



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



Escuela Técnica Superior de  
Ingeniería Agronómica



***Máster Universitario en Técnicas  
Avanzadas en Investigación y Desarrollo  
Agrario y Alimentario***

**Caracterización biológica de un mutante en el  
agente de control biológico *Orius laevigatus***

**Autor:** Alberto Donate Gil

**Dirección:** Pablo Bielza Lino

**Codirección:** Amador Rodríguez Gómez

Cartagena, septiembre de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicialmente, con todo mi corazón, agradecer a mi profesor, tutor, jefe y amigo, Pablo, él me volvió a acoger en su laboratorio de investigación y gracias a él pude elaborar mi proyecto fin de master. Muchísimas gracias, Pablo, por creer en mí y ayudarme a crecer profesionalmente y por supuesto por todos los momentos especiales que he vivido gracias a ti. Dar INFINITAS gracias a mi compañero y amigo, Amador, por todas esas continuas risas, mis torturas hacia ti y por los días de tensión en el trabajo, él me guio y me apoyó constantemente para poder terminar este trabajo. Sin él no podría haber realizado dicho proyecto. Del mismo modo mencionar a mis compañeras del laboratorio, por ser tan buenas conmigo durante todos los días de trabajo. Os quiero infinito. En fin, gracias al Biocontrol Selection Lab, por brindarme una de las mejores etapas de mi vida.

Especialmente dar las gracias a mi novia, Marianela, por todo el apoyo durante todos los días, por cuidarme, crecer con ella y hacerme mejor persona.

Finalmente, darle mis mayores gracias a mi gran familia, por apoyarme siempre durante toda mi etapa de estudios para que nunca me rindiera. A mi madre, a mi padre, y a mi hermana.

Muchas gracias a todos, estáis en mi corazón, os amo.

Este trabajo fin de máster ha sido ya publicado en un artículo científico realizado por mi equipo de investigación de control biológico dirigido por Pablo Bielza Lino de la Universidad Politécnica de Cartagena.

El artículo fue publicado en la revista *Insects* que está en el cuartil primero (Q1) de la categoría ENTOMOLOGY de JCR:

<https://doi.org/10.3390/insects13110996>

Rodríguez-Gómez, A.; Donate, A.; Sánchez-Martínez, I.; Balanza, V.; Abelaira, A.B.; Reche, M.C.; Bielza, P. Inheritance and Biological Characterization of an Orange-nymph Mutant in *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Insects*. 2022, 13(11), 996.

**Fondos:** Esta investigación fue financiada por el proyecto PID2020-116897RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033. El contrato de A.R-G fue cofinanciado por el Plan de Apoyo a la I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena. El contrato de VB fue financiado por la subvención PDC2021-121383-I00 financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y Unión Europea Next Generation EU/PRTR. El contrato A.B.A fue cofinanciado por 21578/FPI/21 Fundación Séneca Región de Murcia) y Agrobío. El contrato de IS-M. fue financiado por la subvención PLEC2021-007774 financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y Unión Europea Next Generation EU/PRTR.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1 Distribución geográfica y hábitat de <i>Orius laevigatus</i> .....	10
1.2 Ciclo biológico de <i>Orius laevigatus</i> .....	10
1.3 Tipo de alimentación de <i>Orius laevigatus</i> .....	12
1.4 Importancia de <i>Orius laevigatus</i> y mutación.....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Establecimiento de población <i>ámbar</i> .....	16
3.2 Procedencia de las poblaciones comerciales a ensayar.....	16
3.3 Cría de insectos.....	16
3.4 Bioensayos de laboratorio.....	18
3.4.1 Experimentos cruzados.....	18
3.4.2 Bioensayos de fecundidad, fertilidad y longevidad.....	20
3.4.3 Bioensayo de supervivencia ninfal (de huevo a adulto).....	21

3.4.4	Bioensayo de tolerancia al hambre (inanición).....	21
3.4.5	Bioensayo de depredación (respuesta funcional).....	22
3.5	Análisis de datos.....	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1	Establecimiento de la población naranja.....	24
4.2	Experimentos cruzados.....	25
4.3	Resultados de bioensayos de fecundidad, fertilidad y longevidad.....	26
4.4	Resultados del bioensayo de supervivencia ninfal (huevo a adulto).....	27
4.5	Resultados del ensayo de depredación (respuesta funcional).....	27
4.6	Resultados del bioensayo de tolerancia al hambre (inanición).....	28
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. La descendencia de las ninfas es de color naranja cuando se producen los cruces y retrocruces entre las poblaciones de *Orius laevigatus* normales y mutantes (naranjas)....26

Tabla 2. Fecundidad, fertilidad, longevidad, supervivencia inmadura y tiempo de desarrollo de huevo a adulto en las poblaciones naranja (mutante) y normal de *Orius laevigatus*.....27

Tabla 3. Tamaño corporal medio (ancho del pronoto) de machos y hembras adultos de las poblaciones naranja y normales.....27

Tabla 4. Consumo de presas por parte de hembras adultas de las poblaciones naranja (mutante) y

normal de *Orius laevigatus*. Resultados de ensayo de inanición.....28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de *Orius laevigatus*.....11

Figura 2: Dimorfismo sexual en *Orius laevigatus*.....11

Figura 3: Ninfas de primer a quinto estadio, normal (A) y de naranja mutante (B) de poblaciones de *Orius laevigatus* ..... 14

Figura 4: Interior de los botes de crianza ..... 17

Figura 5: Huevos de *Ephestia Kuehniella* ..... 17

Figura 6: Sellado de judía ..... 18

Figura 7: Cámara climática.....18

Figura 8: Cruce entre *Orius*.....19

Figura 9: Huevos de *Orius* insertados en judía.....19

Figura 10: Contenido de las salseras.....20

Figura 11: Retrocruces entre *Orius*.....20

Figura 12: Vial respuesta funcional.....23

Figura 13: Ensayo de depredación, adultos de trips (presa) y control negativo.....23

Figura 14: Población naranja mantenida de forma aislada.....24

Figura 15: Adultos de *Orius laevigatus* (hembras y machos) recién emergidos normales (A) y adultos de *Orius laevigatus* (hembras y machos) recién emergidos con gen mutante *ámbar* (B).....25

## Resumen

El insecto depredador *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un agente de control biológico muy importante en cultivos protegidos, utilizado para controlar pequeñas plagas, especialmente el trips. Es un depredador ampliamente utilizado y su uso es un factor clave en los programas de control biológico, ya que trabaja de manera exitosa. Este insecto para completar su ciclo de vida debe pasar por cinco estados ninfales hasta llegar a adulto. Durante esta etapa juvenil, el depredador presenta un color amarillento en todo su cuerpo. Una ninfa encontrada en una mezcla de poblaciones silvestres mantenida en nuestro laboratorio de control biológico no presentaba una coloración normal, sino anaranjada. Por lo que, en nuestro equipo de investigación, se estableció una nueva población de insectos con esta mutación con color del cuerpo anaranjado, que fue llamada población *ámbar*. El análisis genético determinó que la mutación (*ámbar*) estaba controlado por un solo alelo autosómico recesivo. Se compararon algunas características biológicas y ecológicas de esta cepa naranja con respecto una población normal. La longevidad, la fecundidad y la fertilidad fueron similares en ambas poblaciones, pero la supervivencia ninfal, la tasa de desarrollo, el tamaño corporal, la tolerancia al hambre y la capacidad de depredación fueron inferiores en la variedad naranja. Se discute la utilidad del mutante naranja como marcador visible para estudios biológicos y ecológicos de este importante agente de control biológico.

## Abstract

The predatory insect *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), is a very important biological control agent in protected crops, used to control small pests, especially thrips. It is considered a widely used predator and its use is a key factor in biological control programmes, as it works successfully. In order to complete its life cycle, this insect must pass through five nymphal stages until it reaches adulthood. During this juvenile stage, the predator has a yellowish colour all over its body. A nymph found in a mixture of wild populations kept in our biological control laboratory did not have a normal colouring, but was orange. Therefore, our research team established a new population of insects with this mutation with orange body colour, which was called the amber population. Genetic analysis determined that the mutation (amber) was controlled by a single autosomal recessive allele. Some biological and ecological characteristics of this orange strain were compared to a normal population. Longevity, fecundity and fertility were similar in both populations, but nymphal survival, developmental rate, body size, starvation tolerance and predation ability were lower in the orange strain. The usefulness of the orange mutant as a visible marker for biological and ecological studies of this species is discussed.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Distribución geográfica y hábitat de *Orius laevigatus*

En la página web de la Fauna Europaea muestra que la zona de distribución de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) cubre prácticamente toda la cuenca del Mediterráneo, Francia, islas de Macaronesia, varios países centroeuropeos y las islas británicas. Este insecto, en España se encuentra repartido ampliamente, siendo una de las especies más numerosas y comunes, distribuida y asociada a una elevada cantidad de especies de plantas (Lacasa y Llorens, 1998). Ferragut y González Zamora (1994) realizaron una investigación sobre las especies de *Orius* en la península y su distribución en Murcia, Comunidad Valenciana, Andalucía y Extremadura. Muestrearon numerosos cultivos y algunas plantas silvestres y observaron que el 47% de los individuos encontrados fueron de *O. laevigatus*, siendo ésta la especie con mayor número de individuos.

### 1.2. Ciclo biológico de *Orius laevigatus*

*O. laevigatus* pasa por los siguientes estados de desarrollo: huevo, cinco estadios ninfales (N1-N5), y adulto (Figura 1).

Los **huevos** miden 0,3-0,4 mm de longitud y 0,13 mm de ancho, son transparentes inicialmente, presentan una forma oval alargada y tienen un opérculo característico. Los huevos pueden ser ovipositados por la hembra de forma grupal o en solitario. A medida que se acerca la eclosión, cambian a un color amarillento, parecido al color de la ninfa que se está formando en su interior. Las hembras introducen los huevos en los tejidos más tiernos de la planta, sólo el opérculo sobresale, y, por lo tanto, es visible y fácil de observar con un microscopio estereoscópico, con lo cual, la forma de este opérculo podría utilizarse para distinguir entre distintas especies de *Orius*.

Con respecto a las **ninfas** pasan por 5 estadios ninfales (N1-N5) (Figura 1). Cuando nacen de los huevos son de cuerpo brillante y casi sin color, pero a medida que pasan las horas, van cogiendo un color amarillento. Su longitud oscila entre 0,7 mm (fase N1) y 2,1 mm (fase N5) (Lacasa y Llorens, 1998). Se pueden observar los esbozos alares en el cuarto y quinto estadio (N4-N5), que cambian a un tono más oscuro cuando están a punto de madurar (Román, 2017). Presentan un color de ojos rojo durante todos sus estadios ninfales (Malais y Raensberg, 2006).

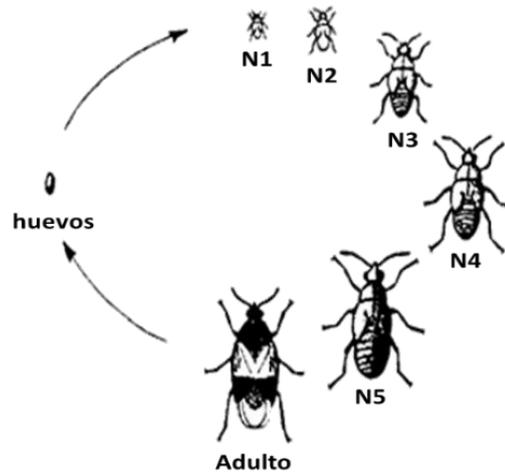


Figura 1: Ciclo biológico de *Orius laevigatus*

Según el trabajo realizado por Ferragut y González Zamora (1994), los **adultos** de esta especie de *Orius* presentan una enorme plasticidad en algunos de sus caracteres morfológicos externos, como la coloración o el tamaño. El tamaño puede variar de 1,4 a 2,4 mm de longitud y la coloración más común es la marrón. Los ojos se sitúan a ambos lados de la cabeza. La cabeza y el pronoto muestran tegumentos brillantes y los hemiélitros son translúcidos. El primer segmento de las antenas es de color oscuro mientras que el último segmento de éstas es de color más rojizo. Las patas presentan un color amarillento, pudiendo mostrar el tercer par de un color más oscuro que los anteriores. Con respecto al abdomen, está formado por un total de 9 segmentos y tiene un dimorfismo sexual que permite diferenciar a machos de hembras (Figura 2). En los machos es asimétrico y está desplazado hacia la izquierda, en cambio, las hembras lo muestran de forma simétrica y termina en un ovipositor.



Figura 2: Dimorfismo sexual en *Orius laevigatus*

### 1.3. Tipo de alimentación de *Orius laevigatus*

Este insecto posee una alimentación zoofitófaga, ya que además de alimentarse de enemigos naturales suplementa su dieta alimentándose de las plantas. La alimentación sobre varias plantas es común y relevante para estos depredadores (Bouagga et al., 2017). Se estudió que pasa un 38% de su tiempo alimentándose encima de las plantas de pimiento (Bouagga et al., 2017). Estos insectos zoofitófagos pueden alimentarse de recursos vegetales de las plantas como la savia, el néctar alargando su supervivencia, pero el polen, posee propiedades nutricionales más elevadas y permite en los *Orius* unas buenas características de desarrollo y reproducción (Biondi et al., 2016).

Actualmente se suelen añadir a los cultivos alimentos suplementarios artificiales para facilitar el rendimiento de estos insectos depredadores. (Van de kerkhove y De Clercq, 2010; Brenard et al., 2019), normalmente en cultivos con poca cantidad o calidad baja de polen, como, por ejemplo, el cultivo de pepino (Oveja et al., 2016) o muchos cultivos ornamentales como las rosas y crisantemos (Leman y Messelink, 2015). Un caso de esta suplementación sería el polen de *Thypha angustifolia* (L.) que se utiliza para ayudar a las poblaciones de ácaros fitoseidos (Messelink et al., 2014) y *Ephestia kuehniella* para *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Heteroptera: Miridae) y para *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) (Calvo et al., 2012b; Brenard et al., 2019). Esta estrategia de suplementar alimentos alternativos para promover las poblaciones de depredadores se usa cada vez más en cultivos protegidos (Leman y Messelink, 2015).

En cambio, numerosos investigadores vieron una gran disminución en la capacidad reproductiva cuando los insectos se alimentan exclusivamente con estas dietas alternativas (Cocuzza et al., 1997). Esto generaba una importante limitación para conseguir un asentamiento a largo plazo en los cultivos, principalmente en aquellos con baja disponibilidad de polen o con bajo valor nutricional (Bielza et al., 2020). Este hándicap se ha señalado como uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta el control biológico (Bielza et al., 2020).

### 1.4 Importancia de *Orius laevigatus* y mutación

*O. laevigatus* es un importante insecto depredador polífago, enemigo natural de numerosas plagas de insectos, pero principalmente ha sido utilizado para el control biológico aumentativo de trips (Chambers et al., 1993). Se emplea principalmente en los invernaderos de pimiento,

siendo el principal depredador de *Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis* (Lindeman) (Thysanoptera: Thripidae). Estas plagas pueden ocasionar en los cultivos numerosos daños directos e indirectos como por ejemplo la transmisión del virus: *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) (Van der Blom, 2010; Arnó et al., 2008; Bosco et al., 2008).

*Orius laevigatus* se utiliza en programas de control biológico aumentativo, principalmente para controlar plagas de trips (Van Lenteren et al., 2020; Guillén et al., 2014). Este agente de control biológico se produce en masa para ser liberado en diferentes cultivos, particularmente en cultivos de hortalizas bajo invernadero. Este chinche ha sido ampliamente estudiado en diferentes laboratorios para conocer su biología y ecología con el fin de mejorar su rendimiento en campo y optimizar la cría en masa en biofactorías (Bielza et al., 2009, 2020; Bonte et al., 2008; Chen et al., 2017; Mendoza et al., 2020, 2022; Balanza et al., 2019, 2021, 2022; Gallego et al., 2022; Rodríguez-Gómez et al., 2022). A pesar de haber sido criado por numerosas empresas de control biológico e investigadores durante muchos años, hasta donde sabemos, no se han reportado mutaciones para este insecto. Se ha descrito una mutación de ojos rojos en adultos de otras especies de *Orius* como, *Orius sauteri* y *Orius strigicollis* (Shimizu y Kawasaki, 2001). Las mutaciones que afectan características externas como el cuerpo o el color de los ojos pueden ser muy útiles como marcadores visibles para múltiples estudios científicos (Shimizu y Kawasaki, 2001; Slama, 1998; Snodgrass, 2002; Allen, 2013).

Los individuos que portan una mutación visible pueden utilizarse para estimar la capacidad de dispersión y el movimiento de este depredador dentro de plantas, campos y cultivos. Además, un marcador visible puede servir para comparar el establecimiento y la eficiencia de diferentes cepas liberadas en un cultivo. Un color de cuerpo distinto también puede servir para estudios sobre apareamiento y competencia sexual. Además, las mutaciones visibles pueden ofrecer oportunidades para el análisis de genes de insectos y genética de poblaciones.

En general, las cepas de un agente de control biológico con marcadores visibles genéticamente definidos pueden ser muy útiles para el progreso técnico y científico del control biológico.

En 2021, se encontró una ninfa de color naranja en una mezcla de poblaciones silvestres establecidas en nuestro laboratorio de control biológico de la Universidad Politécnica de Cartagena, en el marco de un programa de cría selectiva para seleccionar estirpes de *O. laevigatus* con características mejoradas (Bielza et al., 2020), como la resistencia a los insecticidas (Balanza et al., 2019, 2021, 2022), una mejor alimentación física con alimentos subóptimos y un tamaño corporal más grande (Mendoza et al., 2020, 2022). El cuerpo de las

ninfas de *O. laevigatus* es de color amarillento, pero esta ninfa exhibió un color de cuerpo anaranjado distintivo (Figura 1). Esta ninfa se utilizó para establecer una cepa de laboratorio llamada población *ámbar* (población Orange) con esta característica corporal.

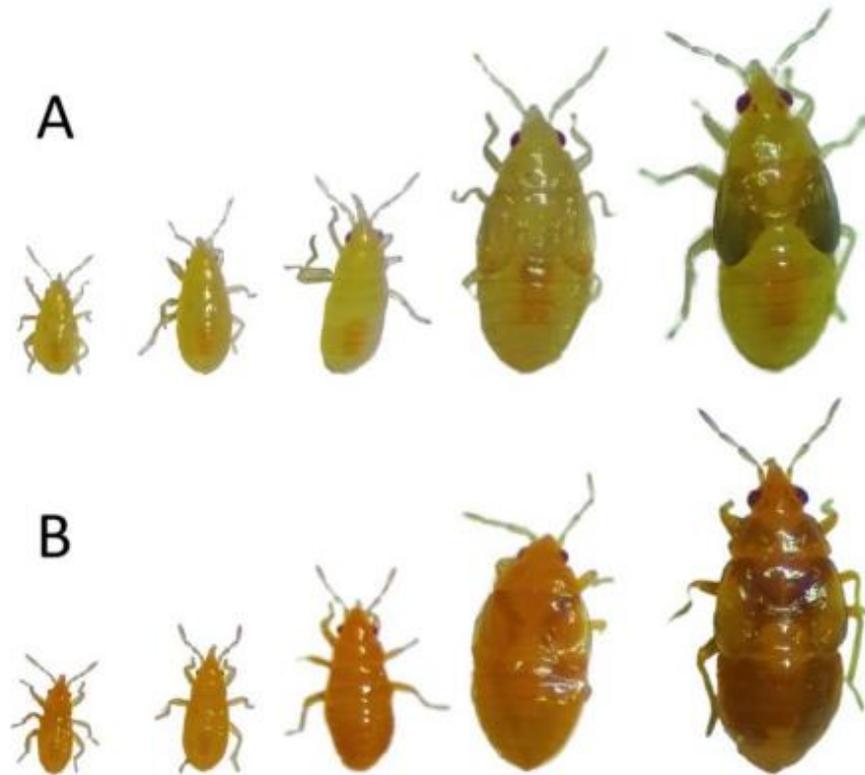


Figura 3: Ninfas de primer a quinto estadio, normal (A) y de naranja mutante (B) de poblaciones de *Orius laevigatus*

## **2. OBJETIVOS**

El presente estudio tuvo como objetivo estudiar las características biológicas de la estirpe *ámbar* (tamaño corporal, desarrollo, fecundidad, tolerancia al hambre y depredación) en comparación con una estirpe normal y determinar la herencia de esta mutación.

Se pretende estudiar el modo de herencia de esta mutación (dominancia, número de genes), así como posibles efectos negativos (trade-offs) asociados a esta mutación en la biología de la especie.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Establecimiento de población ámbar**

En 2021, encontramos una ninfa que muestra un color corporal anaranjado distintivo en una mezcla de poblaciones silvestres establecidas en el Laboratorio de Biocontrol de la Universidad Politécnica de Cartagena. Para establecer una población mutante naranja (en adelante naranja), (también la solemos llamar *Orange*), esperamos a que la ninfa alcanzara la edad adulta y resultara ser una hembra. El siguiente paso fue aparear la hembra virgen naranja con un macho normal de *O. laevigatus* de una población comercial (en lo sucesivo normal) suministrada por la empresa Biobest (Westerlo, Bélgica). Las crías que nacieron de ellas fueron todas ninfas normales. Esta descendencia (F<sub>1</sub> normal) se cruzó entre sí cuando alcanzaron la edad adulta y produjeron ninfas tanto normales como anaranjadas. Las ninfas anaranjadas (machos y hembras) fueron seleccionadas en el tercer estadio para establecer una población de individuos con estadio ninfal naranja.

#### **3.2. Procedencia de las poblaciones comerciales a ensayar**

Las poblaciones de la casa comercial de control biológico que se utilizaron como control en los experimentos frente a la población *ámbar*, fueron suministradas por la empresa Biobest (Westerlo, Bélgica).

#### **3.3. Cría de insectos**

Tanto las poblaciones normales como la naranja se mantuvieron dentro de recipientes de plástico de 1 L con papel de filtro en la tapa para permitir la ventilación en el interior de los botes. En el interior de cada contenedor (Figura 3) se introdujo cáscara de trigo sarraceno equivalente a un vaso de 250 ml para evitar el canibalismo entre individuos, huevos de *Ephestia kuehniella* (Figura 4), (en adelante efestia) *ad libitum* como alimento, suministrados por la empresa Agrobio S.L. (Almería, España), y trozos de vaina de judías verdes (*Phaseolus vulgaris* L.) como fuente de humedad y lugar de oviposición, previamente lavada en una solución de agua e hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos, todo esto para eliminar cualquier resto de

suciedad, agentes contaminantes o insecticidas que puedan contener. Después de este lavado las judías desinfectadas se vuelven a enjuagar con agua durante otros 20 minutos y una vez las judías están secas se cortan y se sellan con parafina caliente en las extremidades por donde es cortada. (Figura 6). Esto ayuda a que los trozos de judía mantengan una buena turgencia y no se deshidraten. El mantenimiento de las poblaciones consiste en realizar el cambio de la judía y dieta cada 48 horas. Las judías extraídas contienen huevos de *Orius* y son llevadas a otros botes donde emergen y se desarrollan las ninfas. Este método de acción de desarrollo se realiza por el canibalismo existente, ya que en ausencia de alimento los adultos de *Orius* pueden llegar a alimentarse de las ninfas. Las poblaciones normales y naranja se mantuvieron en diferentes cámaras climáticas cuyas condiciones de control fueron  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 5$  de humedad relativa y fotoperiodo de L16: D8 de luz (Figura 7).



Figura 4: Interior de los botes de crianza



Figura 5: Huevos de *Ephesia Kuehniella*



Figura 6: Sellado de judía



Figura 7: Cámara climática

### 3.4. Bioensayos de laboratorio

Los ensayos fueron realizados con huevos e individuos adultos de *Orius laevigatus*, procedentes de la población comercial BIOBEST. Así como la población mutante NARANJA.

#### 3.4.1. Experimentos cruzados

Se realizaron una serie de cruces para estudiar el modo de herencia de la mutación (*ámbar*) involucrados en la coloración naranja de *Orius* en sus estadios ninfales. Las ninfas de quinto estadio (N5) fueron separadas e individualizadas durante cuatro días hasta que alcanzaron la edad adulta.

Para obtener la F1, hembras y machos vírgenes naranjas fueron apareados con hembras y machos vírgenes de la población normal. Se realizaron un total de 30 cruces, 15 parejas de hembras naranjas y machos normales y otras 15 parejas de sexos opuestos (Figura 8).

Se contó el número de huevos ovipositados en las judías (Figura 9) con ayuda de una lupa binocular y se separaron por grupos y número de hembras (1 a 15). Ninguna de las ninfas nacidas de estos primeros cruces presentó coloración anaranjada. Una vez que las ninfas eclosionadas

de estos huevos alcanzaron el quinto estadio ninfal, se individualizaron y a los cuatro días se realizaron los retrocruzamientos con cada una de las cepas parentales (naranja y normal).



*Figura 8: Cruces entre Orius*



*Figura 9: Huevos de Orius insertados en judía*

En cada cruzamiento, alrededor de 10 a 15 hembras vírgenes y la misma cantidad de machos vírgenes se colocaron en salseras de 30 mL con huevos de efestia como alimento y un trozo de vaina de judía verde de 3,5 cm para la oviposición (Figura 10). Dos veces por semana, las vainas de judía se cambiaban por otras nuevas y se contaban los huevos puestos. Almacenadas individualmente en contenedores separados, se registró el color del cuerpo en la etapa ninfal del tercer estadio (N3) y luego se procedió a determinar las ninfas anaranjadas y normales nacidas de cada cruzamiento. El resto de las hembras y machos que sobraron de la F<sub>1</sub>, después de hacer los retrocruzamientos, se cruzaron para producir F<sub>2</sub> (Figura 11). Estos experimentos cruzados se realizaron en las mismas condiciones que la crianza, 26±1°C, 65±5% HR y 16:8 fotoperíodo luz-oscuridad.

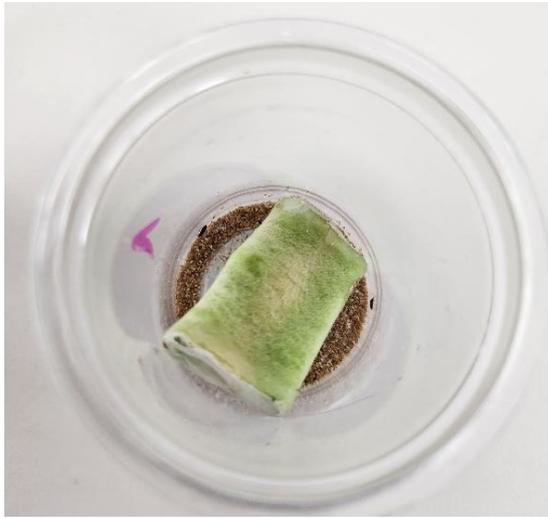


Figura 10: Contenido de las salseras

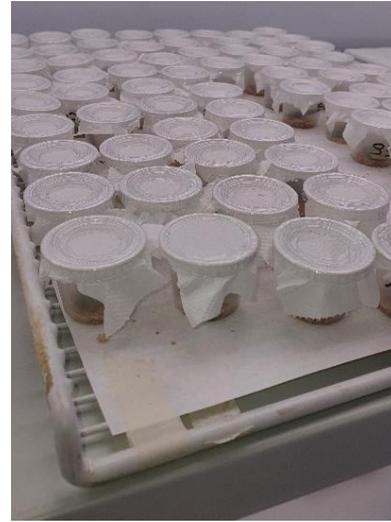


Figura 11: Retrocruces entre *Orius*

### 3.4.2. Bioensayos de fecundidad, fertilidad y longevidad

Estos experimentos se realizaron para comparar la producción de huevos, la tasa de eclosión y la longevidad entre la población naranja y la normal. Se criaron ninfas de quinto estadio para cada estirpe obteniendo machos y hembras adultos a los cuatro días y durante esos días tuvo lugar el período de apareamiento y pre-oviposición. Exactamente 40 hembras de cada estirpe fueron sexadas y aisladas en un vaso plástico de 30 mL con tapas ventiladas, que contenía efestia huevos *ad libitum* como alimento y un trozo de vaina de judía verde de 3,5 cm sellado con parafina en ambos extremos para hidratación y oviposición. Dos veces por semana se contaron los huevos, examinando cada trozo de vaina de judía verde con un microscopio estereoscópico y cambiando el trozo por uno limpio y añadiendo alimento fresco. Este proceso se repetía hasta que la hembra moría; de esta forma se medía su longevidad. Para obtener datos de fertilidad, los huevos de los dos primeros conteos de fecundidad se mantuvieron individualmente en condiciones de laboratorio. Los huevos eclosionados se contaron después de cuatro días. El porcentaje de eclosión se calculó dividiendo el número de huevos que eclosionaron por el número total de huevos. Estos experimentos se mantuvieron en nuestra cámara climática de

laboratorio con las condiciones climáticas de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 5\%$  HR y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

### **3.4.3. Bioensayo de supervivencia ninfal (de huevo a adulto)**

Para este tipo de experimentos, para recolectar huevos frescos de ambas poblaciones, se introdujeron pequeños trozos de judía (máximo 3 cm) en los recipientes con adultos de cada población (normal y naranja). Las secciones de vaina de judía se cambiaron cada 24 h durante una semana. Con el fin de obtener el alto número de huevos frescos necesarios para el experimento, se realizaron varias extracciones de huevos y las secciones de vaina de judía recolectadas cada día se pusieron a  $6^{\circ}\text{C}$  en el frigorífico para evitar el desarrollo de los huevos. Al final de la semana (cuatro cambios de judías), todas las secciones de judías con huevos se pusieron a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 5\%$  HR y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Los huevos de cada pieza de judía se contaron con un microscopio estereoscópico y cada 90-110 huevos se colocaron en vasos de cartón de 200 mL con una pieza de judía de aproximadamente 5 cm y sellada por ambos lados, cáscara de trigo sarraceno y huevos de efestia *ad libitum*, formando así una réplica. Cada vaso contenía unos 90–100 huevos y se consideró una réplica, con un total de cinco réplicas para cada población (un total de alrededor de 500 huevos por población). El cambio de vainas de judía sellada y el suministro de alimento fresco se realizó tres veces por semana, observando siempre el estado ninfal de los individuos nacidos en cada vaso. Después de 10 días, se observaron los vasos cada 24 h para retirar los adultos recién emergidos (<24 horas), siguiendo este procedimiento hasta que no quedaron ninfas. Todos los adultos fueron congelados. El ancho del pronoto se midió en todos los individuos con un microscopio estereoscópico a 50x, diferenciando entre machos y hembras.

### **3.4.4. Bioensayo de tolerancia el hambre (inanición)**

Con el objetivo de evaluar la calidad de los adultos de las poblaciones naranja y normal, se probó la tolerancia a la falta de alimento (inanición). Para este experimento, se seleccionaron ninfas de quinto estadio de ambas poblaciones y se dejaron durante cuatro días hasta alcanzar la edad adulta. Los adultos fueron sexados, y los machos fueron separados de las hembras, dejando cada

grupo por sexo y población en su correspondiente vaso de cartón de 200 mL. El número total de individuos introducidos en cada vaso fue de 65 a 100. Cada vaso contenía un trozo de vaina de judía de unos 5 cm sellada por ambos lados con parafina y cáscara de trigo sarraceno. No se introdujo alimento en ningún momento durante el experimento. La mortalidad se evaluó cada 24 h hasta que no quedó nadie con vida. Este experimento se mantuvo en nuestra cámara climática de laboratorio con las condiciones climáticas de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 5\%$  HR y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

### **3.4.5. Bioensayo de depredación (respuesta funcional)**

El principal objetivo de este bioensayo fue comparar la capacidad de depredación de los insectos de la población normal frente a la población naranja. Se utilizaron como presa, 30 adultos de *F. occidentalis* de una colonia criada y mantenida en nuestro laboratorio. Estos 30 adultos de trips se utilizaron para cada una de las repeticiones del bioensayo. Para ello, se utilizaron viales de plástico de 5 ml en cuyo interior añadíamos una sección alargada de hoja de pimiento dulce (criado en nuestro laboratorio), con un tamaño de unos 30 x 5 mm. Estos viales estaban cubiertos con una tapa perforada para permitir la ventilación en su interior (Fig. 12).

Se montaron 20 repeticiones, es decir 20 viales con 30 adultos de trips e incluyendo una hembra *O. laevigatus* mantenida en ayuno durante 24 horas para cada vial (Fig. 13). Este ensayo se realizó tanto con hembras de la población naranja como con hembras de la población BIOBEST. También se evaluó un control negativo de 10 repeticiones con 10 adultos de trips por repetición para comprobar la supervivencia de los trips en ausencia de depredador. Después de 24 horas, las hembras de *O. laevigatus* se retiraron de los viales y con ayuda de una lupa binocular se contaron las presas depredadas. También se realizó el conteo de los individuos muertos de los viales sin depredadores (control negativo). Este experimento se mantuvo en nuestra cámara climática de laboratorio con las condiciones climáticas de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 5\%$  HR y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 12: Vial respuesta funcional.



Figura 13: Ensayo de depredación, adultos de trips (presa) y control negativo

### 3.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos por los experimentos fueron analizados mediante un análisis de chi-cuadrado para comparar las proporciones del color del cuerpo de las poblaciones de *O. laevigatus* (naranja: normal), con las proporciones esperadas de 1:3 para los cruces de la F2 y 1:1 para retrocruces. Las diferencias en las características biológicas y ecológicas entre ambas poblaciones se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas se verificaron antes del análisis. Cuando se observaron diferencias significativas entre poblaciones, las medias se separaron mediante la prueba HSD de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Establecimiento de la población naranja

A través de una selección de ninfas descendientes de la F2 de una ninfa naranja original, pudimos establecer y mantener una población naranja pura portadora del gen *ámbar*. Esta población se cría de forma aislada, es decir, en cámaras climáticas separadas de nuestro laboratorio para que no exista el riesgo de contaminación cruzada de la población naranja con respecto a las demás poblaciones de *O. laevigatus* que no poseen el gen *ámbar* (Fig. 14). Todos los individuos de la población podrían ser fácilmente discriminados de una población normal en cada estadio ninfal, (desde el primer estadio hasta el quinto), (Figura. 3), presentando una coloración anaranjada muy diferente al color amarillento típico de una población normal (Fig. 1). Cuando estas ninfas naranjas emergen de estado juvenil a estado maduro o adulto, la coloración anaranjada se puede observar durante las primeras horas como adulto. Con el paso de las horas, las distintas partes del cuerpo del insecto como la cabeza, el tórax y el abdomen se vuelven oscureciendo de una manera similar a las coloraciones que posee un adulto de *O. laevigatus* (Fig. 13). Los adultos (machos y hembras) de la población naranja con varios días, no presentaron diferencias apreciables entre las poblaciones normales de *O. laevigatus* a simple vista, pero observando los insectos con un microscopio estereoscópico, las patas de estos adultos presentan una coloración naranja que se puede diferenciar que estos individuos son provenientes de la población con el gen *ámbar* (Figura 15).

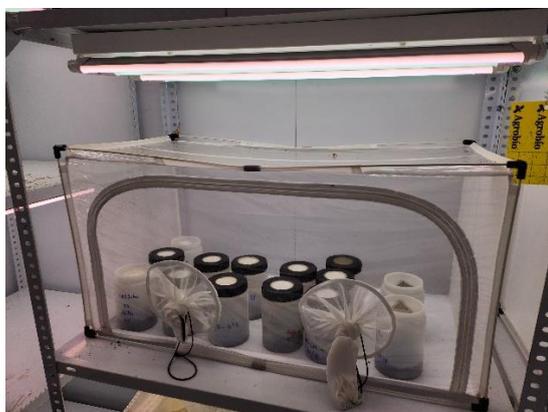


Figura 14: Población naranja mantenida de forma aislada



Figura 15: Adultos de *Orius laevigatus* (hembras y machos) recién emergidos normales (A) y adultos de *Orius laevigatus* (hembras y machos) recién emergidos con gen mutante ámbar (B).

#### 4.2. Experimentos cruzados

Los resultados entre los cruces entre *Orius* con gen naranja y normales presentaron una descendencia con color amarillento, es decir el color normal que presenta la descendencia de una población normal de *Orius* (F1), sin embargo, aquellos cruces en los que tanto el macho y la hembra eran de color naranja mostraban una descendencia naranja (Tabla 1). Los cruces de consanguinidad entre los individuos de la F1 (ON X ON y NO X NO) (O de Orange=Naranja y N de Normal) produjeron la descendencia F2, presentando la relación esperada 1:3 (Tabla 1). Lo mismo sucedió en el caso de los retrocruzamientos con progenitores, ya que la descendencia encajó con la proporción esperada 1:1 (Tabla 1).

Tabla 1. La descendencia de las ninfas es de color naranja cuando se producen los cruces y retrocruces entre las poblaciones de *Orius laevigatus* normales y mutantes (naranjas).

<b>CRUCES (HEMBRAS × MACHOS)</b>	<b>Orange (O)</b>	<b>Normal (N)</b>	<b>Relación esperada (O:N)</b>	<b>Relación observada (O:N)</b>	$\chi^2$	<i>p</i>
O × N (15)	0	67	0:1			
N × O (15)	0	237	0:1			
O × O (15)	77	0	1:0			
ON (61) × ON (37)	294	789	1:3	1:2.68	2.549	0.110
NO (56) × NO (45)	116	418	1:3	1:3.60	2.886	0.086
ON × OO (14)	176	157	1:1	1:0.89	0.973	0.324
OO × ON (10)	98	79	1:1	1:0.81	1.813	0.176
NO × OO (15)	216	204	1:1	1:0.94	0.288	0.591
OO × NO (15)	44	28	1:1	1:0.64	3.125	0.077

El número entre paréntesis es el número de parejas utilizadas en cada cruce. La descendencia de cada cruce se registró en el estadio ninfal del insecto N3. Las abreviaturas de la (Tabla 1), significan lo siguiente: NO: descendencia de hembras normales y machos mutantes (Orange=naranjas); ON: descendencia de hembras mutantes (Orange=naranjas) y machos normales y OO: descendencia de hembras mutantes (Orange=naranjas) y machos mutantes (Orange=naranjas).

### 4.3. Resultados de bioensayos de fecundidad, fertilidad y longevidad

Los resultados de fecundidad, fertilidad (porcentaje de huevos eclosionados) y longevidad de las hembras de las poblaciones naranja y normal se pueden observar en la (Tabla 2). Ambas poblaciones presentaron valores similares de fecundidad ( $F = 0.05$ ,  $df = 1/68$ ,  $p > 0.05$ ), fertilidad ( $F = 0.42$ ,  $df = 1/60$ ,  $p > 0.05$ ), y longevidad ( $F = 0.01$ ,  $df = 1/75$ ,  $p > 0.05$ ).

Tabla 2. Fecundidad, fertilidad, longevidad, supervivencia inmadura y tiempo de desarrollo de huevo a adulto en las poblaciones naranja (mutante) y normal de *Orius laevigatus*

Población	Fecundidad (huevos/hembra)	Fertilidad (% huevos eclosionados)	Longevidad (días)	Supervivencia ninfal (%)	Tiempo de desarrollo (días)
Orange	99.7 ± 10.0 a	92.1 ± 1.5 a	24.1 ± 2.7 a	36.8 ± 2.9 a	14.5 ± 0.11 b
Normal	96.4 ± 10.9 a	93.4 ± 1.4 a	23.7 ± 2.8 a	89.1 ± 4.4 b	12.7 ± 0.07 a

Las medias ± SE dentro de una columna seguidas de la misma letra no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; prueba de Tukey).

#### 4.4. Resultados del bioensayo de supervivencia ninfal (de huevo a adulto)

Los resultados de supervivencia y duración del desarrollo inmaduro de huevo a adulto se resumen en la Tabla 2. Se vieron diferencias notables en el porcentaje de supervivencia en comparación con las dos poblaciones, la población mutante mostró un valor bastante menor con respecto a la población normal de *O. laevigatus* ( $F = 98.3$ ,  $df = 1/18$ ,  $p < 0.001$ ). De manera similar el tiempo de desarrollo en la población naranja fue más largo, por lo que tomó más tiempo desde la eclosión hasta el adulto que en la población normal ( $F = 170.09$ ,  $df = 1/18$ ,  $p < 0.001$ ). El tamaño corporal (ancho del pronoto) de las hembras y machos adultos naranjas resultó significativamente inferior al de la población normal ( $F = 90.1$ ,  $df = 1/574$ ,  $p < 0.001$ ) (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño corporal medio (ancho del pronoto) de machos y hembras adultos de las poblaciones naranja y normales.

Sexo	Población	Tamaño del pronoto (mm)
Hembra	Orange	0.78 ± 0.002 a
	Normal	0.80 ± 0.001 b
Macho	Orange	0.74 ± 0.003 a
	Normal	0.76 ± 0.001 b

Las medias ± SE dentro de cada sexo seguidas de la misma letra no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; prueba de Tukey).

#### 4.5. Resultados del ensayo de depredación (respuesta funcional)

Con respecto a los resultados obtenidos de las dos poblaciones, el consumo de presas difirió significativamente entre las poblaciones naranja y normal cuando ambas se alimentaban de adultos de trips ( $F = 21.57$ ,  $df = 1/38$ ,  $p < 0.001$ ). La población mutante presentó un menor consumo de adultos durante 24 horas que la población normal (19.2 vs. 23.3 adultos de trips) (Tabla 4).

Tabla 4. Consumo de presas por parte de hembras adultas de las poblaciones naranja (mutante) y normal de *Orius laevigatus*. Resultados de ensayo de inanición.

Población	Presa ofrecida	Presa consumida	% Presa consumida	Longevidad bajo inanición (días)
Orange	30	19.2 ± 0.71 a	64.0	3.1 ± 0.22 a
Normal	30	23.3 ± 0.50 b	77.5	4.1 ± 0.39 b

Las medias ± SE dentro de una columna seguidas de la misma letra no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; prueba de Tukey).

#### 4.6. Resultados del bioensayo de tolerancia al hambre (inanición)

Con respecto a los resultados obtenidos de dicho ensayo comparando la tolerancia al hambre de la población naranja y normal, las hembras adultas de la población normal vivían más tiempo que las hembras de la población mutante cuando se les privaba de alimentos ( $F = 5.68$ ,  $df = 1/165$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

## 5. DISCUSIONES Y CONCLUSIÓN

Los cruces experimentales indicaron que el gen perteneciente de la población mutante *ámbar* de *O. laevigatus* estaba controlado por un solo alelo autosómico recesivo. Las mutaciones del color del cuerpo se han estudiado en otros insectos heterópteros, particularmente en *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera: Pyrrhocoridae), (Bel et al., 1997). Varias mutaciones que afectan al color del cuerpo (blanco, amarillo y melanótico) de *P. apterus* fueron heredadas como genes autosómicos recesivos únicos (Slama, K, 1998). Se informó de la aparición de un mutante de cuerpo naranja en *Dydercus koenigii* F. (Hemiptera: Pyrrhocoridae), cuya mutación también estaba gobernada por un solo gen somático recesivo (Gujar et al., 1993). Sin embargo, no se han informado de mutaciones que afecten al color del cuerpo en ninguna especie de *Orius*, pero sí se informó sobre una mutación referente al color de los ojos, en este caso, ojos de color rojo en *O. sauteri* y *O. strigicollis* que también se encontró que la mutación estaba controlada por un alelo autosómico de locus único y recesivo (Shimizu et al., 2001).

La fecundidad a lo largo de la vida, la eclosión de los huevos ovipositados en vainas de judía y la duración de la vida, fueron similares tanto en la población mutante naranja como en la población normal de *Orius*, y dentro del rango informado en otros estudios (Bonte et al., 2008; Mendoza et al., 2020; Gallego et al., 2022; Rodríguez-Gómez et al., 2022; Sánchez et al., 2002; Tommasini et al., 2004., Leon-Beck et al., 2009; Aragón-Sánchez et al., 2018). Sin embargo, la población naranja mostró unos resultados de supervivencia de huevo a adulto significativamente reducida (37%) y un retraso en el desarrollo (14,5 días) en comparación con la población normal (89% y 12,7 días respectivamente).

Por otro lado, la tasa de depredación, la tolerancia a la inanición y el tamaño corporal se consideran rasgos especialmente críticos para un control biológico efectivo (Rasmussen et al., 2018). La población de insectos naranjas tuvo un rendimiento inferior al de la población normal en estos tres rasgos clave. Tanto la tolerancia al hambre como la tasa de depredación están relacionadas con el tamaño corporal, ya que tiene un efecto profundo en la mayoría de los rasgos biológicos y ecológicos (Kingsolver et al., 2010; Chown et al., 2015; Kalinkat et al., 2015). Se estima que los individuos grandes tienen más reservas corporales, lo que resulta en una mayor tolerancia al hambre. Además, el tamaño del cuerpo es particularmente prominente para un

depredador, ya que está fuertemente relacionado con el rango de presas que es capaz de atacar (Kalinkat et al., 2015). De hecho, una población de *O. laevigatus* seleccionados artificialmente para obtener un tamaño corporal más grande, exhibieron una capacidad de depredación superior cuando éstos se alimentaban de trips en comparación con las poblaciones comerciales y silvestres (Mendoza et al., 2022). Por lo tanto, el tamaño corporal más pequeño de la población de naranjas en comparación con las poblaciones normales probablemente esté relacionado con la menor tolerancia al hambre y la capacidad de depredación.

El bajo desempeño de la población de naranja en algunos rasgos no está necesariamente asociado con la mutación *ámbar*, ya que podría atribuirse a diferencias naturales entre poblaciones de la misma especie, como ya se informó en *O. laevigatus* (Mendoza et al., 2020, 2022). Además, la población naranja se originó a partir de una sola hembra naranja, y es muy probable que sufra de depresión endogámica, desenmascarando alelos recesivos nocivos (Charlesworth et al., 2019; Bosse et al., 2019). Por lo tanto, antes de un mayor uso de esta mutación en estudios biológicos y ecológicos de *O. laevigatus*, será necesario retrocruzar repetidamente la población naranja con otras poblaciones para encontrar una población que lleve el gen *ámbar*, pero exhibiendo una aptitud similar a las poblaciones estándar.

La mutación del cuerpo naranja en *O. laevigatus* es un marcador visible muy útil para estudios biológicos y ecológicos de este importante agente de control biológico. La mutación de la población naranja que lleva el gen *ámbar* parece mostrar un peor desempeño en algunos rasgos biológicos (desarrollo inmaduro, tamaño corporal y capacidad de depredación), la mutación debe ser introgresada en cepas de buen desempeño, es decir con buenas características y rasgos efectivos del control biológico. Las poblaciones que contengan esta mutación se pueden emplear en estudios para comparar los servicios de establecimiento y biocontrol de diferentes cepas de este depredador. De hecho, estas cepas se pueden utilizar para monitorear el rendimiento de campo de cepas genéticamente mejoradas de *O. laevigatus*, como los seleccionados por su resistencia a los insecticidas (Balanza et al., 2019, 2021, 2022), una mejor alimentación física con alimentos subóptimos y un tamaño corporal más grande (Mendoza et al., 2020, 2022).

Del mismo modo, esta población con el gen *ámbar* puede servir en la investigación sobre la dispersión y distribución dentro y entre plantas, cultivos y campos de *O. laevigatus*, evitando el riesgo de confundir a los individuos liberados con poblaciones naturales.

El conocimiento de los movimientos y la dinámica poblacional de este depredador sería muy beneficioso para la implementación de programas de manejo integrado de plagas y, en particular, protocolos de control biológico aumentativo y conservador. En los trabajos de laboratorio, la mutación *ámbar* se puede utilizar en estudios sobre paternidad y apareamiento, comparando la competencia sexual de diferentes cepas. Además, una mutación visible como este gen tan llamativo al ojo humano, puede ser una valiosa herramienta para la investigación en genómica y genética de poblaciones de este importante enemigo natural.

En conclusión, la mutación *ámbar* en *O. laevigatus* puede ofrecer interesantes oportunidades para el progreso técnico y científico del uso de este agente de control biológico.

Finalmente, descubrir la mutación real con la ayuda del primer ensamblaje del genoma para *O. laevigatus* (Bailey et al., 2022), y el mecanismo involucrado probablemente serían los siguientes mejores pasos para comprender completamente esta mutación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. Genetics of a sex-linked recessive red eye color mutant of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Open J. Anim. Sci.* 2013, 3, 1–9.
- Aragón-Sánchez, M.; Román-Fernández, L.R.; Martínez-García, H.; Aragón-García, A.; Pérez-Moreno, I.; Marco-Mancebón, V.S. Rate of consumption, biological parameters, and population growth capacity of *Orius laevigatus* fed on *Spodoptera exigua*. *BioControl*. 2018, 63, 785–794.
- 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.
- Bailey, E.; Field, L.; Rawlings, C.; King, R.; Mohareb, F.; Pak, K.-H.; Hughes, D.; Williamson, M.; Ganko, E.; Buer, B.; et al. A scaffold-level genome assembly of a minute pirate bug, *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae), and a comparative analysis of insecticide resistance-related gene families with hemipteran crop pests. *BMC Genom.* 2022, 23, 45.
- Balanza, V.; Mendoza, J.E.; Bielza, P. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 2019, 167, 626–635.
- Balanza, V.; Mendoza, J.E.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Genetic improvement of spinosad resistance in the biocontrol agent *Orius laevigatus*. *BioControl*. 2021, 66, 673–685.
- Balanza, V.; Mendoza, J.E.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Manag. Sci.* 2021, 77, 2539–2546.
- Balanza, V.; Villafranca, E.; Mendoza, J.E.; Grávalos, C.; Rodríguez-Gómez, A.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Artificial selection for emamectin benzoate resistance in the biological control agent *Orius laevigatus*. *Biol. Control*. 2022, 174, 105024.

- Bel, Y.; Porcar, M.; Socha, R.; Němec, V.; Ferré, J. Analysis of pteridines in *Pyrrhocoris apterus* (L.) (heteroptera, pyrrhocoridae) during development and in body-color mutants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 1997, 34, 83–98.
- Bielza, P.; Balanza, V.; Cifuentes, D.; Mendoza, J.E. Challenges facing arthropod biological control, Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Manag. Sci.* 2020, 76, 3517–3526.
- Bielza, P.; Fernández, E.; Grávalos, C.; Izquierdo, J. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *Biol. Control.* 2009, 54, 229–236.
- Biondi, A., Zappalà, L., Di Mauro, A., Garzia, G. T., 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.
- Bonte, M.; De Clercq, P. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera, Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J. Econ. Entomol.* 2008, 101, 1127–1133.
- 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. *Biological Control* 44: 331-340.
- Bosse, M.; Megens, H.-J.; Derks, M.F.L.; de Cara, Á.M.R.; Groenen, M.A.M. Deleterious alleles in the context of domestication, inbreeding, and selection. *Evol. Appl.* 2019, 12, 6–17.
- Bouagga, S., Urbaneja, A., Rambla, J., Granell, A., Pérez-Hedo, M., 2018. *Orius laevigatus* strengthens its role as a biological control agent by inducing plant defenses. *Journal of Pest Science* 91: 55-64.
- 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. *Entomology Experimentalis et Applicata* 167: 406-414.
- Calvo, F.J., Bolckmans, K., Belda, J.E., 2012b. Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. *BioControl* 57: 809-817.
- Chambers, R.J., Long, S., Helyer, N.L., 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hem.: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the UK. *Biocontrol Science Technology* 3: 295-307.
- Charlesworth, D.; Willis, J. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 2009, 10, 783–796.
- Chen, X.; Hitchings, M.D.; Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Facey, P.D.; Dyson, P.J.; Bielza, P.; Del Sol, R. Comparative genomics of facultative bacterial symbionts isolated from European *Orius* species reveals an ancestral symbiotic association. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1969.
- Chown, S.L.; Gaston, K.J. Body size variation in insects, a macroecological perspective. *Biol. Rev.* 2010, 85, 139–169.
- Cocuzza, G.E., De Clerq, 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. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 101–104.
- Ferragut, F., González, J.E., 1994. Diagnóstico y distribución de las especies de *Orius* Wolf 1811, peninsulares (Heteróptera: Anthocoridae). *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 20: 89-101.
- Gallego, F.J.; Rodríguez-Gómez, A.; Reche, M.d.C.; Balanza, V.; Bielza, P. Effect of the Amount of *Ephestia kuehniella* Eggs for Rearing on Development, Survival, and Reproduction of *Orius laevigatus*. *Insects* 2022, 13, 250.

- Guillén, J.; Navarro, M.; Bielza, P. Cross-Resistance and Baseline Susceptibility of Spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 2014, 107, 1239–1244.
- Gujar, G.T.; Satyanarayana Rao, R.V. Biology and genetics of orange mutant of the cotton stainer, *Dysdercus koenigii*. *Int. J. Trop. Insect. Sci.* 1993, 14, 545–549.
- Kalinkat, G.; Jochum, M.; Brose, U.; Dell, A.I. Body size and the behavioral ecology of insects, linking individuals to ecological communities. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 9, 24–30.
- Kingsolver, J.G.; Huey, R.B. Size, temperature, and fitness, three rules. *Evo. Ecol. Res.* 2008, 10, 251–268.
- Lacasa, A., Llorens, J.M., 1998b. Trips y su control biológico (II). Ed. Pisa ediciones, Alicante, pp. 311.
- Leman, A., Messelink, G.J., 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experimental and Applied Acarology* 65:511-524.
- Leon-Beck, M.; Coll, M. The mating system of the flower bug *Orius laevigatus*. *Biol. Control* 2009, 50, 199–203.
- Malais, M.H., Ravensberg, W.J., 2006. Conocer y reconocer las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. Koppert BV y Reed Business Information. Países Bajos, pp. 288.
- Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. *J. Pest Sci.* 2020, 94, 729–742.
- Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*, Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. *Biol. Control.* 2020, 148, 104310.

- Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Rodríguez-Gómez, A.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Enhanced biocontrol services in artificially selected strains of *Orius laevigatus*. *J. Pest Sci.* 2022, in press.
- Messelink, G.J., Bennison, J., Alomar, O., Ingegno, B.L., Tavella, L., Shipp, L., *et al.* 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *BioControl* 59:377-393.
- Oveja, M.F., Riudavets, J., Arnó, J., Gabarra, R., 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *BioControl* 61: 47-56.
- Rasmussen, L.B.; Jensen, K.; Sørensen, J.G.; Sverrisdóttir, E.; Nielsen, K.L.; Overgaard, J.; Holmstrup, M.; Kristensen, T.N. Are commercial stocks of biological control agents genetically depauperate? A case study on the pirate bug *Orius majusculus* Reuter. *Biol. Control.* 2018, 127, 31–38.
- Rodríguez-Gómez, A.; Balanza, V.; Donate, A.; Abelaira, A.B.; Reche, M.d.C.; Sánchez-Martínez, I.; Bielza, P. Effect of Parental Age and Mating Status on Reproductive Performance of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Insects* 2022, 13, 827.
- Román, L.R., 2017. Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de La Rioja. La Rioja, España, pp.151.
- Sanchez, J.A.; Lacasa, A. 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.* 2002, 92, 77–88.
- Shimizu, T.; Kawasaki, K. Red-eye mutants in *Orius* bugs (Heteroptera: Anthocoridae). *Appl. Entomol. Zool.* 2001, 36, 185–187.

- Slama, K. Autosomal recessive mutations affecting body colour in *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Eur. J. Entomol.* 1998, 95, 17–26.
- Snodgrass, G.L. Characteristics of A Red-Eye Mutant of the Tarnished Plant Bug (Heteroptera: Miridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2002, 95, 366–369.
- Tommasini, M.G.; van Lenteren, J.C.; Burgio, G. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. *Bull. Insect.* 2004, 57, 79–93.
- Van de kerckhove, B., De Clercq, P., 2010. Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. *Biological Control* 53: 238-242.
- Van der Blom, J., 2010. Control biológico en horticultura en Almería: un cambio radical pero racional y rentable. *Cuadernos de estudios agroalimentarios* 45-60.
- Van Lenteren, J.C.; Alomar, O.; Ravensberg, W.J.; Urbaneja, A. Biological Control Agents for Control of Pests in Greenhouses. In *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*; Plant Pathology in the 21st Century 9; Springer: Cham, Switzerland, 2020.