biol Control* 86: 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.007>.
- Bouagga S, Urbaneja A, Pérez-Hedo M. 2018. Combined use of predatory mirids with *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) to enhance pest management in sweet pepper. *J Econ Entomol* 111(3): 1112-1120. <https://doi.org/10.1093/jee/toy072>.
- Bouagga S, Urbaneja A, Rambla JL, Granell A, Pérez-Hedo M. 2017. *Orius laevigatus* strengthens its role as a biological control agent by inducing plant defenses. *J Pest Sci* 91: 55-64. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0886-4>.
- Brenard N, Sluydts V, Christianen E, Bosmans L, De Bruyn L, Moerkens R, Leirs H. 2019. Biweekly supplementation with *Artemia* spp. cysts allows efficient population establishment by *Macrolophus pygmaeus* in sweet pepper. *Entomol Experi Appli* 167: 406-414. <https://doi.org/10.1111/eea.12776>.
- Burgio G, Tommasini MG, van Lenteren JC. 2004. Population dynamics of *Orius laevigatus* and *Frankliniella occidentalis*: a mathematical modeling approach. *Bull Insectol* 57(2): 131-135.
- Butler CD, O'Neil RJ. 2007. Life history characteristics of *Orius insidiosus* (Say) fed diets of soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura and soybean thrips, *Neohydatothrips variabilis* (Beach). *Biol Control* 40: 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.12.006>.
- Calixto A, Bueno V, Montes F, Silva A, van Lenteren J. 2013. Effect of different diets on reproduction, longevity and predation capacity of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Biocontrol Sci Techn* 23: 1245-1255. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822850>.
- Chambers RJ, Long S, Helyer BL. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the United Kingdom. *Biocontrol Sci Technol* 3: 295-307. <https://doi.org/10.1080/09583159309355284>.
- Cocuzza GE, de Clercq P, Lizzio S, van de Veire M, Tirry L, Degheele D, Vacante V. 1997. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* at three constant temperatures. *Entomol Exp Appl* 85: 189-198. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00249.x>
- Cocuzza GE, de Clercq P, van de Veire M, de Cock A, Degheele D, Vacante V. 1997. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomol Exp Appl* 82(1): 101-104. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00118.x>.
- De Clercq P. 2008. Culture of natural enemies on factitious foods and artificial diets, p. 262. En: Capinera JL (ed), *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht.
- De Clercq P y Degheele D. 1994. Laboratory measurement of predation by *Podisus maculiventris* and *P. sagitta* (Hemiptera: Pentatomidae) on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 87: 76-83. <https://doi.org/10.1093/jee/87.1.76>.

Desneux N, O'Neil RJ. 2008. Potential of an alternative prey to disrupt predation of the generalist predator, *Orius insidiosus*, on the pest aphid, *Aphis glycines*, via short-term indirect interactions. *Bull Entomol Res.* 98: 631-639. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006238>.

Disselvelt M, Altena K, Ravensberg W. 1995. Comparison of different *Orius* species for control of *Frankliniella occidentalis* in glasshouse vegetable crops in the Netherlands. *Med Fac Landbouw Rijksuniver, Gent, Belgium*, 60 (3): 839-845.

Duarte MVA, Venzon M, Bittencourt MCS, Rodríguez-Cruz FA, Pallini A, Janssen A. 2015. Alternative food promotes broad mite control on chilli pepper plants. *BioControl* 60: 817-825. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9688-x>.

Emmerson MC, Raffaelli D. 2004. Predator-prey body size, interaction strength and the stability of a real food web. *J Anim Ecol* 73: 399-409. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00818.x>.

Eubanks MD, Denno RF. 1999. The ecological consequences of variation in plants and prey for an omnivorous insect. *Ecology* 80: 1253-1266. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[1253:TECOVI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[1253:TECOVI]2.0.CO;2).

Eubanks MD, Denno RF. 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* 25: 140-146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00243.x>.

Evans EW, Stevenson AT, Richards DR. 1999. Essential versus alternative foods of insect predators: benefits of a mixed diet. *Oecologia* 121: 107-112. <https://doi.org/10.1007/s004420050911>.

Fathi SAA, Nouri-Ganbalani G. 2010. Assessing the potential for biological control of potato field pests in Ardabil, Iran: functional responses of *Orius niger* (Wolf) and *O. minutus* (L) (Hemiptera: Anthocoridae). *J Pest Sci* 83: 47-52. <https://doi.org/10.1007/s10340-009-0270-0>.

Fathipour Y, Karimi M, Farazmand A, Talebi AA. 2017. Age-specific functional response and predation rate of *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) on two-spotted spider mite. *Syst Appl Acarol UK* 22 (2): 159-169. <https://doi.org/10.11158/saa.22.2.1>.

Funderburk J, Stavinsky J, Olson S. 2000. Predation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in field pepper by *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 29 (2): 376-382. <https://doi.org/10.1093/ee/29.2.376>.

Grenier S, de Clercq P. 2003. Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. En: van Lenteren JC (ed), *Quality control and the production of biological control agents: theory and testing procedures*. CAB International, Cambridge, USA, pp 115-131.

Guillén J, Navarro M, Bielza, P. 2014. Cross-resistance and baseline susceptibility of spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 107 (3): 1239-1244. <https://doi.org/10.1603/EC13397>.

Hansen EA, Funderburk JE, Reitz SR, Ramachandran S, Eger JE, Mcauslane H. 2003. Within-plant distribution of *Frankliniella* species (Thysanoptera: Thripidae) and *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) in field pepper. *Environ Entomol* 32: 1035-1044. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1035>.

- Harmon JP y Andow DA. 2004. Indirect effects between shared prey: Predictions for biological control. *BioControl* 49: 605-626. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-0420-5>.
- Hassanpour M, Yaghmaei A, Golizadeh A, Raffei-Dastjerdi H, Mottaghinia L. 2016. Temperature-dependent functional response of the predatory bug *Orius laevigatus* (Fieber) preying upon the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Koch). *J Appl Res Plant Prot* 5 (1): 17-34.
- Hassanpour M, Yaghmaee A, Golizadeh A, Rafiee-Dastjerdi H, Mottaghinia L. 2020. Functional response and consumption rate of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) feeding on the melon aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) at three different temperatures. *J Crop Prot* 9 (1): 101-113.
- Hassel MP. 1978. The dynamics of arthropod predator-prey systems. Princeton, University Press, Princeton, NJ, 237 pp.
- Holling CS. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Can Entomol* 91: 385-389. <https://doi.org/10.4039/Ent91385-7>.
- Holt RD. 1977. Predation, apparent competition and the structure of prey communities. *Theor Popul Biol* 12: 197-229. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(77\)90042-9](https://doi.org/10.1016/0040-5809(77)90042-9).
- Holt RD, Huxel GR. 2007. Alternative prey and the dynamics of intraguild predation: theoretical perspectives. *Ecology* 88: 2706-2712. <https://doi.org/10.1890/06-1525.1>.
- Hoogerbrugge H, van Houten Y, van Baal E, Bolckmans K. 2008. Alternative food sources to enable establishment of *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) on chrysanthemum without pest presence. *Bull OILB/SROP* 32: 79-82.
- Huang NX, Enkegaard A, Osborne LS, Ramakers PMJ, Messelink GJ, Pijnakker J, Murphy G. 2011. The banker plant method in biological control. *Crit Rev Plant Sci* 30: 259-278. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.572055>.
- Hulshof J, Ketoja E, Vanninen I. 2003. Life history characteristics of *Frankliniella occidentalis* on cucumber leaves with and without supplemental food. *Entomol Exp Appl* 108: 19-32. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00061.x>.
- Ingegno BL, Pansa MG, Tavella L. 2011. Plant preference in the zoophytophagous generalist predator *Macrolophus pygmaeus* (Heteroptera: Miridae). *Biol Control* 58: 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.003>.
- Isenhour DJ, Yeagan KV. 1981. Predation by *Orius insidiosus* on the soybean thrips, *Sericothrips variabilis*: Effect of prey stage and density. *Environ Entomol* 10: 496-500. <https://doi.org/10.1093/ee/10.4.496>.
- Janssen A, Sabelis MW. 2015. Alternative food and biological control by generalist predatory mites: the case of *Amblyseius swirskii*. *Exp Appl Acarol* 65: 413-418. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9901-8>.
- Juliano SA. 2001. Non-linear curve fitting: predation and functional response curves. En: Scheiner SM y Gurevitch J (eds), *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman y Hall, pp 178-196.

- Kareiva P. 1990. The spatial dimension in pest-enemy interactions. En: Mackauer M, Ehler LE, Roland J (eds), *Critical issues in biological control*, Intercept, Andover, pp 213-227.
- Krivan V. 1996. Optimal foraging and predator-prey dynamics. *Theor Popul Biol* 49: 265-290. <https://doi.org/10.1006/tpbi.1996.0014>.
- Kumar V, McKenzie CL, Avery PB, Osborne LS. 2020. Suitability of ornamental pepper cultivars as banker plants for the establishment of predatory mite *Amblyseius swirskii* in controlled production. *Sustainability* 12 (19): 8031. <https://doi.org/10.3390/su12198031>.
- Leman A, Messelink GJ. 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experim Appli Acar* 65: 511-524. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9859-y>.
- Leung K, Ras E, Ferguson K, Ariëns S, Babendreier D, Bijma P, Bourtzis K, Brodeur J, Bruins M, Centurión A, Chattington S, Chinchilla-Ramírez M, Dicke M, Fatouros N, González Cabrera J, Groot T, Haye T, Knapp M, Koskinioti P, Le Hesran S, Lirakis M, Paspati A, Pérez-Hedo M, Plouvier W, Schlötterer C, Stahl J, Thiel A, Urbaneja A, van de Zande L, Verhulst E, Vet L, Visser S, Werren J, Xia S, Zwaan B, Magalhães S, Beukeboom L, Pannebakker B. 2020. Next Generation Biological Control: The Need for Integrating Genetics and Evolution. Preprints 2019: 2019110300. <https://doi.org/10.20944/preprints201911.0300.v1>.
- Lewis T. 1997. Pest thrips in perspective. En: Lewis T (ed), *Thrips as Crop Pests*. CAB Oxon, UK, pp 1-13.
- Lundgren JG. 2009. Relationships of natural enemies and non-prey foods progress in biological control. Springer Science, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9235-0>.
- Madadi H, Enkegaard A, Brodsgaard H, Kharrazi-Pakdel A, Mohaghegh J, Ashouri A. 2007. Host plant effects on the functional response of *Neoseiulus cucumeris* to onion thrips larvae. *J Appl Entomol* 131: 728-733. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01206.x>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020a. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. *J Pest Sci* 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01291-x>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020b. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biol Control* 148: 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>.
- Messelink G, Janssen A. 2014. Increased control of thrips and aphids in greenhouses with two species of generalist predatory bugs involved in intraguild predation. *Biol Control* 79: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.009>.
- Messelink GJ, Bennison J, Alomar O, Ingegno BL, Tavella L, Shipp L, Palevsky E, Wäckers FL. 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *Biocontrol* 59: 377-393. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9579-6>.
- Messelink GJ, Bloemhard CMJ, Kok L, Janssen A. 2011. Generalist predatory bugs control aphids in sweet pepper. *IOBC/WPRS Bull* 68: 115-118.
- Messelink GJ, Ramakers PMJ, Cortez JA, Janssen A. 2009. How to enhance pest control by generalist predatory mites in greenhouse crops. En: Mason PG, Gillespie DR, Vincent C (eds), *Proceedings of the 3rd ISBCA*. Christchurch, New Zealand, pp 309-318.

Mezei I, Bielza P, Siebert MW, Torne M, Gomez LE, Valverde-Garcia P, Belando A, Moreno I, Gravalos C, Cifuentes D, Sparks TC. 2020. Sulfoxaflor efficacy in the laboratory against imidacloprid-resistant and susceptible populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*: Impact of the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Physiol* 166: 104582. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104582>.

Microsoft Corporation. 2018. Microsoft Excel. Disponible en <https://office.microsoft.com/excel>.

Montserrat M, Albajes R, Castañe C. 2000. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environ Entomol* 29: 1075-1082. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.5.1075>.

Murdoch WW. 1969. Switching in general predators: experiments on predator specificity and stability of prey populations. *Ecol Monogr* 39: 335-342. <https://doi.org/10.2307/1942352>.

Oveja MF, Riudavets J, Arnó J, Gabarra R. 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *Biocontrol* 61: 47-56. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9690-3>.

Pehlivan S, Alinç T, Achiri TD, Atakan E. 2020. Functional responses of two predatory bugs (Hemiptera: Anthocoridae) to changes in the abundance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Eur J Entomol* 117: 49-55. <https://www.doi.org/10.14411/eje.2020.005>.

Queiroz OS, Ramos RS, Gontijo LM, Picanço MC. 2015. Functional response of three species of predatory pirate bugs attacking eggs of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Entomol* 44: 246-251. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu026>.

Ramakers PMJ, Voet SJP. 1995. Use of castor bean, *Ricinus communis*, for the introduction of the thrips predator *Amblyseius degenerans* on glasshouse-grown sweet pepper. *Meded Fac Landbouww Rijsuniv, Gent*, 60 (3a): 885-891.

Rashedi A, Rajabpour A., Sohani NZ, Rasekh A. 2020. Prey stage preference and functional response of *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae). *Int J Trop Insect Sci* 40: 13-19. <https://doi.org/10.1007/s42690-019-00045-2>.

Rehman SU, Zhou X, Ali S, Asim Rasheed M, Islam Y, Hafeez M, Aamir Sohail M, Khurram H. 2020. Predatory functional response and fitness parameters of *Orius strigicollis* Poppius when fed *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* as determined by age-stage, two-sex life table *PeerJ* 8: e9540. <http://doi.org/10.7717/peerj.9540>.

Riudavets J, Castañe C. 1998. Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in the Mediterranean. *Environ Entomol* 27: 86-93. <https://doi.org/10.1093/ee/27.1.86>.

Rutledge CE, O'Neil RJ. 2005. *Orius insidiosus* (Say) as a predator of the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura. *Biol Control* 33: 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.01.001>.

Sabelis MW, van Rijn PCJ. 1997. Predation by insects and mites. En: Lewis T (ed), *Thrips as crop pests*. CAB International, Wallingford, UK, pp 259-354.

- Sampaio MV, Bueno VHP, De Conti BF. 2008. The effect of the quality and size of host aphid species on the biological characteristics of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Eur J Entomol*. 105: 489-494.
- Sánchez JA, Alcázar A, Lacasa A, Llamas A, Bielza P. 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. *IOBC/WPRS Bull* 23: 21-30.
- Sánchez JA, Lacasa A. 2006. A biological pest control story. *IOBC/WPRS Bull* 29 (4): 19-24.
- SAS Institute. 2001. *SAS/STAT user's guide*. Cary, NC: SAS Institute.
- Schausberger P, Croft BA. 2000. Cannibalism and intraguild predation among phytoseiid mites: Are aggressiveness and prey preference related to diet specialization? *Exp Appl Acarol* 24: 709-725. <https://doi.org/10.1023/A:1010747208519>.
- Settle WH, Ariawan H, Astuti ET, Cahyana W, Hakim AL, Hindayana A, Lestari AS. 1996. Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. *Ecology* 77: 1975-1988. <https://doi.org/10.2307/2265694>.
- Shakya S, Coll M, Weintraub PG. 2010. Incorporation of intraguild predation into a pest management decision-making tool: The case of thrips and two pollen-feeding predators in strawberry. *J Econ Entomol* 103: 1086-1093. <https://doi.org/10.1603/EC09373>.
- Skirvin D, Kravar-Garde L, Reynolds K, Jones J, de Courcy Williams M. 2006. The influence of pollen on combining predators to control *Frankliniella occidentalis* in ornamental chrysanthemum crops. *Biocontrol Sci Technol* 16: 99-105. <https://doi.org/10.1080/09583150500258636>.
- Solomon ME. 1949. The natural control of animal populations. *J Anim Ecol* 18: 1-35.
- Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annu Rev Entomol* 47: 561-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>.
- Thompson S, Hagen K. 1999. Nutrition of entomophagous insects and other arthropods. En: Bellows T, Fisher T (eds), *Handbook of Biological Control*. Academic Press, New York, pp. 594-652.
- Tommasini MG, Maini S. 2001. Thrips control on protected sweet pepper crops: enhancement by means of *Orius laevigatus* releases. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*, pp 249-256.
- Tommasini MG, van Lenteren JC, Burgio G. 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. *Bull Insectol* 57: 79-93.
- Trexler, J. C. and Travis, J. 1993. Nontraditional regression analysis. *Ecology* 74, 1629-1637.
- Urbaneja A, Tapia G, Stansly P. 2005. Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae). *Biocontrol Sci Tech* 15: 513-518. <https://doi.org/10.1080/09583150500088777>.
- Van den Meiracker RAF, Sabelis MW. 1999. Do the functional of predatory arthropods reach a plateau level? A case study of *Orius insidiosus* with western flower thrips as prey. *Entomol Exp Appl* 90: 225-234. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00452.x>.

- Van der Blom J, Robledo A, Torres S, Sánchez JA. 2009. Consequences of the wide scale implementation of biological control in greenhouse horticulture in Almería, Spain. *IOBC/WPRS Bull.* 49: 9-13.
- Van Driesche RG, Lyon S, Sanderson JP, Bennett KC, Stanek EJ, Zhang R. 2008. Greenhouse trials of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae) banker plants for control of aphids (Hemiptera: Aphididae) in greenhouse spring floral crops. *Fla Entomol* 91 (4): 583-591. <https://doi.org/10.1653/0015-4040-91.4.583>.
- Van Lenteren JC. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *Biocontrol* 57 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>.
- Van Rijn PCJ. 2002. The impact of supplementary food on a prey-predator interaction. PhD Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.
- Vandekerkhove B, De Clercq P. 2010. Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. *Biol Control* 53: 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.005>.
- Vangansbeke D, Nguyen DT, Audenaert J, Verhoeven R, Gobin B, Tirry L, de Clercq P. 2014. Food supplementation affects interactions between a phytoseiid predator and its omnivorous prey. *Biol. Control* 76, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.001>.
- Veiga ACP, de Laurentis VL, Vacari AM, Volpe HXL, Ramalho DG, De Bortoli AA. 2014. Behavior of *Orius insidiosus* preying on *Aphis gossypii* reared on transgenic and conventional cotton varieties. *Acta Scientiarum* 36: 273-279. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17466>.
- Wang S-X, Di N, Chen X, Zhang F, Biondi A, Desneux N, Wang S. 2019. Life history and functional response to prey density of the flower bug *Orius sauteri* attacking the fungivorous sciarid fly *Lycoriella pleuroti*. *J Pest Sci* 92: 715-722. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1032-7>.
- Wang S, Michaud JP, Tan XL, Zhang F. 2014. Comparative suitability of aphids, thrips and mites as prey for the flower bug *Orius sauteri* (Hemiptera: Anthocoridae). *Eur J Entomol* 111: 221-226. <https://doi.org/10.14411/eje.2014.031>.
- Yang XB, Campos-Figueroa M, Silva A, Henne DC. 2015. Functional response, prey stage preference, and mutual interference of the *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) on tomato and bell pepper. *J Econ Entomol* 108: 414-424. <https://doi.org/10.1093/jee/tou048>.
- Yano E. 2006. Ecological considerations for biological control of aphids in protected culture. *Popul Ecol* 48: 333. <https://doi.org/10.1007/s10144-006-0008-2>.

## Importancia de la diversificación de la dieta en la coexistencia entre *Orius laevigatus* y *Amblyseius swirskii*: alternancia de presas y depredación intragremial

Omnivores obtain resources from more than one trophic level, and choose their food based on quantity and quality of these resources. Because of that, they usually engage in intraguild predation relationships when prey are scarce. Minute pirate bugs *Orius laevigatus* are an example of omnivores that become superior predators of the predatory mites *Amblyseius swirskii* when they are released in a combined system under low levels of the preferred prey, the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Here we test two genetically enhanced *O. laevigatus* strains for a bigger size and a better fitness feeding on pollen (BIG30 and 2POL-11, respectively), hence with a wider dietary diversification, to elucidate the potential effects on prey preference and intraguild predation on the predatory mite, in comparison with a commercial population. To do that, predation rates were registered on adult phytoseiids solely or in a choice situation at different availability ratios of adult western flower thrips under laboratory conditions. The effect of pollen as supplemental food on intraguild predation and prey preference was examined, too. We found that the two of our enhanced lines killed up to 9% less predatory mites and fed preferably on adult thrips, compared to the population commercially available. While BIG30 showed a significantly higher total predation rate, killing up to 150% more adult thrips than expected as a consequence of the bigger size acquired, 2POL-11 is defined as an efficient resources exploiter, since its ability to effectively switch between different prey and pollen allows it to evade adult thrips defenses with little need to engage in intraguild predation. Pollen supplementation had a significant effect on reducing intraguild predation, but only for 2POL-11 the influence on prey preference was significant. The theory of intraguild predation and the impact of prey switching on food webs and biological control strategies are also discussed.

La omnivoría es una estrategia de alimentación que reporta al chinche *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) una ventaja diferencial frente a otros depredadores al permitirle permanecer durante más tiempo en el cultivo, evitando una acumulación rápida posterior de las poblaciones de plagas (Coll 1998, Eubanks y Denno 2000, van Rijn *et al* 2002). Sin embargo, cuando los niveles de plaga se reducen y se espera que los depredadores omnívoros que se alimentan de los recursos vegetales de los que dispone en el cultivo, como el polen o el néctar, expresen su condición diferencial, éstos tienden sin embargo a intensificar algunas interacciones competitivas que van en detrimento del control biológico, atacando y consumiendo ya sea a sus congéneres (canibalismo) o a otros depredadores (depredación intragremial, DIG). En concreto, esta última situación se da en el ya mencionado sistema combinado ampliamente utilizado en el control biológico de las plagas clave del pimiento de invernadero: el trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) y la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). Dicho sistema está formado por el propio *O. laevigatus* y por el ácaro depredador *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) (Chambers *et al* 1993, Ramakers *et al*

1993, Brødsgaard 2004, Shipp y Ramakers 2004, Chow *et al* 2008, Weintraub *et al* 2011, Bouagga *et al* 2018), aunque ambos son depredadores generalistas con un amplio rango de presas, como ya se comentó en el Capítulo 1 de esta tesis. En lo que respecta al trips de las flores, *O. laevigatus* es capaz de alimentarse tanto de la larva como del individuo adulto, mientras que *A. swirskii* mata principalmente a las larvas de primer estadio de esta plaga (Wimmer *et al* 2008), aunque es más eficaz que otros ácaros fitoseidos disponibles comercialmente para el control de *F. occidentalis* en pepino (Messelink *et al* 2006), pimiento (van Houten *et al* 2005) o rosa (Pijnakker y Ramakers 2008). Como hemos visto, numerosos estudios de laboratorio han corroborado la compatibilidad entre ambos depredadores, afirmando que la depredación intragremial no solo no perjudica sino que incluso puede beneficiar al control biológico (Wittmann y Leather 1997, Weintraub *et al* 2011), mientras que en otros se notificó un efecto negativo claro para dicha coexistencia (Magalhães *et al* 2004, Chow *et al* 2010, Buitenhuis *et al* 2015), apoyados en la condición de *O. laevigatus* como depredador superior o depredador intragremial (depredador IG) sobre *A. swirskii*, el cual, a su vez, se comporta como depredador intermedio o presa intragremial (presa IG). Así, ante una baja densidad de presas, *A. swirskii* sufre tanto depredación como competencia por parte del chinche, mientras que *O. laevigatus* sólo se ve afectado por la competencia con el fitoseido a la hora de compartir a los estadios más jóvenes del trips como presas. Esto, como ya se comentó en el Capítulo 1, tiene como consecuencia un perjuicio claro para la coexistencia y, por tanto, para la eficacia del control biológico de esta plaga (Rosenheim *et al* 1995, Rosenheim 1998, Symondson *et al* 2002, Janssen *et al* 2007). Por lo tanto, es probablemente inapropiado tratar la verdadera omnivoría y la DIG como fenómenos ecológicos separados, como se ha hecho en el pasado, ya que en muchos casos ambas interacciones son expresiones de un único fenómeno subyacente de depredadores con una dieta diversificada (Shakia *et al* 2009).

Aun así, Weintraub *et al* (2011) demostraron que la suelta simultánea de *A. swirskii* y *O. laevigatus* es capaz de proporcionar niveles similares de control de trips con tasas de suelta de antocóridos más bajas que cuando se libera sólo a estos últimos. De hecho, como se comentó en el Capítulo 1, esta estrategia de suelta combinada se sigue recomendando en la actualidad y se encuentra perfectamente implementada en los programas de control integrado del pimiento de invernadero, especialmente debido al mayor control de la mosca blanca, con el fin de minimizar la transmisión de virus (Calvo *et al* 2012). Además, existen evidencias claras de que un alimento no-presa como el polen consigue suavizar la DIG y también el canibalismo (Leon-Beck y Coll 2007, Lundgren 2009, Calabuig *et al* 2018, Marcossi *et al* 2020), mejorando la supresión de las poblaciones de la plaga al reforzar a los depredadores y al mismo tiempo promoviendo la co-supresión de la plaga por parte del depredador IG y la presa IG, y permitiendo incluso la eliminación total del recurso compartido, en este caso el trips (Daugherty *et al* 2007, Delisle *et al* 2015, Ghasemzadeh *et al* 2017). En este contexto, los resultados de Calabuig *et al* (2018) sugieren que el polen de *Typha angustifolia* L. es adecuado para mitigar estas interacciones negativas entre ácaros depredadores generalistas como *Euseius stipulatus* Athias-Henriot e *Amblyseius degenerans* Berlese (Acari: Phytoseidae) tanto entre sí como sobre huevos de *Aphidoletes aphidimyza* Rondani (Diptera: Cecidomyiidae). En la misma línea, Onzo *et al* (2005) determinaron que la adición de niveles abundantes de polen de maíz aumentaba la supervivencia y la reproducción de *Typhlodromalus manihoti* Moraes y *Euseius fustis* Pritchard (Acari: Phytoseidae), y reducía la DIG entre ellos hasta niveles mínimos. También encontraron un efecto positivo del polen de maíz no sólo en las interacciones entre ambos depredadores, sino también en la supresión de las densidades de población de la presa en experimentos de invernadero.

El grado de especialización trófica y el tamaño corporal relativo son los dos factores que más influyen en la frecuencia y las direcciones de la DIG (Polis *et al* 1989). No en vano, la DIG con frecuencia está dirigida preferentemente hacia los competidores potenciales más cercanos del

depredador (es decir, aquellos con mayor solapamiento de recursos), y no hay que olvidar que ambos depredadores en el sistema que nos ocupa, *A. swirskii* y *O. laevigatus*, comparten recursos como son el polen o los estadios más jóvenes del trips. Ya sea por la similitud del nicho o como resultado de una selección directa para alimentarse de estos recursos, sin duda el encuentro entre ambos depredadores se torna típicamente frecuente. En este contexto, Daugherty *et al* (2007) modelizaron una coexistencia entre ambos enemigos naturales muy limitada en caso de que al depredador IG se le suplementase con un alimento de origen vegetal como el polen, arguyendo que esta forma de alimentación tiende a excluir tanto a la presa IG como al herbívoro. Tal vez por esta razón o quizás por la dinámica espacial, Shakia *et al* (2009) evidenciaron que la DIG entre *O. laevigatus* (depredador IG) y el fitoseido *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (presa IG) crecía en intensidad en presencia de polen al pasar de experimentos en escenarios simplificados a otros con planta completa, consumiendo ambos depredadores significativamente más trips en ausencia de polen que en su presencia. En vista de ello, resulta todavía más necesario un amplio estudio de depredación intragremial con nuestra cepa de *O. laevigatus* tolerante al polen, 2POL-11, para evaluar la coexistencia con *A. swirskii* en condiciones de escasez de presas, dado su elevado rendimiento cuando se alimenta exclusivamente de polen.

Por otro lado, la mayor parte de la DIG se produce en sistemas con poblaciones estructuradas por tamaño por parte de depredadores generalistas que suelen ser más grandes que sus presas intragremiales (Polis *et al* 1989). Y como hemos visto en el Capítulo 4 de esta tesis, un depredador de mayor tamaño como los de nuestra raza mejorada BIG30 presenta, por un lado, una capacidad depredadora significativamente más alta, lo que al mismo tiempo podría resultar en una DIG más intensa sobre *A. swirskii*, dada la diferencia de tamaño entre ambos depredadores; y por otro, precisamente por su elevada voracidad, puede sufrir una diversificación en su dieta, incurriendo en una mayor DIG. Al mismo tiempo, un consumidor hambriento puede moverse más y entrar en contacto con los depredadores IG con más frecuencia. Por todo ello, sería interesante poner a prueba un modelo de interacción entre ambos depredadores así como en un sistema tritrófico que incluya al trips adulto como presa extragremial, lo que nos permitiría evaluar también la preferencia de nuestro insecto por una presa de mayor tamaño en este caso, dado el mayor requerimiento nutricional de nuestra raza para alcanzar un mayor tamaño. Por este mismo motivo, resultaría también muy interesante valorar cualquier variación potencial en la omnivoría de BIG30 como resultado del proceso de selección, comprobando el efecto de la adición de polen en la capacidad depredadora y/o en la preferencia por el ácaro depredador o el trips de las flores.

## Materiales y métodos

### Cría de insectos y ácaros depredadores

Las poblaciones mejoradas de *O. laevigatus* para un mayor tamaño corporal y una mejor adaptación al polen, en adelante BIG30 y 2POL-11, respectivamente, se obtuvieron a través de un elaborado proceso de selección y a continuación se criaron con huevos congelados *ad libitum* de *Ephesttia kuehniella* Zeller como se explica en Mendoza *et al* (2020a y 2020b) y en los Capítulos 2 y 3 de esta tesis. Como referencia o control se usó una población comercial procedente de Agrobio SL (Almería, España, ORlcontrol®, en adelante Agrobio). Todas las poblaciones de depredadores se mantuvieron en condiciones controladas a  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y fotoperiodo 16:8 L: O.

Agrobio SL proporcionó también una población de *A. swirskii* de origen comercial (SWIRscontrol®) para los bioensayos de DIG, tanto para aquellos sin la opción de elección como para los de ensayos de alternancia de presas. Para llevar a cabo estos últimos, se suministraron adultos jóvenes sincronizados de *F. occidentalis* (de 15 a 17 días de edad) procedentes de un sistema de

cría establecido en la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), que consistía en varias poblaciones de campo recolectadas originalmente en invernaderos de producción ecológica del sureste de España entre 2009 y 2010 y luego mezcladas como se explica en Guillén *et al* (2014).

### Bioensayos sin elección de presa

Con el fin de evaluar la DIG de *O. laevigatus* sobre *A. swirskii*, se transfirieron 3, 5, 10 y 30 ácaros adultos a viales de plástico de 5 mL junto con una sección rectangular (30 x 5 mm) de hoja de pimiento en su interior y cubiertos por una tapa cuidadosamente perforada. Transcurridas 24 horas de exposición de los adultos de *O. laevigatus* a los ácaros y tras 24 horas de ayuno, se introdujo una sola hembra de *Orius* dentro de cada vial. Se evaluaron 20 réplicas por población de *O. laevigatus* (BIG30, 2POL-11 y Agrobio) y dosis, la mitad de ellas suplementadas con polen deshidratado comercial de abeja pulverizado (Hijas del Sol®, en adelante polen) y la otra mitad sin polen. Para los bioensayos, limitamos la variación entre ácaros machos y hembras seleccionando adultos de tamaño similar, aproximadamente 24 horas después del suministro por parte de la casa comercial. También se evaluó una dosis control para comprobar la supervivencia de los fitoseidos en ausencia del depredador. Después de 24 horas, se registró el número de presas intragremiales muertas, congelando y midiendo a continuación el ancho del pronoto de las hembras de *Orius* por medio de un microscopio binocular dotado de un micrómetro óptico, a 50 aumentos.

### Bioensayos de alternancia de presas

Un requisito previo al estudio del comportamiento de alternancia de presas por parte de un depredador es evitar grandes cantidades de cada tipo de presa. Una vez que determinamos el rango adecuado de densidades de presas a utilizar en los estudios de alternancia a partir de la evaluación de la depredación sobre *F. occidentalis* y *A. swirskii*, se evaluó la alternancia de presas ofreciendo a nuestras hembras diferentes proporciones de trips y fitoseidos. Para cada población de *O. laevigatus* examinada, utilizamos un protocolo similar al seguido en los experimentos sin elección, y expusimos hembras individuales de *O. laevigatus* durante 24 horas a las siguientes proporciones de presas: 5 *F. occidentalis* y 15 *A. swirskii* (proporción 1:3), 10 *F. occidentalis* y 10 *A. swirskii* (proporción 1:1), 15 *F. occidentalis* y 5 *A. swirskii* (proporción 3:1), con y sin suplemento de polen. Primero se transfirió el número necesario de trips adultos y luego de ácaros adultos a cada vial de plástico junto con un corte rectangular de hoja de pimiento en su interior. En la mitad de los viales se espolvoreó polen en el fondo. A continuación, se liberó una hembra de orius en cada vial y se colocó una tapa perforada para evitar que los artrópodos escaparan. 24 horas más tarde se comprobó el número de presas muertas en cada vial y se procedió a la congelación de los insectos para su medición a 50 aumentos. Se completaron 10 réplicas por ratio de presas y por tratamiento de suplementación para Agrobio, BIG30 y 2POL-11 ( $n = 180$  chinches). El control consistió en las mismas tres series de diferentes ratios de presas y con ambos tratamientos de suplementación pero sin hembras de orius (10 repeticiones en cada caso).

### Análisis estadístico

En lo que respecta a los bioensayos de alternancia de presas, se siguió el modelo nulo o "sin alternancia" (en inglés, Null or "no-switch" model) para un sistema formado por dos especies de presas (Murdoch, 1969) según el cual:

$$P_1 = \frac{C \cdot F_1}{1 - F_1 + C \cdot F_1} \quad (1)$$

donde  $F_1$  es la proporción de la especie presa número 1 (en nuestro caso, *F. occidentalis*) en el entorno,  $P_1$  es la proporción de la especie de presa 1 entre todas las presas consumidas por el depredador, y  $C$  es una medida de la preferencia del depredador por la especie de presa 1, que viene dada por:

$$P_1 = \frac{N_1/N_2}{H_1/H_2} \quad (2)$$

donde  $H_1$  y  $H_2$  son, respectivamente, el número de presas de las especies 1 (*F. occidentalis*) y 2 (*A. swirskii*) presentes en el entorno (presas ofrecidas), y  $N_1$  y  $N_2$  son las cantidades realmente consumidas (presas atacadas) por las hembras de *O. laevigatus*. Si no se produce alternancia de presas,  $C$  es constante y puede predecirse para cualquier proporción de  $H_1/H_2$ . Si la preferencia del depredador no es constante, sino que varía con la disponibilidad de presas o las tasas de encuentro, se espera que  $C$  aumente a medida que  $H_1/H_2$  disminuya. Por lo tanto, si se da la alternancia, la proporción observada de *F. occidentalis* entre todas las presas muertas será mayor que la esperada cuando esa especie sea más abundante y, en consecuencia, menor cuando no sea tan habitual.

Conviene estimar  $C$  cuando ambas clases de presas están igualmente disponibles,  $H_1 = H_2$ . Así, para cada repetición del conjunto de ensayos 1:1, estimamos un valor de  $P_1$  sustituyendo  $C$  en la Ecuación 1. Estas estimaciones se utilizaron para calcular el número esperado de adultos de *F. occidentalis* entre todas las presas muertas en cada réplica de los conjuntos de ensayos 5:15 y 15:5. Siguiendo el procedimiento estadístico descrito en Chow y Mackauer (1991), se calcularon los valores de  $P_1$  y se compararon los números observados de *F. occidentalis* muertos con los números pronosticados a partir del modelo nulo o "sin alternancia".

Los datos sobre las tasas de depredación de las tres poblaciones ensayadas a diferentes densidades de trips adultos se extrajeron de los ensayos sin elección discutidos en capítulos anteriores de esta tesis (BIG30: Capítulo 4; 2POL-11: Capítulo 5; Agrobio: Capítulo 5) para compararlos con los resultados de nuestro modelo nulo o "sin alternancia".

Se realizaron test de regresión simple entre la proporción de ácaros muertos y la anchura del pronoto para determinar la influencia del tamaño de las hembras en la DIG. Se comprobó la normalidad de los recuentos y las proporciones mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad) mediante un test de Levene. Dado que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, se utilizaron las pruebas de rango con signos de Wilcoxon para comparar los números observados de trips muertos con los números previstos por el modelo "sin alternancia". Las diferencias en las tasas de depredación se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial con la población de *O. laevigatus*, el tratamiento con polen y la densidad de ácaros como variables independientes. Los recuentos y las proporciones de todas las poblaciones evaluadas y de ambos tratamientos se transformaron en sus valores de raíz cuadrada y arcoseno, respectivamente, para cumplir con los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas. Las diferencias entre poblaciones en cuanto a la anchura del pronoto se determinaron mediante un ANOVA de un factor. Por último, se utilizó un ANOVA de un factor para comparar el número de presas muertas recuperadas de los controles. Para todos los análisis se utilizaron test de comparaciones múltiples (HSD) de Tukey (Sokal y Rohlf 1995) para  $p < 0.05$ , resolviendo así las diferencias entre medias por pares. Las hembras muertas se excluyeron del análisis.

Las curvas referidas al número de fitoseidos consumidos por *O. laevigatus* a diferentes densidades de presa se representaron con el software Excel y se compararon con las discutidas en los capítulos 4 y 5 de esta tesis para trips adultos.

## Resultados

### Bioensayos sin elección de presa

La densidad de ácaros tuvo una influencia significativa en la tasa de depredación de las hembras de *O. laevigatus* en condiciones de laboratorio (ANOVA multifactorial:  $F = 29.62$ ,  $gl = 3 / 239$ ,  $p < 0.001$ ). De hecho, la tasa de depredación se incrementaba a medida que aumentaba el número de ácaros ofrecidos a cada hembra independientemente de la población ensayada (interacción densidad-población:  $F = 1.79$ ,  $gl = 6 / 239$ ,  $p = 0.102$ ) y de la disponibilidad de polen como suplemento alimenticio (interacción densidad-polen:  $F = 2.02$ ,  $gl = 3 / 239$ ,  $p = 0.111$ ) (Tabla 6.1). Por otro lado, el empleo de polen como suplemento tuvo también un efecto significativo en la DIG ( $F = 16.60$ ,  $gl = 1 / 239$ ,  $p < 0.001$ ), siendo ésta inferior en presencia de polen que en ausencia del mismo. Aunque dicha reducción también se observó para las tres poblaciones bioensayadas (interacción población-polen:  $F = 2.05$ ,  $gl = 2 / 239$ ,  $p = 0.131$ ), ésta fue especialmente relevante en el caso de la población tolerante al polen, 2POL-11, para la que se registró una disminución de hasta un 43% en la DIG al suministrar polen junto con la dosis más alta de ácaros (30 individuos por hembra) (Tabla 6.1). Sin embargo, el principal resultado de nuestros bioensayos sin elección de presa es la diferencia en la tasa de DIG en función de la población ensayada ( $F = 38.40$ ,  $gl = 2/239$ ,  $p < 0.001$ ). Así pues, si no tenemos en cuenta la densidad de fitoseidos, mientras las hembras de la población comercial (Agrobio) depredan al 53% de los ácaros que se les presentan, las de la población mejorada para un tamaño más grande superan el 70% de depredación, y en cambio las hembras de la población adaptada a la escasez de presas no alcanzan el 40%. Estos resultados están en concordancia con la diferencia en el tamaño medio registrado para las hembras de cada una de estas poblaciones (ANOVA de un factor:  $F = 105.77$ ,  $gl = 2 / 239$ ,  $p < 0.001$ ), con una anchura media del pronoto de 0.747 (0.742-0.753) mm para 2POL-11, 0.777 (0.771-0.782) para Agrobio y 0.829 (0.824-0.835) para BIG30. De acuerdo con ello, y apoyado por el coeficiente de correlación obtenido (0.608), se podría determinar que la DIG es relativamente dependiente del tamaño del depredador ( $R^2 = 36.9\%$ ,  $p < 0.001$ ).

Por otro lado, la mortalidad de *A. swirskii* fue muy baja en los controles. Es más, el número medio de ácaros depredados recuperados de los controles (sin polen: media  $\pm$  error estándar =  $0.63 \pm 0.15$ , con polen:  $0.53 \pm 0.18$ ,  $n = 10$ ) fue, en promedio, de un 11 a un 12% de los números observados en los tratamientos con una hembra de *Orius* y 10 ácaros por repetición. Por tanto, se puede aseverar que la mortalidad de los fitoseidos se debe casi en su totalidad a la depredación por parte de las hembras de *O. laevigatus*.

### Bioensayos de alternancia de presas

Generalmente, las hembras de *O. laevigatus* muestran una preferencia clara por *A. swirskii* frente a los adultos de *F. occidentalis*, ya que aunque tienden a decantarse por la presa que se muestra en mayor proporción, cuando el ratio de ambas presas es 10:10, el antocórido mata un número significativamente mayor de fitoseidos que de adultos de trips (Figura 6.1). Esto es lo que se observó para la población comercial suministrada por Agrobio tanto en ausencia como en presencia de polen como alimento suplementario. De hecho, cuando los adultos de *F. occidentalis* se ofrecen a la hembra de Agrobio como presa mayoritaria (ratio 15:5), éstas depredaban un 47 –

52% menos trips de los esperados según el modelo nulo o sin alternancia de presas (Tabla 6.2), lo que demuestra una mayor preferencia por el ácaro fitoseido. En cambio, para las poblaciones mejoradas de *O. laevigatus* se observó un patrón de conmutación muy diferente entre ambas especies de presa (Figura 6.1).

**Tabla 6.1.** Número de presas consumidas (media  $\pm$  error estándar) por hembra de *O. laevigatus* al alimentarse de varias densidades de *A. swirskii* (AS), con o sin polen como suplemento.

Densidad de presa	Nº de ácaros consumidos / ♀ · 24 h (media $\pm$ error estándar)					
	Sin polen			Con polen		
	Agrobio	2POL-11	BIG30	Agrobio	2POL-11	BIG30
3	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>Ba</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>Ba</sup>	2.8 $\pm$ 0.1 <sup>Ca</sup>	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>Ba</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>Aa</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>Ba</sup>
5	4.0 $\pm$ 0.3 <sup>Cb</sup>	2.7 $\pm$ 0.3 <sup>Ba</sup>	4.2 $\pm$ 0.2 <sup>Cb</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>Ba</sup>	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>Ab</sup>	4.0 $\pm$ 0.3 <sup>Cb</sup>
10	6.6 $\pm$ 0.4 <sup>Cc</sup>	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>Bb</sup>	7.1 $\pm$ 0.3 <sup>Cc</sup>	4.5 $\pm$ 0.5 <sup>Bb</sup>	2.5 $\pm$ 0.5 <sup>Ab</sup>	6.6 $\pm$ 0.4 <sup>Cc</sup>
30	15.9 $\pm$ 0.9 <sup>Cd</sup>	12.4 $\pm$ 0.8 <sup>Bc</sup>	16.9 $\pm$ 0.5 <sup>Cd</sup>	13.0 $\pm$ 1.0 <sup>Bc</sup>	7.4 $\pm$ 0.5 <sup>Ac</sup>	15.9 $\pm$ 0.9 <sup>Cd</sup>

Los valores seguidos de diferente letra minúscula en la misma columna (diferencias entre densidades) y diferente letra mayúscula en la misma fila (diferencias entre poblaciones) son significativamente diferentes (prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Así pues, en el caso de la población tolerante a la alimentación sin presa, 2POL-11, ya se observa una alternancia más clara entre ambos tipos de presa que en Agrobio en ausencia de polen, ya que no se observaron diferencias significativas en la tasa de depredación sobre ambas cuando se suministraban en la misma proporción, tendiendo claramente hacia la especie más abundante en cada caso (Figura 6.1). Sin embargo, el *sorpasso* de la depredación intragremial a una mayor depredación extragremial en 2POL-11 con respecto a lo que ocurría en Agrobio tuvo lugar al suplementar la alimentación con polen. Y es que, aunque la adición de polen no se tradujo en un aumento en la tasa de depredación observada sobre trips adultos en relación a lo esperado según el modelo nulo (Tabla 6.2), al comparar las cifras de trips y fitoseidos atacados en un ratio 10:10 se observó un valor significativamente más bajo para estos últimos. Así pues, la proporción de ácaros fitoseidos muertos respecto del total de presas fue significativamente más baja entre las hembras tolerantes al polen que entre las hembras de las otras dos poblaciones bioensayadas (ANOVA multifactorial:  $F = 15.05$ ,  $gl = 2 / 179$ ,  $p < 0.001$ ), con un 30% de ácaros atacados y consumidos por estas hembras frente al 45-46% de ácaros atacados por las de Agrobio y BIG30. También se ha observado un efecto significativo de la adición de polen en la DIG en esta población ( $F = 6.33$ ,  $gl = 2/179$ ,  $p < 0.05$ ), de manera que cuando a las hembras tolerantes al polen se les proveía de este alimento como suplemento, la tasa de depredación sobre los fitoseidos se reducía en un 9%.

En el caso de la población con un tamaño mejorado, BIG30, se observó una clara preferencia por parte de las hembras de *Orius* hacia la presa extragremial tanto en presencia como en ausencia de polen como alimento suplementario (Figura 6.1). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría en la población tolerante al polen en presencia de dicho alimento suplementario, la preferencia superior por el trips no vino motivada por un descenso en la intensidad de la DIG con respecto a lo que ocurría en la población comercial, sino por un aumento diferencial en la tasa de depredación sobre el trips adulto ( $F = 77.71$ ,  $gl = 2/177$ ,  $p < 0.001$ ). Por un lado, sus hembras depredaban entre dos y tres veces más trips adultos que las otras dos poblaciones ensayadas cuando ambas presas estaban en la misma proporción. Además, únicamente para esta población se alcanzó un nivel de depredación sobre el trips adulto similar al esperado según el modelo nulo o sin alternancia de

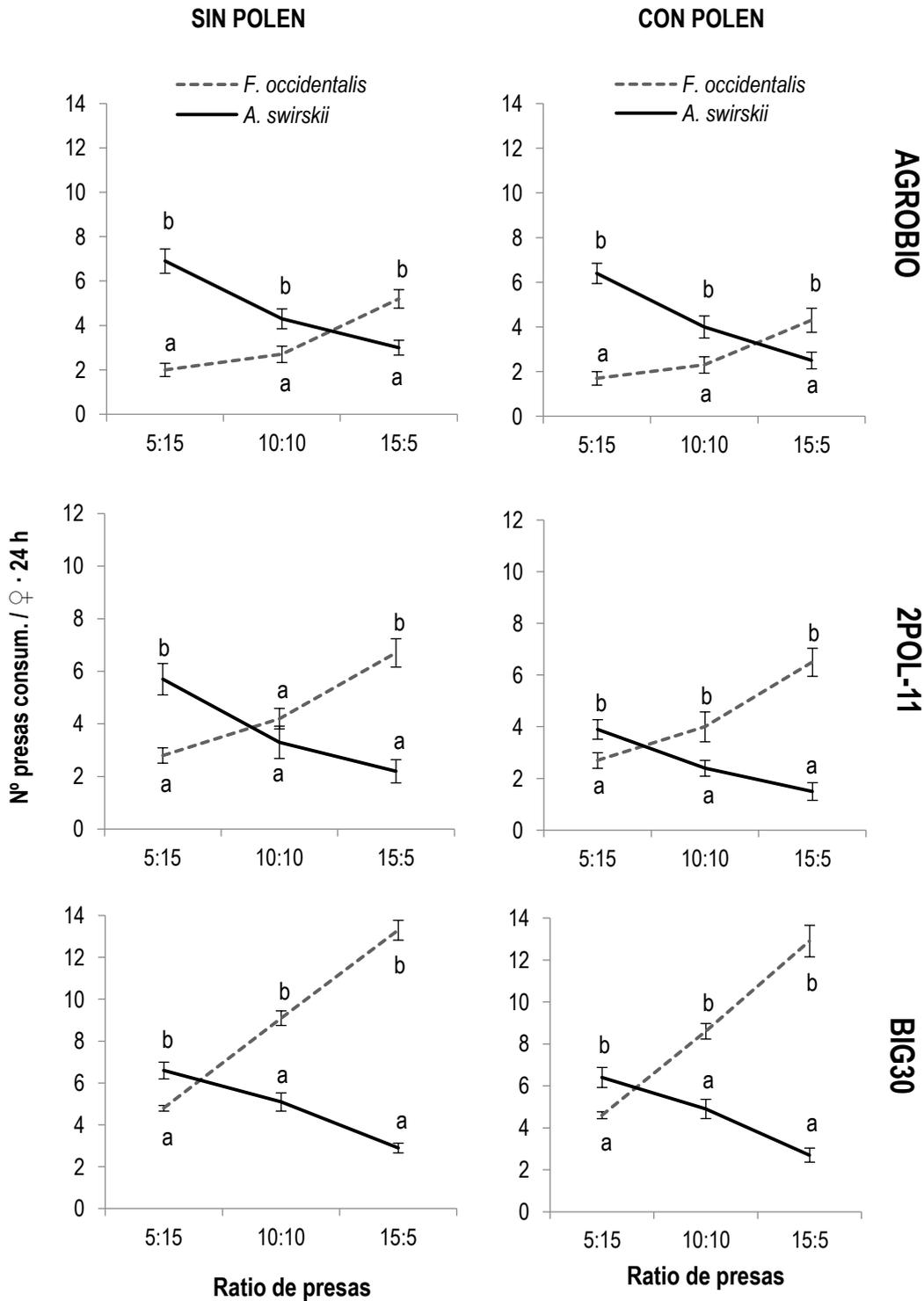
presas a la densidad más alta de la plaga (Tabla 6.2). Finalmente, incluso cuando el trips era la especie menos abundante del sistema combinado (ratio 5:15), las hembras de BIG30 depredaban entre un 142 y 150% más que lo esperable según dicho modelo propuesto por Murdoch (1969). En definitiva, la capacidad depredadora total de las hembras de BIG30, con una anchura del pronoto significativamente mayor y por lo tanto más grandes que las de Agrobio o 2POL-11 ( $F = 107.85$ ,  $gl = 2/177$ ,  $p < 0.001$ ), es también significativamente la más alta de las registradas en nuestros ensayos (ANOVA multifactorial:  $F = 128.03$ ,  $gl = 2/179$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 6.2), siendo en todo caso más baja en presencia de polen como suplemento alimenticio ( $F = 8.57$ ,  $gl = 1/179$ ,  $p < 0.01$ ). Tal es así que, ante una situación de elección entre una presa IG y el adulto de su presa favorita, las hembras de la población mejorada para un tamaño más grande consumen prácticamente el doble de presas que las de las otras dos poblaciones evaluadas (13.7 frente a 7.6 - 7.7 presas al día). Pero además, la proporción de trips adultos en este consumo total es significativamente más alta en BIG30 (44%) que en Agrobio (15%) o 2POL-11 (22%) (ANOVA multifactorial:  $F = 77.86$ ,  $gl = 2/179$ ,  $p < 0.001$ ), demostrándose así la mayor preferencia de esta raza mejorada por los adultos del trips de las flores.

Al comparar los resultados de estos experimentos con los obtenidos en ensayos en los que se presenta a las hembras un solo tipo de presa, ya sean ácaros fitoseidos (apartado anterior de este capítulo) o trips adultos (capítulos 4 y 5 de esta tesis), se observa una diferencia fundamental entre nuestras razas mejoradas y la población comercial (Figura 6.3). A pesar de que el consumo total de presas es significativamente más alto en todos los casos cuando se les presentan ambas especies a la vez que de forma separada, tanto en presencia como en ausencia de polen como suplemento, las hembras de Agrobio ven reducida la tasa de ataque sobre el trips cuando éste es suministrado en una mezcla de presas, mientras que el consumo de fitoseidos se mantiene aproximadamente al mismo nivel. En cambio, tanto en el caso de 2POL-11 como sobre todo en el de BIG30, las hembras optan por la DIG en menor medida cuando tienen la opción de elegir entre el ácaro depredador y el trips adulto, mientras que la intensidad depredadora sobre este último se mantiene muy alta a pesar de tener la opción de elegir a la presa IG.

No se observaron diferencias significativas en la mortalidad de los controles ni entre ambos tipos de presas (prueba de rango con signos:  $n = 259$ ,  $Z = 16513.0$ ,  $p = 0.665$ ), ni entre las distintas combinaciones de presas evaluadas (ANOVA multifactorial, *A. swirskii*:  $F = 2.26$ ,  $gl = 1/179$ ,  $p = 0.108$ ; *F. occidentalis*:  $F = 1.69$ ,  $gl = 1/179$ ,  $p = 0.18$ ), ni entre ambos tratamientos con polen (ANOVA multifactorial, *A. swirskii*:  $F = 0.36$ ,  $gl = 1/179$ ,  $p = 0.548$ ; *F. occidentalis*:  $F = 0.01$ ,  $gl = 1/179$ ,  $p = 0.904$ ). En todo caso, la mortalidad tanto de ácaros fitoseidos como de adultos de trips rondó el 2.85% del total de presas, valores prácticamente despreciables en comparación con los registrados en presencia de la hembra de *O. laevigatus*.

## Discusión

De acuerdo con el modelo de Murdoch (1969), la alternancia de presas (en inglés, *prey switching*) hace referencia a un cambio de menos a más, respecto de un valor esperado, en la proporción de presa consumida por un depredador a medida que la abundancia relativa de esa presa aumenta. Dicha alternancia es frecuente en el caso de depredadores móviles que se alimentan en diversos parches en los que existe una variación en la proporción de presas disponibles, como es el caso de *O. laevigatus*, un insecto con muy buena capacidad de dispersión en el cultivo, polífago y que se alimenta con mucha frecuencia (Malais y Ravensberg 2003).



**Figura 6.1.** Número de adultos (media  $\pm$  error estándar) de *Frankliniella occidentalis* (FO, líneas discontinuas) y *A. swirskii* (AS, líneas sólidas) consumidos por una sola hembra de *O. laevigatus* de variedades comerciales (Agrobio, arriba) y seleccionadas (2POL-11, centro; BIG30, abajo) en una situación de elección con diferentes proporciones de presas (FO: AS), con (derecha) o sin (izquierda) polen. Para cada proporción de presa, diferentes letras indican diferencias significativas (prueba de rango con signos de Wilcoxon,  $p < 0.05$ ).

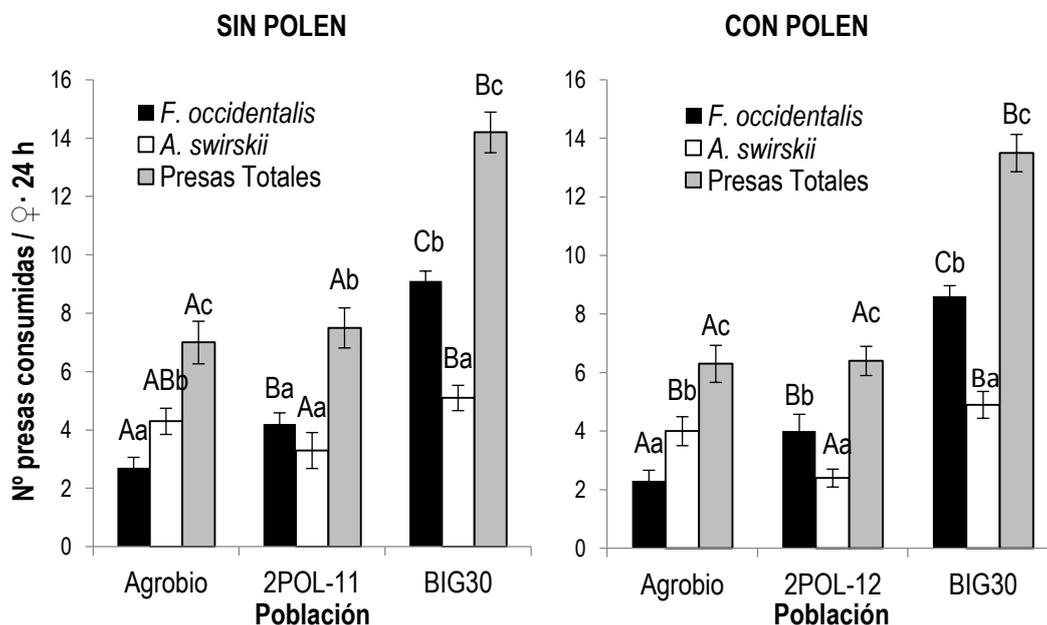
**Tabla 6.2.** Número observado y esperado de adultos de *F. occidentalis* (FO) consumidos, recuperados tras 24 horas de contacto con hembras aisladas de *O. laevigatus*, en diferentes proporciones de *F. occidentalis* y *A. swirskii* (AS), con o sin polen como suplemento.

Population	Ratio de presas (FO:AS)	Nº de adultos de <i>F. occidentalis</i> consumidos / ♀ · 24 h (media ± error estándar)		Z	gl	Probabilidad <sup>a</sup>
		Observado	Esperado			
Agrobio n = 10	5:15	2.00 ± 0.30	0.90 ± 0.08	18.0	18	p < 0.05
	10:10	2.70 ± 0.37				
	15:5	5.20 ± 0.42	9.74 ± 0.40	100.0	18	p < 0.001
Sin polen 2POL-11 n = 10	5:15	2.80 ± 0.29	1.70 ± 0.23	16.0	18	p < 0.05
	10:10	4.20 ± 0.39				
	15:5	6.70 ± 0.54	11.84 ± 0.60	98.0	18	p < 0.001
BIG30 n = 10	5:15	4.80 ± 0.13	1.92 ± 0.12	0.0	18	p < 0.001
	10:10	9.10 ± 0.35				
	15:5	13.30 ± 0.47	12.66 ± 0.16	42.0	18	p = 0.569
Agrobio n = 10	5:15	1.70 ± 0.30	0.91 ± 0.17	25.0	18	p < 0.05
	10:10	2.30 ± 0.37				
	15:5	4.30 ± 0.54	8.96 ± 1.17	87.0	18	p < 0.01
Con polen 2POL-11 n = 10	5:15	2.70 ± 0.30	1.85 ± 0.29	26.5	18	p < 0.05
	10:10	4.00 ± 0.58				
	15:5	6.50 ± 0.54	12.07 ± 0.54	100.0	18	p < 0.001
BIG30 n = 10	5:15	4.60 ± 0.16	1.90 ± 0.12	0.0	18	p < 0.001
	10:10	8.60 ± 0.37				
	15:5	12.90 ± 0.75	12.61 ± 0.20	40.0	18	p = 0.470

<sup>a</sup> Las diferencias entre los valores observados y los esperados dentro de cada fila se compararon mediante la prueba de rango con signos de Wilcoxon; probabilidades a dos colas.

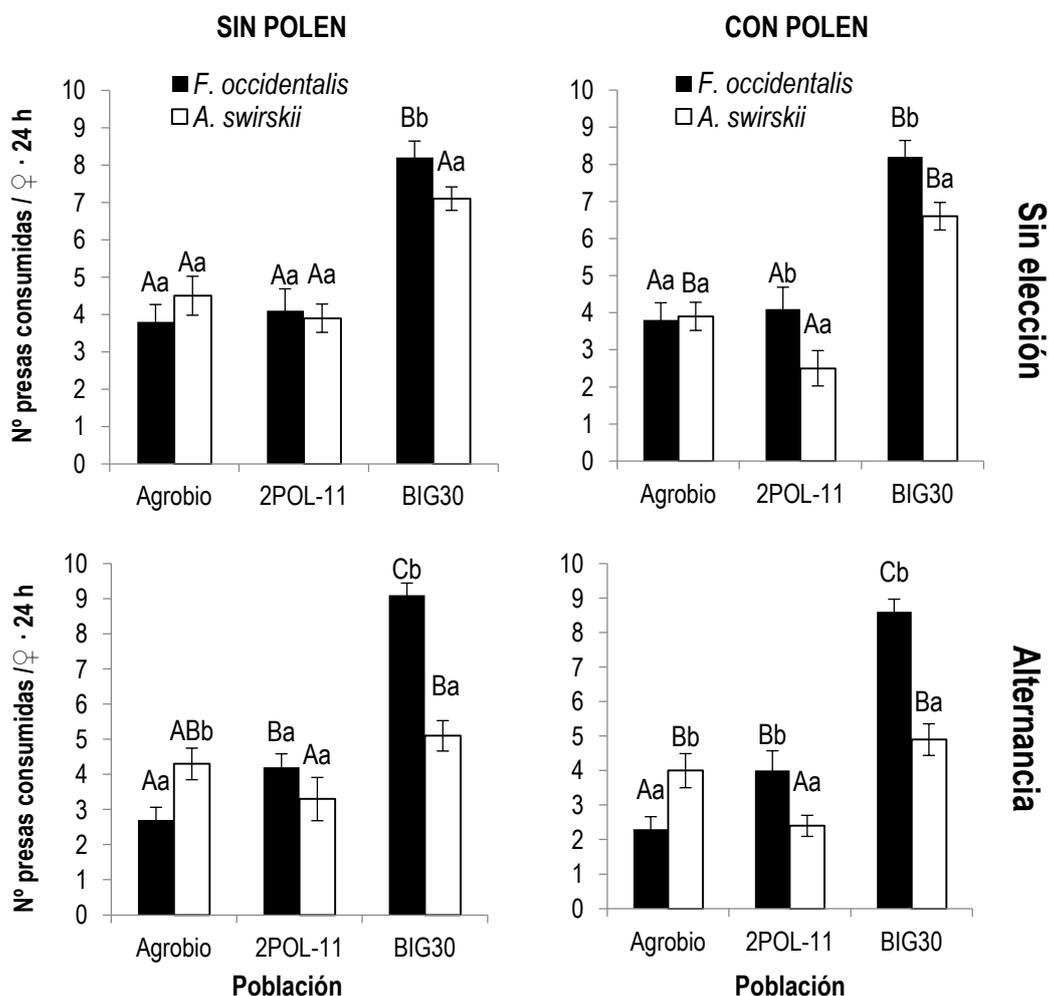
Sin embargo, a la luz de nuestros experimentos, al menos en lo que respecta a la población comercial de Agrobio, *O. laevigatus* no presenta un comportamiento de alternancia de presas cuando se le da a elegir entre adultos de *A. swirskii* y adultos de *F. occidentalis*, sino que elige preferentemente al ácaro depredador. En las hembras de esta población, la tasa de depredación sobre el trips disminuye al añadir como presa alternativa el ácaro depredador, y sin embargo la tasa de depredación sobre *Amblyseius* no desciende al estar presente éste junto con el trips adulto. Esta preferencia de las hembras de Agrobio por el fitoseido posiblemente se deba a la dificultad que supone para el insecto someter a una presa con mayor capacidad de evasión como es el trips adulto, que está dotado de alas y se mueve con mayor rapidez. Resultados, éstos, que contrastan con lo observado por Madadi *et al* (2008) entre *Orius albidipennis* R. y *N. cucumeris* en presencia o ausencia de *Thrips tabaci* L., registrando una preferencia significativa del antocórido por el trips. Especialmente relevantes fueron los resultados obtenidos por parte Chow *et al* (2008, 2010), en su caso empleando una población comercial de *O. insidiosus* S. sobre adultos y larvas de *F. occidentalis*. De acuerdo con su experiencia, las hembras de *O. insidiosus* cumplían un

patrón claro de alternancia entre ambas especies de presa fuera cual fuera el estadio del trips, depredando proporcionalmente más sobre la presa más abundante. Independientemente de que se trate de especies distintas de *Orius*, cabe señalar que nuestros ensayos de laboratorio se han realizado en un escenario reducido y simplificado como son los viales de plástico de 5 mL junto con una muestra de material vegetal, mientras que los anteriores llevaron a cabo ensayos de semicampo utilizando plantas completas de pimiento, pepino y berenjena en el caso de Madadi *et al*, así como tallos y flores de rosa cultivada en invernadero en el caso de Chow *et al*, lo que explicaría las tasas de depredación sobre el trips ligeramente inferiores registradas en su caso. Como se ampliará más adelante en este capítulo, el hecho de que el polen esté disponible en algunas estructuras vegetales (flores) pero no en otras puede conducir a una variación en la abundancia de la presa extragremial, la presa IG y el depredador IG en flores, frutos y hojas, lo que se espera que relaje la intensidad de las interacciones tróficas (Janssen *et al* 2007). En cualquier caso, en línea con nuestros resultados para la población comercial de *O. laevigatus* junto con *A. swirskii*, la suelta combinada de ciertas especies de *Orius* y ácaros depredadores se recomienda únicamente de forma escalonada en el tiempo o bien cuando las poblaciones de trips son muy abundantes, ya que estos casos el antocórido no muestra preferencia por *F. occidentalis* ni por el ácaro depredador [Gillespie y Quiring 1992 (*Orius tristicolor* W. y *N. cucumeris*); Wittmann y Leather 1997 (*O. laevigatus* y *A. degenerans*); Brødsgaard y Enkegaard 2005 (*O. majusculus* R. y *A. degenerans*)], mientras que para otras combinaciones directamente no se recomienda la suelta conjunta, ya que el orius prefiere al ácaro depredador sobre *F. occidentalis* [Wittmann y Leather 1997 (*O. laevigatus* y *A. cucumeris*); Magalhães *et al* 2004 (*O. laevigatus* y *A. cucumeris*); Sanderson *et al* 2005 (*O. insidiosus* y *A. cucumeris*); Chow *et al* 2008 (*O. insidiosus* y *A. degenerans*)].



**Figura 6.2.** Número total (media  $\pm$  error estándar) de presas consumidas por una sola hembra de *O. laevigatus* de las poblaciones Agrobio, BIG30 y 2POL-11 en una situación de elección entre adultos de *F. occidentalis* y *A. swirskii*, con (derecha) o sin (izquierda) polen como suplemento ( $n = 10$  presas por hembra de cada población de *Orius* y para cada tratamiento de suplemento con polen). Diferentes letras minúsculas y mayúsculas situadas sobre las barras indican diferencias significativas dentro de una población y entre poblaciones distintas, respectivamente (prueba de rango con signos de Wilcoxon,  $p < 0.05$ ).

En lo que respecta a nuestra población mejorada para una mayor tolerancia al polen, 2POL-11, ésta consume en igual cantidad al trips adulto cuando se suministra solo que en compañía del ácaro depredador, y por el contrario, el número de ácaros consumidos al día es significativamente más bajo cuando está presente también el trips, especialmente cuando además se añade polen al sistema como suplemento. Por un lado, la elevada capacidad que presenta esta población para obtener rédito nutritivo a partir de cualquier recurso (Capítulo 3) la hace menos dependiente de la alimentación a partir de una u otra presa, y por otro, su zona de caza se limita más al área en la que se encuentra el polen añadido como suplemento (observación experimental), del cual se alimenta con éxito pero al que también acuden ácaros y trips adultos. Sea como sea, en este caso no se observa una preferencia por el ácaro depredador como ocurría anteriormente, y sin embargo para esta población la aplicación del modelo de Murdoch (1969) tampoco apoya una alternancia real entre ambos tipos de presa, a pesar de que esto sí que se observa en la práctica (Figura 6.1).



**Figura 6.3.** Número de adultos (media  $\pm$  error estándar) de *F. occidentalis* (barras negras) y *A. swirskii* (barras blancas) atacados por hembra de *O. laevigatus* de Agrobio, BIG30 y 2POL-11 en situaciones de no elección (arriba, datos para adultos de trips de los capítulos 4 y 5) frente a una situación de alternancia de presas (abajo), con (derecha) o sin (izquierda) polen como suplemento. Las hembras ( $n = 10$ ) se individualizaron durante 24 h con: 10 adultos de una especie de presa (sin elección) o 10 adultos de cada especie (alternancia de presas). Diferentes letras minúsculas y mayúsculas sobre las barras indican diferencias significativas dentro de cada población y entre poblaciones distintas, respectivamente (prueba de rango con signos de Wilcoxon,  $p < 0.05$ ).

Es entre las hembras de mayor tamaño, pertenecientes a la población mejorada BIG30, donde por primera vez observamos un comportamiento real y ajustado al modelo de alternancia de presas, ya que en este caso la tasa de mortalidad del trips adulto observada es igual o incluso superior a la esperada a una densidad elevada con respecto a la del ácaro depredador y, del mismo modo que en 2POL-11, el consumo de ácaros disminuye en una situación de elección entre ambos tipos de presas, mientras que el consumo de trips adultos permanece invariable. En este caso, el tamaño significativamente superior de las hembras de BIG30 les permite elegir entre dos presas a las que es capaz de someter con más facilidad que sus congéneres de menor tamaño, además de que su voracidad es significativamente superior. A partir de ahí, la elección del trips adulto sobre el ácaro fitoseido que se observa en la práctica puede venir motivada bien por una tasa de encuentro más baja entre el depredador IG y la presa IG debido a la especialización de nicho adquirida por el primero (así como a la imposibilidad por parte del ácaro fitoseido de depredar al trips adulto), o simplemente por una cuestión de requerimiento nutricional relacionada con la diferencia de tamaño entre el depredador y ambas especies de presas. En este sentido, tan cierto es que muchos depredadores son oportunistas en su estrategia de alimentación y no muestran por ello grandes preferencias por sus presas (Denno y Fagan 2003), como también lo es que la toxicidad y el tamaño del cuerpo pueden influir en la selección de sus presas (Polis *et al* 1989). Por otro lado, el comportamiento de alternancia de presas observado en BIG30 fue el mismo independientemente de la adición o no de polen como suplemento, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos ni en la preferencia por una u otra presa ni en la tasa de DIG sobre *A. swirskii*. Esta ausencia de efecto disruptivo del polen en la DIG ya la habían observado Shakia *et al* (2009) en sus experimentos con plantas de fresa, en los cuales la tasa de depredación de *O. laevigatus* sobre el fitoseido *N. cucumeris* no se reducía en presencia de polen, contradiciendo su hipótesis inicial.

El incremento en la tasa de depredación total que se ha registrado en nuestros ensayos cuando se ofrecían ambas presas a las hembras de *O. laevigatus* de forma conjunta, independientemente de la población evaluada, es una prueba de la ventaja que supone la alternancia de presas para un depredador generalista como es el protagonista de esta tesis doctoral. Van Maanen *et al* (2015) ya profundizaron acerca de los mecanismos que subyacen a este fenómeno mediante el estudio del comportamiento antidepredador (y por lo tanto de la capacidad para evitar la depredación) de dos presas diferentes de *A. swirskii*, el cual se hacía más frecuente cuando a los depredadores se les marcaba químicamente con fluidos de una presa de la misma especie a la que iba a atacar. Como consecuencia de ello, y en concordancia con lo observado en nuestro estudio, la alternancia entre presas diferentes por parte del depredador le permitía a *A. swirskii* eliminar a un número mayor de presas al sortear el sistema de alerta de la misma, lo cual tiene un efecto positivo directo en el control biológico. Este mismo fenómeno podría explicar también que la proporción de presas a la que tiene lugar el cambio desde una depredación intragremial hacia otra extragremial sea muy baja tanto para nuestra población tolerante al estrés alimenticio en presencia de polen como para nuestra raza mejorada para un tamaño mayor. No en vano, de acuerdo con los modelos clásicos de optimización de la dieta, un depredador generalista debería pasar de consumir exclusivamente presas de alta calidad a hacerlo a partir de una mezcla de presas cuando la densidad de las presas de alta calidad cae por debajo de un umbral (Charnov 1976, Stephens y Krebs 1986). Así, ya sea debido a la especialización trófica o a la mayor relación en tamaño, la posibilidad de alternar de forma eficaz entre el trips adulto, el polen y el ácaro depredador hace posible que se requiera, en nuestras líneas mejoradas de *O. laevigatus*, una proporción significativamente menor del trips adulto que en el caso de Agrobio para que la hembra consiga someter a esta presa sin necesidad de concurrir frecuentemente en la DIG.

Según la teoría de la depredación intragremial, en ausencia de suplemento alimenticio, dos depredadores pueden coexistir sólo si la presa IG es más eficiente en la explotación del recurso compartido que el depredador IG (Holt y Polis 1997), mientras que emplear un recurso no-presa como el polen como suplemento permite que la presa IG no tenga que ser necesariamente superior en la explotación del recurso compartido original, siempre y cuando tenga una habilidad mayor para explotar el suplemento que el depredador IG (Daugherty *et al* 2007, Wei *et al* 2019). Es decir, la coexistencia estable de los dos depredadores es posible cuando el depredador IG es más hábil a la hora de explotar la presa herbívora compartida siempre que la presa IG sea altamente fitófaga. Pues bien, la adición de polen como alimento suplementario supone una solución al problema de la coexistencia en el caso de los depredadores omnívoros *O. laevigatus* y *A. swirskii*, siendo el ácaro fitoseido un eficiente consumidor de polen (Goleva y Zebitz 2013, Calvo *et al* 2015, Janssen y Sabelis 2015) y *O. laevigatus* un eficaz depredador del trips. Pero además, nuestros resultados sugieren que la capacidad de depredador IG para explotar el polen como alimento resulta, asimismo, especialmente relevante a la hora de mediar en la compatibilidad con *A. swirskii*. De hecho, a pesar de que la adición de polen puede incrementar la tasa de encuentros entre *A. swirskii* y *O. laevigatus* al tratarse de un recurso susceptible de ser empleado por ambos, únicamente entre las hembras de la población mejorada para un elevado rendimiento con polen, 2POL-11, se dio una reducción significativa de la intensidad de la DIG en presencia de este alimento. Sea como fuere, esta coexistencia intragremial mediada por la polinivoría puede ser una ventaja para el uso de *O. laevigatus* como agente de control biológico aumentativo en cultivos productores de polen pero también en cultivos menos o no productores de polen cuando hay implicadas estrategias de suplemento alimenticio. Así, en el cultivo de crisantemo frecuentemente se espolvorea polen de *Typha* sobre las flores como fuente de alimento adicional, favoreciendo la coexistencia entre ácaros depredadores y reforzando el control de las poblaciones de trips (Skirvin *et al* 2006, Hoogerbrugge *et al* 2008). Por otro lado, en cultivos de pepino en los que las plantas son partenocárpicas y, por tanto, con una disponibilidad de polen escasa, se ha propuesto el empleo de un alimento suplementario consistente bien en alguna presa alternativa o bien en polen, con el fin de mejorar la eficacia de los enemigos naturales tras la suelta (Messelink *et al* 2014, Oveja *et al* 2016). Estos ejemplos podrían proporcionar un buen precedente para la aplicación de nuestra población mejorada de *Orius* tolerante al polen en este tipo de cultivos, así como su coexistencia con *A. swirskii*. Dado que *Orius*, cuando se libera en un cultivo ya establecido, se distribuye en focos, el alimento también podría proporcionarse localmente en estos mismos focos donde se liberan los depredadores. Esto permitiría al depredador acaparar el alimento y reducir el riesgo de que éste se utilice para el aumento de la población de la plaga, como sugirieron van Rijn *et al* (2002). Además, Leman y Messelink (2015) demostraron que, aunque *F. occidentalis* se alimenta de polen, el mayor incremento en la población de depredadores como consecuencia de la presencia de este alimento mejora la relación depredador-presa, generando un beneficio a largo plazo para el control biológico.

En cualquier caso, las bondades de la adición de polen (o bien su presencia natural) en el control biológico hace tiempo que se vienen exponiendo en la bibliografía. Por ejemplo, Sabellis y van Rijn (1997) demostraron que el suministro semanal de casi 3 gramos de polen de *Typha* a plantas de pepino permitía a *A. degenerans* alcanzar la edad adulta, promoviendo la abundancia de fitoseidos juveniles y adultos, y contribuyendo significativamente de esta forma al control del trips. Del mismo modo, Matsumura *et al* (2004) discutió ampliamente la mejora en el rendimiento de un depredador que tiene lugar como consecuencia de la diversificación de su dieta con el objeto de satisfacer sus elevadas demandas de nitrógeno, adquiriendo especial relevancia en este sentido la DIG, pero también la presencia de polen y néctar o la disponibilidad de presas alternativas, en concordancia con lo observado por Bouagga *et al* (2018) en sus bioensayos de campo con *Nesidiocoris tenuis* y

*A. swirskii*. Desde un punto de vista práctico, una aportación muy importante a la implementación de los programas de adición de polen fue el estudio realizado por Shakia *et al* (2010), quienes demostraron cómo la disponibilidad de polen y la actividad simultánea de dos depredadores (*O. laevigatus* y *N. cucumeris*) pueden modificar la toma de decisiones en la gestión de plagas, reduciendo drásticamente el uso de insecticidas costosos y perjudiciales. Y finalmente, suponiendo al polen como “presa” o alimento alternativo tanto para el ácaro fitoseido como para el antocórido, con su adición al cultivo, éste se tornaría en un elemento estabilizador de la dinámica poblacional de ambos depredadores, como ya modelizaron Wei *et al* (2019) con el fin de analizar los posibles efectos de la alternancia de presas en la intensidad de la DIG.

En lo que respecta a nuestra población mejorada para un tamaño mayor y por tanto para una mayor capacidad depredadora, la reducción en la intensidad de la depredación sobre la presa IG en comparación con el aumento observado en la presión sobre el trips adulto, tiene un efecto sustancial en el control de las poblaciones de esta especie a corto plazo. No obstante, a largo plazo y en lo que respecta al control biológico en general, una coexistencia más desahogada entre *O. laevigatus* y *A. swirskii* favorecería un desarrollo más eficiente de sus poblaciones, evitando el potencial resurgimiento y desarrollo de otra plaga clave como es la mosca blanca de invernadero. En otras palabras, la diferenciación de nicho adquirida por este depredador al alimentarse de los adultos de trips permite pasar de una fuerte DIG a una competencia de explotación entre depredadores o simplemente a cadenas tróficas más independientes. En ambos casos, además de posibilitarse la coexistencia con *A. swirskii*, el resultado podría ser una mayor fuerza de interacción con la presa inicial. Precisamente por todo ello, la elevada capacidad depredadora adquirida por estos insectos como consecuencia del proceso de selección podría suponer una ventaja sustancial a la hora de usarlos como una herramienta de control biológico inundativo, muy eficaz en circunstancias de un aumento descontrolado de las poblaciones de trips. Esto es así porque, en la relación intragremial entre *Orius* y *Amblyseius*, la depredación del primero sobre el segundo se produce sin que sea necesaria la muerte del trips (Rosenheim *et al* 1995), ya que ambos depredadores pueden encontrarse entre sí mientras se alimentan de forma aleatoria en un entorno compartido. Por tanto, el éxito de este sistema combinado va a depender de la abundancia relativa del ácaro fitoseido y del trips adulto (Polis *et al* 1989, Holt y Huxel 2007), por lo que en circunstancias en las que la suelta inundativa se hiciera necesaria, nuestra población mejorada para un tamaño más grande sería capaz de controlar los picos poblacionales de la plaga sin poner en riesgo el control biológico debido a un efecto significativo en la DIG sobre *A. swirskii* que no se daría en este caso.

Los resultados de nuestros ensayos cobran especial relevancia en cuanto al nivel de DIG observado si tenemos que en cuenta que la mayoría de las observaciones realizadas sobre este fenómeno proceden de experimentos de laboratorio en los que se hace uso de escenarios muy pequeños (Cloutier y Johnson 1993) o bien de espacios reducidos en campo (Rosenheim *et al* 1993). En estas condiciones, los depredadores no pueden hacer más que alimentarse unos de otros mientras comparten la misma presa. Sin embargo, en las condiciones que se dan en un invernadero, la DIG puede ser menos intensa debido a varias razones. En primer lugar, una mayor densidad de la presa diana puede, como decimos, reducir la tasa de depredación entre ambos depredadores (Gillespie y Quiring 1992, Cloutier y Johnson 1993). En segundo lugar, la propia planta puede proporcionar refugios, como los domacios, que frecuentemente son ocupados por *A. swirskii* y que los ayudan a evitar a otros depredadores superiores como *O. laevigatus* (Schmidt 2014). En tercer lugar, la presa objetivo puede crear refugios que ayuden a un depredador lo suficientemente pequeño a escapar de los depredadores más grandes. Un ejemplo de estos refugios podrían ser las agallas inducidas por los trips (Sabelis y van Rijn 1997), que pueden ser invadidas por trips depredadores y ácaros fitoseidos, pero no por un depredador como *Orius*,

máxime si éste ha sido seleccionado artificialmente para un mayor tamaño, como es el caso de BIG30. Además, ambos depredadores pueden evitarse mutuamente mediante la fragmentación del nicho espacial y la estructura del hábitat, o bien gracias a la presencia de un recurso alternativo. Al alimentarse de presas distintas o gracias a la suplementación con polen, los fitoseidos dispondrían de refugios temporales (Weintraub *et al* 2007), y tanto ellos como los depredadores superiores, en este caso *O. laevigatus*, podrían distribuirse de forma separada dentro de la planta, reduciéndose la tasa de encuentro entre ellos y facilitando la coexistencia (Janssen *et al* 2007, Bouagga *et al* 2018). Sea como fuere, si evitar la depredación intragremial es la regla y no la excepción, la reducción en la intensidad de la tasa de depredación de *O. laevigatus* sobre *A. swirskii* observada en el laboratorio en el caso de nuestras líneas mejoradas no debería sino hacerse más patente en condiciones de campo, por lo que cabría esperar que la coexistencia entre ambos depredadores tuviese un efecto aditivo en la supresión de las poblaciones del trips y de otras plagas clave como la mosca blanca, favoreciendo el éxito del control biológico.

En definitiva, los resultados de nuestros ensayos con *A. swirskii* nos han permitido demostrar, por un lado, que nuestras poblaciones mejoradas para un tamaño más grande y para una mayor tolerancia al polen tienen mayor preferencia por el trips adulto que las hembras de la población comercial, y recurren a la depredación intragremial con menor frecuencia. Por otro lado, la adición de polen al sistema tritrófico que forman ambos depredadores y el trips adulto tiene un efecto positivo en la coexistencia entre ambos depredadores, especialmente en el caso de la población tolerante a la alimentación sin presa. Por lo tanto, nos encontramos ante dos líneas mejoradas que suponen herramientas que podrían tener un impacto muy significativo en el control integrado del trips en situaciones en las que la coexistencia con *A. swirskii* se ve seriamente comprometida como es al inicio del cultivo o en condiciones de ausencia o bajo nivel de presas.

## Referencias

- Bouagga S, Urbaneja A, Pérez-Hedo M. 2018. Combined use of predatory mirids with *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) to enhance pest management in sweet pepper. *J Econ Entomol* 111(3): 1112-1120. <https://doi.org/10.1093/jee/toy072>.
- Brødsgaard HF. 2004. Biological control of thrips on ornamental crops. En: Heinz KM, van Driesche RG, Parrella MP (eds), *Biocontrol in Protected Culture*. Ball Publishing, Batavia, IL, 253-264.
- Brødsgaard HF, Enkegaard A. 2005. Intraguild predation between *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) and *Iphiseius degenerans* Berlese (Acarina: Phytoseiidae). *IOBC/WPRS Bull* 28: 19-22.
- Buitenhuis R, Murphy G, Shipp L, Scott-Dupree C. 2015. *Amblyseius swirskii* in greenhouse production systems: a floriculture perspective. *Exp Appl Acarol* 65: 451-464. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9869-9>.
- Calabuig A, Pekas A, Wäckers FL. 2018. The quality of nonprey food affects cannibalism, intraguild predation, and hyperpredation in two species of phytoseiid mites. *J Econ Entomol* 111: 72-77. <https://doi.org/10.1093/jee/tox301>.
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. 2012. Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci Technol* 22: 1398-1416. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494>.

- Calvo FJ, Knapp M, van Houten Y, Hoogerbrugge H, Belda J. 2015. *Amblyseius swirskii*: what made this predatory mite such a successful biocontrol agent? *Exp Appl Acarol* 65: 419-433. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9873-0>.
- Chambers RJ, Long S, Helyer NL. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hem.: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the UK. *Biocontrol Sci Techn* 3: 295-307. <https://doi.org/10.1080/09583159309355284>.
- Charnov EL. 1976. Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theor Pop Biol* 9: 129-136. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(76\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0040-5809(76)90040-X).
- Chow A, Chau A, Heinz KM. 2008. Compatibility of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) with *Amblyseius (Iphiseius) degenerans* (Acari: Phytoseiidae) for control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse roses. *Biol Control* 44: 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.11.002>.
- Chow A, Chau A, Heinz KM. 2010. Compatibility of *Amblyseius (Typhlodromips) swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) and *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on roses. *Biol Control* 53 (2): 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.12.008>.
- Chow A, Mackauer M. 1991. Patterns of host selection by four species of aphidiid (Hymenoptera) parasitoids: influence of host switching. *Ecol Entomol* 16: 403-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1991.tb00233.x>.
- Cloutier C, Johnson SG. 1993. Predation by *Orius tristicolor* (Hemiptera, Anthocoridae) on *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae): testing for compatibility between biocontrol agents. *Environ Entomol* 22: 477-482. <https://doi.org/10.1093/ee/22.2.477>.
- Coll M. 1998. Living and feeding on plants in predatory Heteroptera. En: Coll M, Ruberson LR (Eds), *Predatory Heteroptera: Their Ecology and Use in Biological Control*. Entomological Society of America, Lanham, MD, USA 89-129.
- Daugherty MP, Harmon JP, Briggs CJ. 2007. Trophic supplements to intraguild predation. *Oikos* 116: 662-677. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15378.x>.
- Delisle JF, Shipp L, Brodeur J. 2015. Apple pollen as a supplemental food source for the control of western flower thrips by two predatory mites, *Amblyseius swirskii* and *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae), on potted chrysanthemum. *Exp Appl Acarol* 65: 495-509. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9863-2>.
- Denno RF, Fagan WF. 2000. Might nitrogen limitation promote omnivory among carnivorous arthropods. *Ecology* 84: 2522-2531. <https://doi.org/10.1890/02-0370>.
- Eubanks MD, Denno RF. 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* 25: 1-7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00243.x>.
- Ghasemzadeh S, Leman A, Messelink GJ. 2017. Biological control of *Echinothrips americanus* by phytoseiid predatory mites and the effect of pollen as supplemental food. *Exp Appl Acarol* 73: 209-221. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0191-1>.

- Gillespie DR, Quiring DJM. 1992. Competition between *Orius tristicolor* (White) (Hemiptera: Anthocoridae) and *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) feeding on *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Can Entomol* 124: 1123-1128. <https://doi.org/10.4039/Ent1241123-6>.
- Goleva I, Zebitz CPW. 2013. Suitability of different pollen as alternative food for the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari, Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 61: 259-283. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9700-z>.
- Guillén J, Navarro M, Bielza, P. 2014. Cross-resistance and baseline susceptibility of spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 107 (3): 1239-1244. <https://doi.org/10.1603/EC13397>.
- Holt RD, Huxel GR. 2007. Alternative prey and the dynamics of intraguild predation: theoretical perspectives. *Ecology* 88: 2706-2712. <https://doi.org/10.1890/06-1525.1>.
- Holt RD, Polis GA. 1997. A theoretical framework for intraguild predation. *Am Nat* 149 (4): 745-764.
- Hoogerbrugge H, van Houten Y, van Baal E, Bolckmans K. 2008. Alternative food sources to enable establishment of *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) on chrysanthemum without pest presence. *Bull OILB/SROP* 32: 79-82.
- Janssen A, Sabelis MW. 2015. Alternative food and biological control by generalist predatory mites: the case of *Amblyseius swirskii*. *Exp Appl Acarol* 65: 413-418. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9901-8>.
- Janssen A, Sabelis MW, Magalhães S, Montserrat M, van der Hammen T. 2007. Habitat structure affects intraguild predation. *Ecology* 88: 2713-2719. <https://doi.org/10.1890/06-1408.1>.
- Leman A, Messelink GJ. 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experim Appli Acar* 65: 511-524. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9859-y>.
- Leon-Beck M, Coll M. 2007. Plant and prey consumption cause a similar reductions in cannibalism by an omnivorous bug. *J Insect Behav* 20: 67-76. <https://doi.org/10.1007/s10905-006-9063-y>.
- Lundgren JG. 2009. Relationships of natural enemies and non-prey foods progress in biological control. Springer Science, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9235-0>.
- Madadi H, Enkegaard A, Brødsgaard HF, Kharrazi-Pakdel A, Ashouri A, Mohaghegh-Neishabouri J. 2008. *Orius albidipennis* (Heteroptera: Anthocoridae): intraguild predation of and prey preference for *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) on different host plant. *Entomol Fenn* 19: 1-9. <https://doi.org/10.33338/ef.84411>.
- Magalhães S, Tudorache C, Montserrat M, van Maanen R, Sabelis MW, Janssen A. 2004. Diet of intraguild predators affects antipredator behavior in intraguild prey. *Behav Ecol* 16: 364-370. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh171>.
- Malais MH, Ravensberg WJ. 2003. Knowing and recognizing. The biology of glasshouse pests and their natural enemies. Koppert B.V., Berkel en Rodenrijs, The Netherlands.

- Marcossi I, Fonseca MM, Carbajal PAF, Cardoso A, Pallini A, Janssen A. 2020. High-quality alternative food reduces cannibalism in the predatory mite *Amblyseius herbicolus* (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 81(2): 189-200. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00500-7>.
- Matsumura M, Trafelet-Smith GM, Gratton C, Finke DL, Fagan WE, Denno RF. 2004. Does intraguild predation enhance predator performance? A stoichiometric perspective. *Ecology* 85: 2601-2615. <https://doi.org/10.1890/03-0629>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020a. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. *J Pest Sci* 1:14. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01291-x>.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biol Control* 148: 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>.
- Messelink GJ, Bennison J, Alomar O, Ingegno BL, Tavella L, Shipp L, Palevsky E, Wäckers FL. 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *BioControl* 59: 377-393. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9579-6>.
- Messelink G, van Steenpaal SEF, Ramakers PMJ. 2006. Evaluation of phytoseiid predators for control of western flowers thrips on greenhouse cucumber. *BioControl* 51: 753-768. <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9013-9>.
- Murdoch WW. 1969. Switching in general predators: experiments on predator specificity and stability of prey populations. *Ecol Monogr* 39: 335-342. <https://doi.org/10.2307/1942352>.
- Onzo A, Hanna R, Negloh K, Toko M, Sabelis MW. 2005. Biological control of cassava green mite with exotic and indigenous phytoseiid predators - Effects of intraguild predation and supplementary food. *Biol Control* 33: 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.02.006>.
- Oveja MF, Riudavets J, Arnó J, Gabarra R. 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *Biocontrol* 61: 47-56. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9690-3>.
- Pijnakker J, Ramakers P. 2008. Predatory mites for biocontrol of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in cut roses. *IOBC Bull* 32: 171-174.
- Polis GA, Myers CA, Holt RD. 1989. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 20: 297-330. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.001501>.
- Ramakers PMJ. 1993. Coexistence of two thrips predators, the anthocorid *Orius insidiosus* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* on sweet pepper. *IOBC/WPRS Bull* 16: 133-136.
- Rosenheim JA. 1998. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. *Annu Rev Entomol* 43: 421-447. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.421>.
- Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ, Jaffee BA. 1995. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. *Biol Control* 5: 303-335. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1038>.

- Rosenheim JA, Wilhoit LR, Armer CA. 1993. Influence of intraguild predation among generalist insect predators on the suppression of an herbivore population. *Oecologia* 96: 439-449. <https://doi.org/10.1007/BF00317517>.
- Sabelis MW, van Rijn PCJ. 1997. Predation by insects and mites. En: Lewis T. (ed), *Thrips as crop pests*, CAB International, Wallingford, UK. 259-354.
- Sanderson JP, Brødsgaard HF, Enkegaard A. 2005. Preference assessment of two *Orius* spp. for *Neoseiulus cucumeris* vs. *Frankliniella occidentalis*. *Bull IOBC/WPRS* 28: 221-224.
- Schmidt RA. 2014. Leaf structures affect predatory mites (Acari: Phytoseiidae) and biological control: a review. *Exp Appl Acarol* 62:1-17. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9730-6>.
- Shakya S, Coll M, Weintraub PG. 2010. Incorporation of intraguild predation into a pest management decision-making tool: the case of thrips and two pollen-feeding predators in strawberry. *J Econ Entomol.* 103: 1086-93. <https://doi.org/10.1603/EC09373>.
- Shakya S, Weintraub PG, Coll M. 2009. Effect of pollen supplement on intraguild predatory interactions between two omnivores: the importance of spatial dynamics. *Biol Control* 50:281-287. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.012>.
- Shipp JL, Ramakers PMJ. 2004. Biological control of thrips on vegetable crops. En: Heinz KM, van Driesche RG, Parrella MP (eds), *Biocontrol in Protected Culture*. Ball Publishing, Batavia, IL, 265-276.
- Skirvin D, Kravar-Garde L, Reynolds K, Jones J, de Courcy Williams M. 2006. The influence of pollen on combining predators to control *Frankliniella occidentalis* in ornamental chrysanthemum crops. *Biocontrol Sci Technol* 16: 99-105. <https://doi.org/10.1080/09583150500258636>.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry* WH Freeman and Company, New York.
- Stephens DW, Krebs JR. 1986. *Foraging Theory*, Princeton Univ. Press, Princeton.
- Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Ann Rev Entomol* 47: 561-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>.
- Van Maanen R, Broufas G, De Jong P, Aguilar-Fenollosa E, Revynthi A, Sabelis MW, Janssen A. 2015. Predators marked with chemical cues from one prey have increased attack success on another prey species. *Ecol Entomol* 40: 62-68. <https://doi.org/10.1111/een.12159>.
- Van Rijn PCJ. 2002. The impact of supplementary food on a prey-predator interaction. PhD Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.
- Wei HC. 2019. A mathematical model of intraguild predation with prey switching. *Mathematics and Computers in Simulation*. <https://doi.org/10.1016/j.matcom.2019.03.004>.
- Weintraub PG, Kleitman S, Alchanatis V, Palevsky E. 2007. Factors affecting the distribution of a predatory mite on greenhouse sweet pepper. *Exp. Appl. Acarol.* 42: 23-35. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9077-y>.

Weintraub P, Pivonia S, Steinberg S. 2011. How many *Orius laevigatus* are needed for effective western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, management in sweet pepper? *Crop Prot* 30: 1443-1448. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.07.015>.

Wimmer D, Hoffmann D, Schausberger P. 2008. Prey suitability of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and onion thrips, *Thrips tabaci*, for the predatory mite *Amblyseius swirskii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 18: 541-50. <https://doi.org/10.1080/09583150802029784>.

Wittman EJ, Leather SR. 1997. Compatibility of *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera, Anthochoridae) with *Neioseius (Amblyseius) cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) and *Iphiseius (Amblyseius) Berlese* (Acari: Phytoseiidae) in the biocontrol of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae). *Exp Appl Acarol* 21: 523-538. <https://doi.org/10.1023/A:1018440214801>.

## Discusión general y conclusiones

La aplicación del control biológico aumentativo en la agricultura como herramienta para suprimir a las plagas ha experimentado un importante crecimiento en el último siglo que ha llevado a una gran profesionalización del sector (van Lenteren 2012). En el caso del pimiento bajo abrigo en el Campo del Cartagena, durante los primeros años del siglo XXI tuvo lugar un cambio de paradigma que provocó la sustitución de insumos químicos por enemigos naturales como *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae), gracias al esfuerzo colectivo de diferentes agentes del sector, entre ellos agricultores, técnicos, investigadores e industria especializada. Sin embargo, quedan pendientes importantes retos en la aplicación exitosa de los programas de control biológico. Por ejemplo, muchos de estos agentes de control se aplican mejor de forma preventiva que curativa y, por tanto, pueden no ser útiles si una población de plagas ha alcanzado su umbral económico de daños (De Backer *et al* 2015, Weintraub *et al* 2017). Este es el caso de *O. laevigatus*, cuyo éxito se basa en su capacidad para controlar al trips de las flores incluso a niveles muy reducidos de sus poblaciones pero que, en cambio, encuentra dificultades para reducir sus poblaciones cuando éstas han aumentado de forma considerable en el invernadero. Además de las limitaciones del tamaño de las poblaciones de presas, los desajustes entre el estadio de vida y el tamaño del enemigo natural en relación con los de las plagas disponibles también pueden ser problemáticos y limitar el establecimiento del agente en el cultivo (Hoelmer *et al* 1993, Gerling *et al* 2001). En este sentido, la elevada capacidad depredadora sobre larvas y adultos de trips registrada en el Capítulo 4 de esta tesis para nuestra línea seleccionada para un tamaño superior, BIG30, con respecto a la de una población comercial tan contrastada como la suministrada por Agrobio SL, hace de esta población mejorada una herramienta de control curativo de gran eficacia ante situaciones de semejante gravedad para el cultivo.

Por otro lado, la introducción de *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) en la campaña 2007/2008 y su inmediata implementación en un sistema combinado con *O. laevigatus* supusieron un punto de inflexión que derivó en la aparición del control biológico de conservación (Calvo *et al* 2012, Pumariño y Alomar 2012). Esta estrategia de control de plagas consiste en potenciar la aparición de agentes de control biológico en el agroecosistema a través de un manejo eficiente del mismo (Letourneau *et al* 2011), y es que los sistemas agrícolas convencionales a menudo carecen de fuentes adecuadas de alimentos o de los hábitats necesarios para mantener a las poblaciones de enemigos naturales (Pekas y Wäckers 2017). En la práctica, el control biológico de conservación incluye la reducción al mínimo del uso de plaguicidas, la correcta gestión del hábitat rodeando los cultivos con plantas con flor o cultivos de cobertura que proporcionen refugio y alimento, o el suministro directo de recursos alimenticios (Van Driesche y Bellows 1996). En este contexto, el control biológico conservativo alcanzó un punto crítico en el Campo de Cartagena a partir de la publicación de la reciente Ley Orgánica 1/2018, de 7 de febrero, de medidas urgentes para garantizar la sostenibilidad ambiental en el entorno del Mar Menor (BOE 2018), donde se articula la obligatoriedad de implantar, en aquellas explotaciones que incluyan tierras de cultivo, y con un plazo máximo de tres años, estructuras vegetales de barrera y conservación destinadas a favorecer la retención y absorción de nutrientes y, especialmente, a mejorar la biodiversidad del agroecosistema. Ante esta nueva situación, las oportunidades para un enemigo natural omnívoro

como *O. laevigatus* de establecerse a largo plazo en el cultivo se expanden considerable, especialmente antes de que las poblaciones de plagas estén presentes, en períodos de escasez de presas o en circunstancias en las que la floración se reduce en el pimiento de invernadero, con el consiguiente ahorro técnico y económico para el agricultor.

A lo largo de esta tesis hemos podido comprobar cómo la mejora genética de los enemigos naturales que con mayor frecuencia se emplean en nuestros cultivos puede ir dirigida a optimizar sus estrategias de alimentación e incluso conducir a una especialización trófica que les confiera determinadas cualidades de gran importancia agronómica. En este sentido, cabe esperar que, en un sistema agrícola dotado de una elevada biodiversidad tanto vegetal como de artrópodos como el que se pretende fomentar a gran escala en nuestra región, las poblaciones de *O. laevigatus* desarrolladas a través de los programas de mejora genética descritos en esta tesis, ya sea BIG30, con una voracidad superior, o bien nuestras líneas con una mayor tolerancia a la alimentación sin presa, 1POL-13 y 2POL-11, vean potenciadas sus cualidades como agentes de control biológico. No en vano, en el Capítulo 2 se demostró la capacidad superior de nuestra línea de mayor tamaño para desarrollarse no sólo en condiciones óptimas sino también a partir de una mezcla comercial de polen de abeja, en comparación con una serie de líneas silvestres y comerciales. Por otro lado, en el Capítulo 4 se detalla cómo esta misma población sale victoriosa de esa misma comparación con respecto a su rendimiento cuando se le presenta una presa *a priori* no preferida como el trips adulto, efecto que también se recoge en el Capítulo 5 para 2POL-11, con el añadido de un rendimiento también más elevado sobre el pulgón *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae). Esta relación entre el control biológico conservativo y la mejora de los enemigos naturales omnívoros desde el punto de vista de la alimentación ya había sido explorada por Kean *et al* (2003), quienes reportaron varios casos en los que la adición de un alimento alternativo al cultivo permitía incrementar tanto el rendimiento del depredador sobre la presa como su abundancia en el cultivo. Sin embargo, estos autores hacían hincapié en la importancia de adoptar estrategias bien dirigidas que incorporasen la compatibilidad morfológica / fisiológica de las especies de flores y enemigos naturales para elevar las posibilidades de éxito y, así, minimizar el riesgo de efectos adversos. La mejora genética en el sentido en que se ha planteado en esta tesis, por su parte, permite incrementar el rango de compatibilidad entre los enemigos naturales y sus recursos, favoreciendo el establecimiento a largo plazo de artrópodos más generalistas en un entorno natural más flexible y, al mismo tiempo, manteniendo una mejora general en el potencial de supresión de las plagas. La ausencia de coste ecológico en la respuesta funcional de la población mejorada 2POL-11 sobre el segundo estadio del trips, detallada en el Capítulo 5, a pesar de la especialización trófica adquirida durante el proceso de selección, es una prueba incuestionable de ello.

También es importante no olvidar que la alternancia entre diferentes tipos de presa, ampliamente demostrada para nuestras poblaciones mejoradas en los Capítulos 4 y 5, frecuentemente se ha señalado como una herramienta capaz de dotar de gran estabilidad a las poblaciones de enemigos naturales (Jaworski *et al* 2013). Tal es así que *Macrolophus pygmaeus* R. (Hemiptera: Miridae), por ejemplo, es incapaz de controlar a *Tuta absoluta* a menos que haya una presa alternativa presente (Jaworski *et al* 2013, Sylla *et al* 2016). Estudios como éstos o los de los Capítulos 4 y 5 de esta tesis demuestran que depredadores generalistas como *O. laevigatus* pueden beneficiarse de la disponibilidad de una amplia diversidad de recursos, incrementando sus poblaciones y ayudándoles a lograr un control de plagas más eficiente y estable. Esta noción de alternancia de presas y recursos no es nueva, sino que representa un elemento más del control biológico conservativo (Benson y Labbe 2021) y que además resulta fundamental para garantizar una coexistencia estable en el tiempo entre *O. laevigatus* y *A. swirskii*. No en vano, en el Capítulo 6 hemos podido comprobar que la preferencia superior de BIG30 por el adulto de trips sobre el ácaro

fitoseido o la adición de polen al sistema en el caso de 2POL-11 tienen un efecto positivo en la debilitación de la depredación intragremial del antocórido sobre *A. swirskii*.

Por otro lado, en los Capítulos 2 y 3 se demostró la eficacia mejorada de nuestras poblaciones seleccionadas tanto desde el punto de vista de la fecundidad como en términos de longevidad total cuando se alimentaba a las hembras con una dieta basada exclusivamente en polen. Este hecho provee de una ventaja sustancial a estas poblaciones en comparación con las de referencia ante una situación de escasez de presas en el contexto del control biológico conservativo, dado su rendimiento superior con una dieta subóptima. Sin ir más lejos, sus valores de fecundidad más altos les permitirían incrementar su abundancia en el cultivo, mientras que su mayor longevidad, junto con una respuesta funcional optimizada sobre distintos tipos de presas (Capítulos 4 y 5), les daría más tiempo para realizar un número mayor de ataques y por lo tanto para suprimir a la plaga incluso a una densidad más baja de la misma. En este sentido, lo ideal sería que, de acuerdo con los modelos desarrollados por Kean *et al* (2003), la eficacia de búsqueda y la tasa máxima de ataque obtenidas para nuestras poblaciones fueran independientes de la longevidad, de manera que el aumento registrado para esta última condujera a un área superior de búsqueda durante la vida y a un número de ataques más alto. Pero antes de confirmar este extremo es necesario profundizar en los estudios de respuesta funcional con nuestras líneas mejoradas, tanto durante un periodo de tiempo superior como en condiciones más similares a las del sistema agrícola.

En cualquier caso, es evidente que las estrategias de suplementación de las sueltas de enemigos naturales con alguna dieta alternativa, ya sea con polen o a través del uso de plantas refugio de pulgón, podrían ser plenamente aprovechadas por nuestras razas seleccionadas de *O. laevigatus*. Son muchas las evidencias que sugieren que un alimento suplementario puede mantener una gran diversidad de depredadores en condiciones de cultivo muy diversas (Messelink *et al* 2014), aunque tales alimentos se aplican aún con poca frecuencia (Seko *et al* 2019, Pandey *et al* 2020). Esto se debe en parte a que, en muchos casos, las combinaciones de depredadores y alimentos no se han probado a la escala y complejidad de los invernaderos comerciales (Benson y Labbe 2021). Debido a sus hábitos más flexibles de alimentación zoofitófaga, nuestras líneas mejoradas pueden acceder a una variedad superior de recursos, reduciendo el coste del control biológico para el agricultor pero también para la industria que se encargara de su producción en masa, dado el elevado coste de los huevos de lepidópteros como *Ephestia kuehniella* Z. o *Sitotroga cerealella* O. en los que casi siempre se basa la cría de este depredador (de Clercq 2008, Benson y Labbe 2021). No obstante, se necesitan nuevos estudios que nos permitan explorar en mayor medida la amplitud adquirida por estas poblaciones en cuanto a su espectro de presas. Algunos de estos estudios, ya sin incluir en esta tesis, nos han permitido demostrar que nuestra raza seleccionada con polen y adaptada a una alimentación subóptima también se comporta mejor con una dieta basada en ácaros astigmátidos en comparación con una población comercial, mostrando valores más altos de supervivencia durante el desarrollo juvenil, así como una longevidad y fecundidad también superiores (Bielza 2021). Estos ácaros astigmátidos, por tanto, podrían emplearse como un alimento suplementario rentable para estos depredadores directamente en el cultivo, como parte de una estrategia de control biológico.

Por último, es importante destacar la solución que nuestra población de gran tamaño aporta a la hora de abordar otros retos a los que se enfrenta *O. laevigatus* en el cultivo. Por un lado, hemos podido comprobar que una población de este insecto seleccionada para un tamaño más grande como es la de BIG30 presenta una tolerancia a bajas temperaturas (15 °C) superior a la de otras líneas de referencia (Bielza 2021) en base a su fecundidad en estas condiciones, permitiéndole incrementar el nivel de sus poblaciones tan pronto como son liberados en el cultivo durante los primeros meses del invierno, con lo que eso conlleva para el potencial total de supresión del trips.

Por otro lado, una población de *O. laevigatus* seleccionada para una mayor resistencia a spinosad mostró un tamaño similar al de BIG30 y, por tanto, superior al de una serie de poblaciones comerciales y silvestres (Balanza 2021), lo que podría sugerir una relación entre el tamaño y la adquisición de una cierta resistencia a esta materia activa. Por tanto, y a pesar de que los resultados parecen indicar que se trata de una resistencia en el punto de acción (Balanza *et al* 2021), sería interesante evaluar la respuesta de nuestra población BIG30 a la dosis de campo de aquellos insecticidas que se utilizan de forma habitual en el pimiento, ante la posibilidad de hallar en ella alguna forma de resistencia metabólica asociada a la mejora en el tamaño. Finalmente, es bien sabido que cultivos como el tomate son hostiles no sólo para los herbívoros sino también para los enemigos naturales que se utilizan para controlarlos (van Haren *et al* 1987). Los tricomas y metabolitos secundarios que produce el tomate, como la  $\alpha$ -tomatina o el ácido clorogénico, no sólo las protegen de muchas plagas, sino que también afectan a niveles tróficos superiores, como los enemigos naturales, a través de efectos directos o indirectos (Malais y Ravensberg 2003, Paspatis 2019). Este es el caso del orius, cuyo uso no se aconseja para el control biológico en este cultivo, al quedar los insectos atrapados entre los tricomas de los tallos y por sufrir efectos letales y subletales como consecuencia de los compuestos defensivos de la planta (Coll *et al* 1997, Bielza *et al* 2020). Sin embargo, nuestro grupo de investigación está llevando a cabo una serie de bioensayos para evaluar la capacidad de nuestra línea mejorada BIG30 para desplazarse por los tallos y hojas de distintos cultivares de tomate con un rango variable de densidad de tricomas y compuestos defensivos, con resultados muy alentadores hasta el momento (datos no publicados).

Sea como fuere, la creciente aplicación del control biológico en nuevas áreas, tipos y sistemas de cultivo está dando lugar a una demanda de nuevas biosoluciones y sistemas de suelta adaptados a estos nuevos retos, abriendo así nuevos nichos que podrían ser ocupados por estos enemigos naturales mejorados genéticamente. En este sentido, aunque esta nueva tecnología en el sector agrícola, como en cualquier otro sector, parte de un trabajo de investigación aplicada, los resultados de esta fase inicial son el desarrollo imprescindible para adaptarlos a la realidad y la diversidad del campo. Y lo que es más importante, son esenciales para conquistar la confianza y la concienciación de todo el sector, sobre todo cuando se trata de un cambio estructural en la forma rutinaria de hacer las cosas. Por supuesto, la creación de un marco normativo al respecto es esencial para garantizar la calidad del material que se pretende poner a disposición del productor y del consumidor final. A lo largo de esta tesis hemos podido comprobar cómo la mejora genética de un enemigo natural como el chinche *O. laevigatus* puede constituir una herramienta más dentro del enfoque holístico en el que ha desembocado en nuestros días el control biológico de plagas, el cual ofrece una visión de 360 grados de todas las incidencias que rodean al cultivo, ya sea al aire libre o bajo plástico. Este planteamiento, que ha llegado para quedarse, supone a día de hoy un importante valor diferencial que favorece al pimiento del sureste español frente al producto de otras regiones competidoras.

## Conclusiones

Selección para un tamaño corporal superior en *Orius laevigatus*: variabilidad intraespecífica e incidencia en sus parámetros reproductivos.

- i. Encontramos una variación significativa en el tamaño corporal entre las poblaciones silvestres evaluadas, con las poblaciones comerciales comprendidas entre los límites naturales de la especie.

- ii. El proceso de selección dio lugar con éxito a una población seleccionada (BIG30) cuyo peso corporal es un 25% mayor que el de la población inicial sin seleccionar y un 28% superior al peso medio de las poblaciones silvestres y comerciales. La línea mejorada mostró una anchura del pronoto un 8% mayor que el tamaño medio de las poblaciones silvestres y comerciales.
- iii. No se observaron costes ecológicos significativos como resultado del proceso de selección en cuanto a la longevidad, los tiempos de desarrollo juvenil, la tasa de supervivencia de las ninfas o los parámetros de tabla de vida (tasa intrínseca de crecimiento natural, tasa reproductiva neta, tasa finita de crecimiento, capacidad innata de crecimiento, tiempo de generación y tiempo de duplicación de la población) cuando se alimentó a los individuos de forma óptima (con huevos de *Ephestia*).
- iv. Las hembras de BIG30 presentan parámetros reproductivos (fecundidad temprana y fecundidad total) significativamente mejorados con respecto a los de las poblaciones de referencia.
- v. En condiciones de alimentación subóptima (con polen), BIG30 mostró parámetros reproductivos y de longevidad significativamente superiores a los de las poblaciones de referencia.

#### Selección de una línea de *Orius laevigatus* con una eficacia mejorada en la alimentación con polen.

- i. Se ha observado una variabilidad significativa para la especie entre las poblaciones comerciales y silvestres evaluadas para su fecundidad durante los primeros 10 días, tanto con una dieta óptima basada en huevos de *Ephestia* como en el caso de la dieta restringida basada en polen.
- ii. El valor nutricional de la dieta tuvo un efecto claro en la fecundidad, con un aumento del 67% en la puesta de huevos con huevos de *Ephestia*.
- iii. Ambas líneas genéticas mejoradas (1POL-13 y 2POL-11) presentaron valores de fecundidad más altos cuando se alimentaron con polen que todas las poblaciones silvestres y comerciales de partida, pero sólo para 2POL-11 estas diferencias fueron significativas.
- iv. En condiciones óptimas de alimentación, ambas poblaciones mejoradas mostraron cierto retraso en el desarrollo de huevo a adulto. No se observó coste ecológico alguno en cuanto a la supervivencia de las ninfas y los adultos, la longevidad, los parámetros de tabla de vida o la fecundidad, aunque 2POL-11 mostró un patrón de oviposición y una tasa reproductiva neta superior a 1POL-13.
- v. Con una dieta basada en polen, la supervivencia de ninfas y adultos y la longevidad fue significativamente más alta en las poblaciones seleccionadas que en las de referencia. Las hembras de 2POL-11 vivieron 10 días más que las de las líneas de referencia, aunque las dos cepas mejoradas mostraron un rendimiento reproductivo significativamente superior al del resto de poblaciones sometidas a estrés nutricional, como se refleja en los valores más altos para fecundidad y parámetros de tabla de vida y en su patrón reproductivo adelantado en el tiempo.
- vi. La ganancia genética alcanzada en las líneas seleccionadas se debe al proceso de selección y no a la plasticidad fenotípica natural de *O. laevigatus* para tolerar la restricción nutricional.

Respuesta funcional mejorada sobre larvas y adultos de *Frankliniella occidentalis* en una línea de *Orius laevigatus* seleccionada artificialmente para un tamaño más grande.

- i. Se observó una relación directa, positiva y constante entre el tamaño de la hembra y la tasa de depredación a densidades elevadas de trips, independientemente de la población analizada y del estadio ofrecido.
- ii. Las hembras de *Orius* con un tamaño mayor (BIG30) consumieron significativamente más trips que las comerciales independientemente de la densidad de presas, con tasas de depredación sobre la larva de segundo estadio y el adulto un 66 y un 145% superiores, respectivamente.
- iii. No se observaron diferencias significativas entre la población mejorada y la comercial en su respuesta funcional sobre el pulgón *M. persicae*.
- iv. Ambas poblaciones mostraron una respuesta funcional de tipo II independientemente del tipo de presa ofrecida.
- v. BIG30 mostró valores de tasa de ataque más altos y de tiempo de manipulación más bajos que la población comercial, independientemente del estadio del trips ofrecido. Sin embargo, estas diferencias fueron significativas únicamente para el tiempo de manipulación, hasta un 72% más corto en BIG30 sobre el trips adulto.
- vi. La tasa de depredación máxima teórica fue del doble en BIG30 para la larva de trips y hasta cuatro veces superior para el adulto.
- vii. El orden de preferencia observado para ambas poblaciones fue el siguiente:  
 Agrobio: 2º estadio del trips > pulgón > trips adulto.  
 BIG30: 2º estadio del trips > trips adulto > pulgón.

Evaluación de la respuesta funcional en una población de *Orius laevigatus* seleccionada artificialmente para una mayor tolerancia al polen.

- i. Pese a su tamaño más pequeño y a la especialización trófica adquirida para una dieta subóptima, 2POL-11 no presentó coste ecológico en las tasas de depredación ni en los parámetros de respuesta funcional (tasa de ataque, tiempo de manipulación y tasa máxima teórica) sobre ambos estadios del trips, larva y adulto.
- ii. 2POL-11 mostró una tasa de depredación diaria claramente superior a Agrobio sobre ninfas de *M. persicae* y ligeramente por encima en el caso de ambos estadios del trips, aunque no se observaron diferencias significativas entre las dos poblaciones para los parámetros de respuesta funcional, independientemente del tipo de presa ofrecida.
- iii. La tasa de depredación muestra una fuerte dependencia de la densidad de presas, independientemente del tipo de presa ofrecida.
- iv. En ambas poblaciones ensayadas, los parámetros se ajustan de forma razonable a una respuesta funcional de tipo II, independientemente del tipo de presa ofrecida.
- v. El orden de preferencia observado para ambas poblaciones fue el siguiente:  
 Agrobio: 2º estadio del trips > pulgón = trips adulto.  
 2POL-11: 2º estadio del trips > pulgón > trips adulto.

Importancia de la diversificación de la dieta en la coexistencia entre *Orius laevigatus* y *Amblyseius swirskii*: alternancia de presas y depredación intragremial.

- i. La tasa de depredación sobre *A. swirskii* muestra una relación positiva y constante con el número de ácaros ofrecidos, independientemente de la población ensayada y de la disponibilidad de polen como suplemento alimenticio.
- ii. El empleo de polen como suplemento tuvo un efecto significativo en la depredación intragremial, siendo ésta inferior en presencia de polen que en ausencia del mismo, especialmente en 2POL-11 (43% menos).
- iii. La población BIG30 depreda al 70% de ácaros disponibles; 2POL-11, al 40%; la población comercial, al 53%. Esto indica una dependencia relativa entre el tamaño de la hembra y el efecto de la depredación intragremial.
- iv. La población comercial muestra una preferencia clara por *A. swirskii* frente al adulto de *F. occidentalis* tanto en ausencia como en presencia de polen como suplemento. En cambio, ambas poblaciones mejoradas muestran una preferencia superior por el trips adulto: BIG30, como consecuencia de su elevada capacidad para someter al adulto del trips, independientemente de la adición o no de polen; y 2POL-11, en presencia de polen como suplemento alimenticio.
- v. En 2POL-11 se observa un patrón claro de alternancia entre ambos tipos de presas, lo que permite reducir el efecto de la depredación intragremial hasta el 30% (45-46% para Agrobio y BIG30) o incluso menos en presencia de polen.

## Conclusions

Selection for a larger body size in *Orius laevigatus*: intraspecific variability and impact on reproductive parameters.

- i. We found a significant variability in body size among wild populations assessed, with commercial populations ranging within the natural limits of the species.
- ii. The selection process successfully resulted in a selected strain (BIG30) whose body weight is 25% greater than that of the initial unselected strain and 28% greater than average body weight of both wild and commercial populations. The enhanced line showed 8% larger pronotum width as compared to the average size of wild and commercial populations.
- iii. No significant trade-offs were observed as a result of the selection process in terms of longevity, immature developmental times, nymph survival rate or life table parameters (intrinsic natural growth rate, net reproductive rate, finite growth rate, innate growth capacity, generation time and population doubling time) for individuals being optimally fed (with *Ephestia* eggs).
- iv. BIG30 females showed significantly improved reproductive parameters (early and total fecundity) compared to reference populations.
- v. Under suboptimal feeding conditions (with pollen), BIG30 showed significantly higher reproductive and longevity parameters than reference, unselected populations.

Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen.

- i. A significant variation between provided and wild populations assessed was observed in *O. laevigatus* for fecundity during first 10 days, both under an optimal diet based on *Ephestia* eggs and a restricted pollen-based diet.
- ii. Nutritional value of the diet had a clear effect on fecundity, with a 67% increase in egg laying with a rich *Ephestia* egg-based diet.
- iii. Both improved genetic lines (1POL-13 and 2POL-11) exhibited higher fecundity values when fed with pollen than all wild and commercial baseline populations, but only for 2POL-11 did these differences become significant.
- iv. Under optimal feeding conditions, both enhanced populations showed some delay in egg-to-adult development. No significant trade-offs were observed in terms of nymph and adult survival, longevity, life table parameters or fecundity, although 2POL-11 showed a higher oviposition pattern and net reproductive rate than 1POL-13.
- v. With a pollen-based diet, nymph and adult survival and longevity were significantly higher in the selected populations compared to the reference populations. Females of 2POL-11 lived 10 days longer than those of the reference populations, although the two selected strains showed a significantly higher reproductive performance than the rest of the nutritionally restricted populations, as reflected in the higher values for fecundity and life table parameters as well as its earlier reproductive pattern.
- vi. Genetic gain attained in the selected lines is due to the selection process rather than to *O. laevigatus*' natural phenotypic plasticity to tolerate nutritional restriction.

Enhanced functional response on *Frankliniella occidentalis* larvae and adults in an *Orius laevigatus* strain artificially selected for a larger body size.

- i. A direct, positive and consistent relationship was observed between female size and predation rate at high thrips densities, irrespective of the population analysed and the instar offered.
- ii. Larger *Orius* females (BIG30) consumed significantly more thrips than commercial females regardless of prey density, with predation rates on second instar larvae and adults being 66% and 145% higher, respectively.
- iii. No significant differences were observed between selected and unselected populations in their functional response on *M. persicae* aphids.
- iv. Both populations showed a functional type-II response regardless the type of prey offered.
- v. BIG30 showed higher attack rate and lower handling time values than the commercial population, irrespective of the thrips stage offered. However, these differences were significant only for handling time, up to 72% shorter in BIG30 than in the adult thrips.
- vi. The theoretical maximum predation rate was twice as high in BIG30 for thrips larvae and up to four times higher for adults.
- vii. Preference order observed for both populations was as follows:  
 Agrobio: 2nd-instar thrips > aphids > adult thrips.  
 BIG30: 2nd-instar thrips > adult thrips > aphids.

Assessment of functional response in an *Orius laevigatus* population artificially selected for enhanced pollen tolerance.

- i. Despite its smaller size and acquired trophic specialization for a suboptimal diet, 2POL-11 did not show trade-offs in predation rates and functional response parameters (attack rate, handling time and theoretical maximum rate) on both larval and adult instars of thrips.
- ii. 2POL-11 showed a clearly higher daily predation rate than Agrobio on *M. persicae* nymphs and slightly higher for both instars of thrips, although no significant differences were observed between the two populations for the functional response parameters, irrespective of the type of prey offered.
- iii. Predation rates show a strong dependence on prey density, irrespective of the type of prey offered.
- iv. For both populations tested, the parameters are reasonably fitted to a functional type-II response, regardless of the prey offered.
- v. Preference order observed for both populations was as follows:  
Agrobio: 2nd-instar of thrips > aphids = adult thrips.  
2POL-11: 2nd-instar thrips > aphids > adult thrips.

Importance of dietary diversification in the coexistence between *Orius laevigatus* and *Amblyseius swirskii*: prey switching and intraguild predation.

- i. Predation rates on *A. swirskii* show a positive and constant correlation with the number of mites offered, irrespective of the population assayed and the availability of pollen as a supplementary food.
- ii. The use of pollen as supplement had a significant effect on intraguild predation, which was lower in the presence of pollen than in its absence, especially in 2POL-11 (43% less).
- iii. BIG30 strain preys upon 70% of available mites; 2POL-11, 40%; commercial strain, 53%, thus suggesting a relative dependence between female size and the effect of intraguild predation.
- iv. The commercial population showed a clear preference for *A. swirskii* over the adult thrips both in the absence and presence of pollen as supplementary food. In contrast, both improved populations exhibited a superior preference for adult thrips: BIG30, as a consequence of its high ability to subdue adult thrips, irrespective of the addition of pollen or not; and 2POL-11, in the presence of pollen as a food supplement.
- v. A clear pattern of switching between the two prey is observed in 2POL-11, thus reducing the effect of intraguild predation to 30% (45-46% for Agrobio and BIG30) or even less in the presence of pollen.

## Referencias

- Balanza V. 2021. Variabilidad genética y resistencia a insecticidas en *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) para mejorar su eficacia en el control de plagas. (Tesis inédita). Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena.
- Benson CL, Labbe RM. 2021. Exploring the role of supplemental foods for improved greenhouse Biological Control. *Ann Entomol Soc Am* 20 (20): saab005. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab005>.
- Bielza. 2021. Mejores bichos para el control biológico: razas de *Orius laevigatus* más eficaces. *Phytoma-España* 327: 67-70.
- Bielza P, Balanza V, Cifuentes D, Mendoza JE. 2020. Challenges facing arthropod biological control: Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag Sci* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>.
- BOE. 2018. Ley 1/2018, de 7 de febrero, de medidas urgentes para garantizar la sostenibilidad ambiental en el entorno del Mar Menor. *BOE* 148 (19 de junio de 2018): 61723-61759.
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. 2012. Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci Technol* 22: 1398-1416. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494>.
- Coll M, Smith LA, Ridgway RL. 1997. Effect of plants on the searching efficiency of a generalist predator: the importance of predator-prey spatial association. *Entomol Exp Appl* 83: 1-10. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00151.x>.
- De Backer L, Wäckers FL, Francis F, Verheggen FJ. 2015. Predation of the peach aphid *Myzus persicae* by the mirid predator *Macrolophus pygmaeus* on sweet peppers: effect of prey and predator density. *Insects* 62: 514-523. <https://doi.org/10.3390/insects6020514>.
- De Clercq P. 2008. Culture of natural enemies on factitious foods and artificial diets, p. 262. En: Capinera JL (ed), *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht.
- Gerling D, Alomar Ó, Arnó J. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Prot* 20: 779-799. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00111-9).
- Hoelmer KA, Osborne LS, Yokomi RK. 1993. Reproduction and feeding behavior of *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol* 86: 322-329. <https://doi.org/10.1093/jee/86.2.322>.
- Jaworski CC, Bompard A, Genies L, Amiens-Desneux E, Desneux N. 2013. Preference and prey switching in a generalist predator attacking local and invasive alien pests. *PLoS One* 8: e82231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082231>.
- Kean J, Wratten S, Tylianakis J, Barlow N. 2003. The population consequences of natural enemy enhancement, and implications for conservation biological control. *Ecology Letters* 6: 604-612. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00468.x>
- Letourneau DK, Armbrrecht I, Rivera BS, Lerma JM, Carmona EJ, Daza MC, Escobar S, Galindo V, Gutiérrez C, Duque-López S, López-Mejía J, Acosta-Rangel AM, Herrera-Rangel J, Rivera L,

- Saavedra CA, Torres M, Reyes-Trujillo A. 2011. Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review. *Ecol Appl* 21 (1): 9-21. <https://doi.org/10.1890/09-2026.1>.
- Malais MH, Ravensberg WJ. 2003. Knowing and recognizing: the biology of glasshouse pests and their natural enemies. Koppert Biological Systems.
- Messelink GJ, Bennison J, Alomar O, Ingegno BL, Tavella L, Shipp L, Palevsky E, Wäckers FL. 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *Biol Control* 59: 377-393. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9579-6>.
- Pandey P, McAuslane HJ, Smith HA. 2020. Effects of plants and supplemental prey on establishment of *Dicyphus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Fla Entomol* 1031: 64-67. <https://doi.org/10.1653/024.103.0410>.
- Paspati A. 2019. Living on an unfriendly plant host: impact of tomato on the predatory mite *Amblyseius swirskii*. (Tesis doctoral). Universitat Jaume I, Castellón.
- Pekas A, Wäckers FL. 2017. Multiple resource supplements synergistically enhance predatory mite populations. *Oecologia* 184: 479-484. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3877-5>.
- Pumarino L, Alomar O. 2012. The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. *Biol Control* 62: 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.03.007>.
- Seko T, Abe K, Miura K. 2019. Effect of supplementary food containing *Artemia salina* on the development and survival of flightless *Harmonia axyridis* in greenhouses. *Biol. Control*. 64: 333-341. <https://doi.org/10.1007/s10526-019-09935-3>.
- Sylla S, Brévault T, Diarra K, Bearez P, Desneux N. 2016. Life-history traits of *Macrolophus pygmaeus* with different prey foods. *PLoS One* 11: e0166610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166610>.
- Van Driesche RG, Bellows TS. 1996. Biological control. Publ. Chapman Hall, New York. p. 539.
- Van Haren RJF, Steenhuis MM, Sabelis MW, Deponi OMB. 1987. Tomato stem trichomes and dispersal success of *Phytoseiulus persimilis* relative to its prey *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol* 3: 115-121. <https://doi.org/10.1007/BF01270473>.
- Van Lenteren JC. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *Biocontrol* 57 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>.
- Weintraub PG, Recht E, Mondaca LL, Harari AR, Díaz BM, Bennison J. 2017. Arthropod pest management in organic vegetable greenhouses. *J Integr Pest Manag* 8: 1-14. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx021>.



