

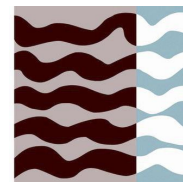


Universidad
Politécnica
de Cartagena



UPCT

Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



ETSIA

*Máster Universitario
en Ingeniería Agronómica*

**Efecto del historial de acoplamiento del
macho y de la edad en la fecundidad de la
hembra en *Orius laevigatus***

Autor: D. Amador Rodríguez Gómez

Dirección: D. Pablo Bielza Lino

Cartagena, diciembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Pablo, por todos estos años, por su infinita paciencia y por todo el apoyo que me ha dado, sin él, todo este trabajo no habría sido posible.

A mis compañeras de laboratorio, las pencas, por toda la ayuda y por todos esos grandes momentos que hemos pasado y que pasaremos.

A mi familia.

A Cristina y su familia por estar ahí siempre aconsejándome y dándome tantos y tantos buenos momentos.

Por último, a una persona que echamos mucho de menos. A sus chupas de cuero y sus bailecicos. No he dejado de acordarme de ella en estos últimos meses mientras escribía este trabajo, mi hermanica Inma, deseo que se recupere y que pronto pueda volver a estar con nosotros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Procedencia de las poblaciones.....	12
3.2 Cría de <i>Orius laevigatus</i>	12
3.3 Ensayos.....	13
3.3.1 Ensayos de acoplamiento múltiple.....	16
3.3.2 Ensayos de edad.....	16
3.4 Fecundidad.....	16
3.5 Análisis de los datos.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Análisis de los ensayos.....	20
4.1.1 Ensayos de acoplamiento múltiple.....	20
4.1.2 Ensayos de edad.....	25
5. DISCUSIÓN.....	29
5.1. Ensayos de acoplamiento múltiple.....	29
5.2 Ensayos de edad.....	30
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Procedencia de los orius empleados en la mezcla de individuos para los ensayos.	11
Tabla 2: Porcentaje de hembras que no presentaron oviposición.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fecundidad que presento cada hembra (Leon-Beck y Coll, 2009).....	8
Figura 2: Duración de la cópula (seg) de tres machos con tres hembras cada uno (Leon-Beck y Coll, 2009).	9
Figura 3: Sellado de judías.....	12
Figura 4: Interior de uno de los recipientes.	13
Figura 5: Tamizado de los individuos.	14
Figura 6: Aspiración de los individuos que han sido tamizados.....	14
Figura 7: Aspiración de los individuos que han sido tamizados.....	15
Figura 8: Viales donde se separan los individuos de quinto estadio.....	15
Figura 9: Hembra adulta individualizada en una salsera.	17
Figura 10: Ensayo.	17
Figura 11: Ensayo.	18
Figura 12: Huevos de <i>O. laevigatus</i> en judía.....	18
Figura 13: Huevos de <i>O. laevigatus</i> eclosionados y cercanos a la eclosión.....	19
Figura 14: Tiempo de preacoplamiento (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p>0,05$).	20
Figura 15: Tiempo de acoplamiento (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p>0,05$).	21
Figura 16: Relación entre la longevidad y el número total de huevos depositados.....	22
Figura 17: Relación entre el número de huevos depositados a lo largo de toda la vida fértil de la hembra y a los diez primeros días.....	22
Figura 18: Promedio de huevos depositados por hembra según su número de acoplamiento, barras con la misma letra no tienen diferencias significativas.	23
Figura 19: Huevos depositados por cada hembra según su orden de acoplamiento.....	24
Figura 20: Promedio de huevos depositados por hembra según su número de acoplamiento, barras con la misma letra no tienen diferencias significativas.	24
Figura 21: Promedio de longevidad en días según hembra y número de acoplamiento.	25
Figura 22: Tiempo de preacoplamiento (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$	26
Figura 23: Tiempo de acoplamiento (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$	26

Figura 24: Fecundidad total (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$ 27

Figura 25: Fecundidad 10 días (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$ 27

Figura 26: Fertilidad (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$ 28

Figura 27: Longevidad (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas $p>0,05$ 28

RESUMEN

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un depredador extensamente empleado para el control de trips en cultivos de invernadero. Diferentes estudios han puesto de manifiesto la capacidad reproductiva de diferentes especies de *Orius*, pero poco se sabe sobre el sistema de apareamiento de esta especie tan empleada en control biológico. El presente estudio se centra en el efecto del historial de acoplamiento del macho y de la edad de ambos sexos en el acoplamiento, en la fecundidad, fertilidad y longevidad de las hembras acopladas. La capacidad de copulación e inseminación de los machos se ensayaron con machos y hembras vírgenes recién emergidos, siendo seis hembras copuladas por un macho de forma consecutiva. Por otro lado, para investigar el efecto de la edad se hicieron ensayos de machos recién emergidos acoplados a hembras de una o de dos semanas de edad, y de igual modo se hacía con las hembras, recién emergidas eran acopladas con machos de una o dos semanas. Los resultados indicaron que los machos se acoplaban exitosamente, pero reducían su capacidad de inseminación en las sextas hembras, sobretodo en su fecundidad temprana (10 días). De los ensayos de edad probados la edad de ambos sexos en el acoplamiento afectó en el potencial reproductivo de las hembras. La fecundidad de la hembra es mayor cuando el macho no es recién emergido al acoplarse, y cuando la hembra es recién emergida. Aunque la fertilidad varía en sentido inverso, no llega a descompensar la ventaja otorgada por una mayor fecundidad. Finalmente se discute la implicación de nuestros resultados en la cría masiva de *O. laevigatus*.

ABSTRACT

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) is a widely used predator for the control of thrips in greenhouse crops. Different studies have revealed the reproductive capacity of different *Orius* species, but little is known about the mating system of this species so widely used in biological control. The present study focuses on the effect of the mating history of the male and the age of both sexes in mating, on the fecundity, fertility and longevity of mated females. The copulation and insemination capacity of the males were tested with newly emerged virgin males and females, six females being copulated by a male consecutively. On the other hand, to investigate the effect of age, tests of newly emerged males were mated to females of one or two weeks of age, and in the same way it was done with females, newly emerged they were mated with males of one or two weeks. The results indicated that the males mated successfully, but reduced their insemination capacity in the sixth females, especially in their early fertility (10 days). From the age trials tested the age of both sexes in mating affected the reproductive potential of the females. Fecundity of the female is higher when the male is not newly emerged when mating, and when the female is newly emerged. Although fertility varies in the opposite direction, it does not offset the advantage of higher fertility. Finally, the implication of our results in the massive rearing of *O. laevigatus* is discussed.

1. INTRODUCCIÓN

El control integrado de plagas donde predomina principalmente el control biológico, es empleado con éxito en muchos de los cultivos agrícolas de todo el mundo y, sobre todo, en aquellos que se dan en invernaderos. El incremento de la superficie de invernaderos alrededor del mundo para adaptar las condiciones climáticas a los cultivos hortícolas y ornamentales, ha implicado el aumento del comercio y empleo de insectos depredadores y parasitoides para controlar las plagas de esos cultivos. A ello se le han sumado las restricciones y prohibiciones de muchos insecticidas químicos, que tienden a ser sustituidos por depredadores generalistas de las plagas más comunes en hortícolas de la zona mediterránea y de Europa, como son: *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Bielza et al. 2020).

De los depredadores generalistas destaca el género *Orius* sp., antocóridos depredadores de plagas como trips, pulgones, ácaros y moscas blancas (Lattin, 1999). Uno de los orius más empleados en cultivos de invernadero en Europa, Norte de África y Asia es *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), depredadores que se emplean fundamentalmente para el control de trips

El éxito de *O. laevigatus* en programas de control biológico reside, entre otras cosas, en su establecimiento exitoso en los cultivos, y para ello es necesario conocer su comportamiento en el acoplamiento y su fecundidad (van Lenteren, 1999; Hardy et al., 2005).

Muchos son los estudios que se han hecho acerca de la biología de *O. laevigatus*, principalmente centrados en, dietas, tipos de presa, adaptaciones a diferentes temperaturas, pero pocos hablan sobre la habilidad reproductiva. Leon-Beck y Coll (2009) es uno de los estudios que habla sobre el acoplamiento, donde se estudia la fecundidad de tres hembras acopladas consecutivamente por el mismo macho. Estos autores establecen que la fecundidad se ve reducida en la tercera hembra (Fig. 1) así como el tiempo de acoplamiento (Fig. 2).

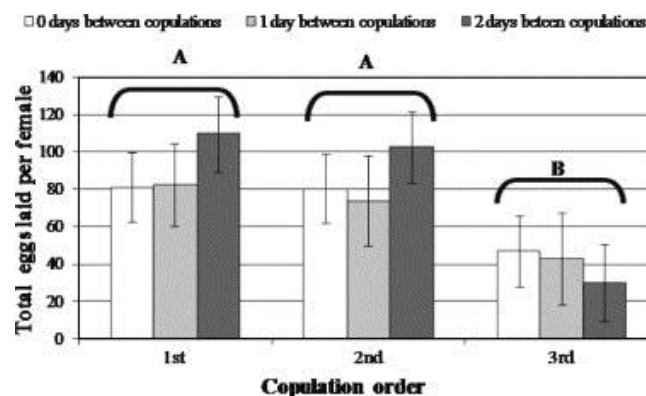


Figura 1: Fecundidad que presenta cada hembra (Leon-Beck y Coll, 2009).

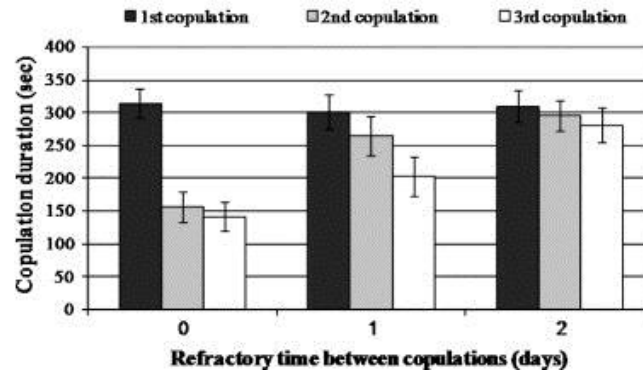


Figura 2: Duración de la cópula (seg) de tres machos con tres hembras cada uno (Leon-Beck y Coll, 2009).

Otro estudio sobre el acoplamiento múltiple es el de Arakawa et al (2018), empleando otras especies de orius (*O. sauteri*, *O. minutus* y *O. strigicollis*). Al igual que Leon-Beck y Coll (2009), acoplaban un macho con tres hembras, pero a diferencia de ellos, no obtuvieron diferencias significativas en sus resultados de fecundidad entre la primera, segunda y tercera hembra. Atribuyeron esos resultados a que estas especies pueden ser capaces de producir más descendencia en acoplamientos múltiples.

Por otro lado, Bonte y De Clercq (2010) estudian la alimentación y la descendencia de las hembras según la edad del macho. Las hembras apareadas con machos jóvenes (0 días de edad) mostraron una reducción en los recuentos de ovocitos en comparación con las apareadas con machos mayores (8 días de edad) cuando se alimentaron con una dieta artificial, pero no con un alimento óptimo.

Como ya se ha dicho anteriormente, la importancia de conocer aspectos del acoplamiento es fundamental en el éxito del control biológico, ya que ello no solo está ligado a su instalación en los cultivos, sino también lo está para su producción en masa, donde una cría masiva eficiente implica una reducción de los costes de producción.

Otros aspectos en los que también son importantes los sistemas de acoplamiento son en programas de mejora y selección genética. En la mejora para ciertos caracteres, como adaptación a diferentes dietas o temperaturas, un criterio de selección es elegir las hembras con mayor fecundidad bajo esas condiciones (diferente dieta o temperaturas extremas). Sin embargo, la fecundidad de la hembra puede estar influida por otros factores no controlados, como la edad del macho o el número de hembras que ha acoplado previamente. Por tanto, estos factores pueden incrementar la variabilidad no asociada al carácter que queremos seleccionar, metiendo ruido en el sistema. Por tanto, es importante conocer si efectivamente estos factores (edad del macho y estado reproductivo) tienen un efecto significativo en la fecundidad de la hembra, para tenerlos en cuenta o no en los programas de mejora.

2. OBJETIVOS

Observaciones de nuestro equipo de laboratorio al hacer otros ensayos y crías, no coincidían con los resultados de Leon-Beck y Coll (2009) ya que no parecía que la fecundidad de una tercera hembra fecundada por el mismo macho tuviera una fecundidad reducida. Por ello queríamos realizar un estudio que corroborara lo establecido, además de estudiar el acoplamiento consecutivo de más de tres hembras.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de la edad del macho (entre 0 y 8 días) en la fecundidad de las hembras en *O. laevigatus* (Bonte y De Clercq 2010), pero no el efecto de la edad de las hembras. Por tanto, nos planteamos estudiar el efecto en un mayor rango de edad (hasta 14 días) tanto del macho como de la hembra.

Ambos factores, historial de acoplamiento del macho y la edad al acoplamiento de macho y hembra, pueden tener un impacto significativo tanto en la producción industrial de este agente de control biológico, como es su rendimiento reproductivo en los cultivos.

Por tanto, el objetivo es comprobar con cuántas hembras consecutivas puede acoplarse un macho sin que baje la fecundidad de la hembra, así como ver el efecto de la edad del macho y de la hembra en el acoplamiento sobre la fecundidad de la hembra.

Tabla 1: Procedencia de los orius empleados en la mezcla de individuos para los ensayos.

Origen	Población	Fecha de muestreo	Especie de planta
España (Noroeste)	Portonovo	Ago 2013	<i>Ulex sp.</i>
	Corrubedo	Ago 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Moreira	Ago 2013	<i>Daucus sp.</i>
	Catadoiro	Ago 2015	<i>Daucus sp.</i>
España (Sureste)	Perín	Oct 2012	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	Cabo de palos	Oct 2012	<i>T. hirsuta</i>
	La Zenia	May 2013	<i>Convolvulus sp.</i>
	Cabo de Gata	Jun 2013	<i>Anthyllis cytisoides</i>
	Cuevas de Almanzora	May 2013	<i>Umbelliferae</i>
	Hellin	May 2013	<i>Chamaemelumsp.</i>
España (Suroeste)	Puerto de la Mora	Nov 2015	
	Cazorla	Jul 2014	<i>Rubus sp.</i>
España (Suroeste)	Islantilla	Jun 2014	<i>Thymus carnosus</i>
	Carmona	Ago 2013	<i>Mentha suaveolens</i>
España (Noreste)	Teruel	Sep 2013	
	Logroño	Oct 2014	<i>Aster sp.</i>
España (Centro)	Mentrida	Mar 2015	<i>Chenopodiumsp.</i>
	Alcobendas	May 2015	<i>Umbelliferae</i>
	Ruidera	Jul 2013	<i>Rubus sp.</i>
España (Oeste)	Guadalupe	Sep 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Arroyo de San Serván	Sep 2015	<i>D. gnidium</i>
	Mérida	Oct 2014	<i>D. gnidium</i>
Italia (Sicilia)	Acate	Jun 2013	
	Cefalú	May 2015	<i>Compositae</i>
	Palermo	May 2015	<i>Daucus sp.</i>
Italia (Sur)	Policoro	Jun 2013	
Grecia (Creta)	Samaria	May 2013	<i>Labiatae</i>
	Rethymno	May 2013	<i>Umbelliferae</i>
	Chania	May 2013	<i>Malva sp.</i>

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Procedencia de las poblaciones

Alrededor de 30 poblaciones de *O. laevigatus* fueron recolectadas en distintas zonas de España y de países del mediterráneo entre los años 2012 y 2015 (Tabla 1). Los individuos se recolectaron de diferentes especies de plantas, e inmediatamente después de su recolección fueron colocados en los recipientes de cría. Una parte de todas esas poblaciones se mezcló entre sí, formando una población totalmente nueva, para obtener una población que sirviera de referencia como representativa de una población silvestre típica. Esta población, denominada MEZCLA, se mantuvo en cría más de diez generaciones antes de realizar los ensayos.

3.2 Cría de *Orius laevigatus*

En el laboratorio, las poblaciones de *O. laevigatus* fueron mantenidas en botes de 1L. El material de los botes es plástico y en la tapa de cada uno de ellos se hizo una perforación de unos 6-7 cm de diámetro que posteriormente se cubrió con papel de filtro y se selló con cola caliente, para así facilitar la ventilación de las poblaciones.

En cada bote se introduce un trozo de unos 5 cm de vaina de judía que sirve como sustrato de oviposición de las hembras. La judía, antes de ser colocada en los botes, es lavada en una solución de agua y lejía al 2% unos 20 minutos, para eliminar hongos, restos de suciedad o insecticidas que puedan contener. Tras este lavado se hace otro lavado con agua otros 20 minutos y una vez seca se cortan las vainas y se sellan con parafina por ambos lados por donde es cortada (Fig. 3).



Figura 3: Sellado de judías.

El bote es llenado con cáscara de trigo sarraceno, que sirve como refugio de los individuos y evita el canibalismo entre ninfas (Fig. 4). Como alimento se aportan huevos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). El aporte de huevos y el intercambio de judía se realiza cada 48-72 horas. Las judías extraídas, que contienen huevos, son depositadas en otros botes donde emergen y se desarrollan las ninfas. Esto se realiza también por el canibalismo, ya que, en ausencia o carencia de alimento, los adultos pueden llegar a alimentarse de las crías. Las poblaciones y los ensayos fueron mantenidos en el laboratorio con una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa de 65-70% y un fotoperiodo de L16:D8.



Figura 4: Interior de uno de los recipientes.

3.3 Ensayos

Los ensayos fueron hechos con hembras y machos adultos procedentes de la misma población MEZCLA. Los individuos son seleccionados en el último estadio ninfal (N5). Para separar los individuos del salvado de trigo sarraceno, el bote de la población era tamizado (Fig. 5), reteniendo el salvado y permitiendo la aspiración de las ninfas (Fig. 6 y 7), que son depositadas individualmente en viales de 5ml (Fig. 8) con comida (*Ephestia kuehniella*) y cerrados con tapones agujereados para permitir la ventilación.

Para garantizar que los adultos obtenidos son de la edad apropiada para cada tipo de ensayo, cada tanda de individuos se deja durante un periodo de tiempo variable en función de la finalidad del ensayo.



Figura 5: Tamizado de los individuos.



Figura 6: Aspiración de los individuos que han sido tamizados.



Figura 7: Aspiración de los individuos que han sido tamizados.

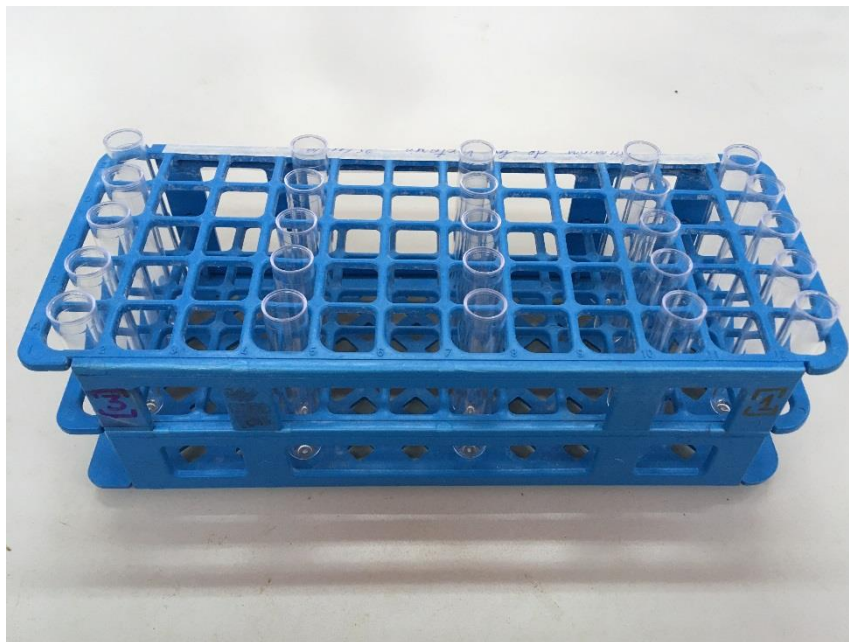


Figura 8: Viales donde se separan los individuos de quinto estadio.

3.3.1 Ensayos de acoplamiento múltiple

En estos ensayos, todas las ninfas en el último estadio son dejadas el tiempo necesario para obtener adultos recién emergidos (<24 h), que eran sexados. Para realizar el acoplamiento, un macho y una hembra eran introducidos simultáneamente en un vial de 5 ml, donde se cronometraba el tiempo de preacoplamiento y de acoplamiento. Una vez que el macho se desacoplaba, se retiraba la hembra y se dejaba un periodo de diez minutos de descanso contados desde la finalización de la cópula. Pasado el periodo de descanso se introducía una nueva hembra. El macho era acoplado a seis hembras consecutivas.

3.3.2 Ensayos de edad

Al igual que en el tipo de ensayo anterior, todas las ninfas en el último estadio son dejadas el tiempo necesario para obtener adultos recién emergidos (<24 h), pero parte de esos adultos fueron dejados una o dos semanas adicionales antes de emparejarlos para los acoplamientos. Los acoplamientos fueron hechos del siguiente modo: machos recién emergidos (M0) eran acoplados a hembras de una (H7) o de dos semanas (H14) de edad, y de igual modo se hacía con las hembras, hembras recién emergidas (H0) eran acopladas con machos de más edad, una (M7) o dos semanas (M14). Al igual que en el ensayo de acoplamiento múltiple, un macho y una hembra eran aspirados en un mismo vial de 5 ml donde se cronometraba el tiempo de preacoplamiento y de acoplamiento.

Para este ensayo, los datos de machos recién emergidos cruzados con hembras recién emergidas fueron considerados de las primeras hembras acopladas en los ensayos de acoplamiento múltiple.

3.4 Fecundidad

Después de cada acoplamiento, independientemente del tipo de ensayo, la hembra fue depositada individualmente en salseras de plástico de 30 ml (Fig. 9). Cada salsera contiene huevos de *Ephestia kuehniella* y un trozo de judía que permite la hidratación de la hembra y a la vez sirve como lugar de oviposición. Cada trozo de judía tenía un tamaño de unos 3cm y fue sellado por ambos lados donde fue cortado con parafina para impedir la deshidratación. Las salseras fueron cubiertas con papel para permitir la aireación y mantenidas a condiciones estándar de laboratorio, 26 ± 1 °C y entre 65 y 75 HR (Fig. 10 y 11).

Cada 3 o 4 días se añadía comida y se cambiaba la judía por un trozo nuevo. Con el trozo de judía cambiado se hacía la lectura, donde se observaba a la lupa binocular y se contaban los huevos que la hembra había puesto en los días previos (Fig. 12 y 13). Este mismo procedimiento se realizó en todos los ensayos estudiados durante el periodo de oviposición de cada hembra. Cuando el periodo de oviposición finalizaba, las hembras eran mantenidas durante el resto de su vida y se obtuvieron los datos de longevidad.



Figura 9: Hembra adulta individualizada en una salsera.

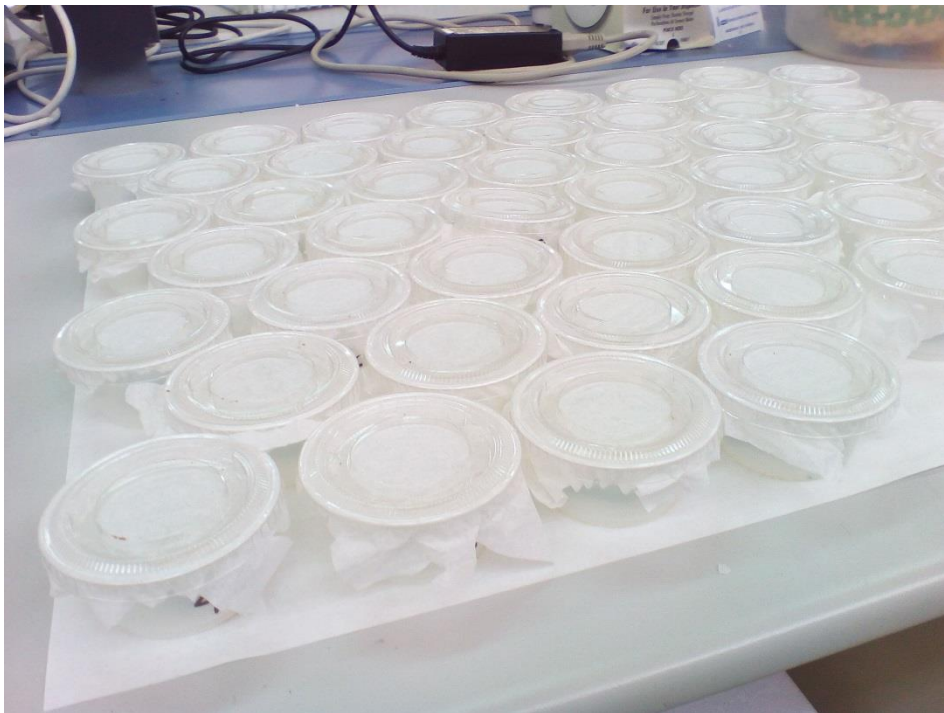


Figura 10: Ensayo.

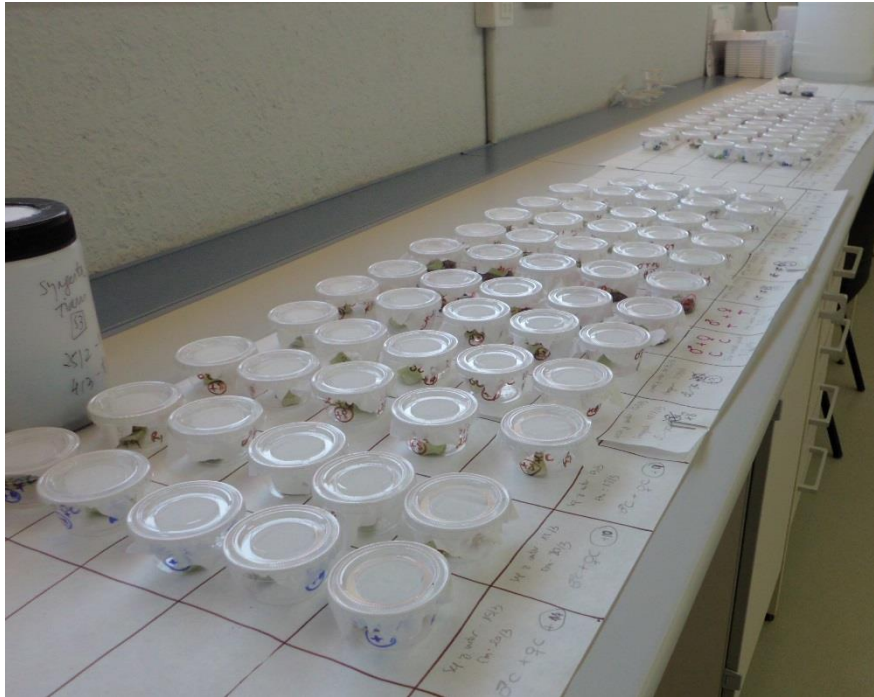


Figura 11: Ensayo.



Figura 12: Huevos de *O. laevigatus* en judía.



Figura 13: Huevos de *O. laevigatus* eclosionados y cercanos a la eclosión.

3.5 Análisis de los datos

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de un factor, comparando el tiempo de preacoplamiento, tiempo de acoplamiento, fecundidad a los 10 días, fecundidad total y longevidad. Fueron analizadas por número de hembra acoplada en el caso de los ensayos de acoplamiento múltiple, y por la edad de machos y hembras en los ensayos de edad. Para ambos tipos de ensayos se usó el Tukey HSD test para separar los grupos homogéneos.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de los ensayos

4.1.1 Ensayos de acoplamiento múltiple

En lo referente al tiempo de preacoplamiento (tiempo en segundos), se detectaron diferencias significativas ($F=2,58$; g.l.=5/132; $p<0,05$), con mayores tiempos es las últimas hembras acopladas (Fig. 14). Sin embargo, estas medias más altas fueron fundamentalmente debido a dos o tres tiempos de preacoplamiento muy largos (>300 s).

En cambio, sí hubo diferencias significativas ($F=21,39$; g.l.=5/132; $p<0,001$) en el tiempo de acoplamiento (Fig. 15). El macho tardó más tiempo en la cópula en la primera hembra, reduciendo ese tiempo en las hembras siguientes.

De los resultados obtenidos de todas las hembras, el tiempo de acoplamiento mínimo para que la inseminación fuese efectiva fue a partir de los 61 segundos.

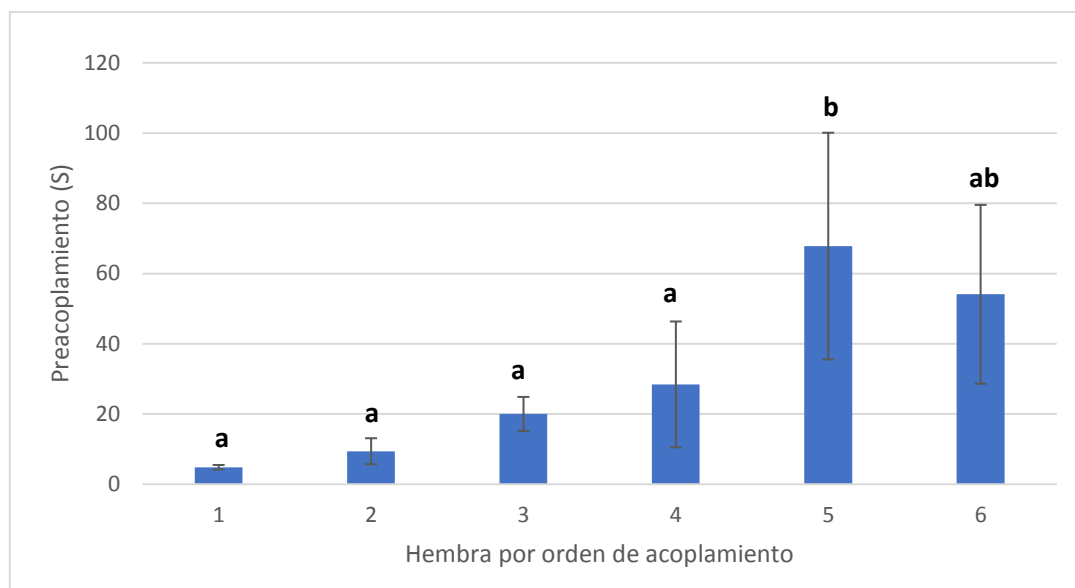


Figura 14: Tiempo de preacoplamiento (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p>0,05$).

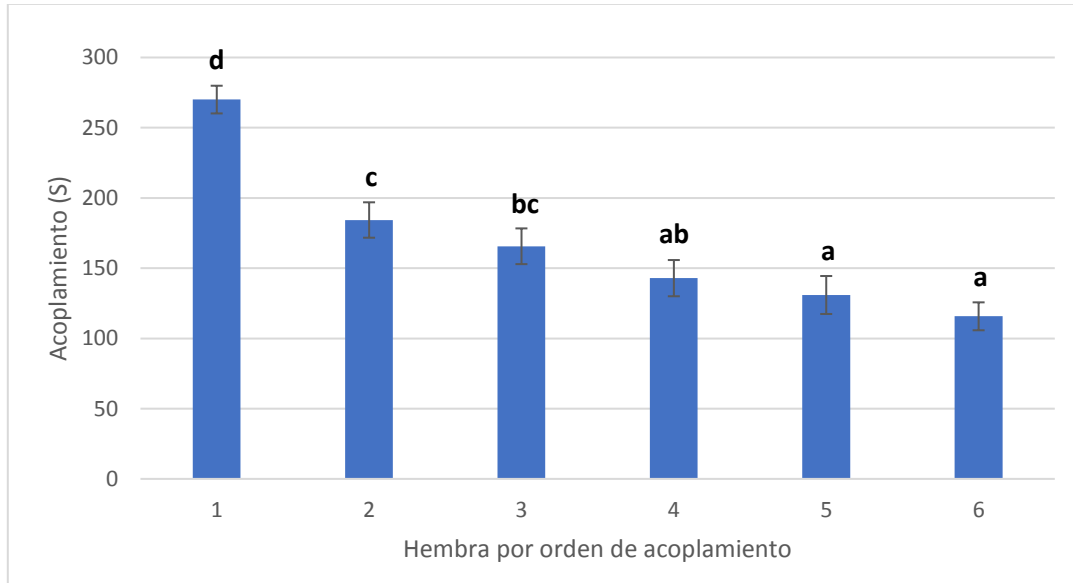


Figura 15: Tiempo de acoplamiento (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

De los ensayos realizados, no todas las hembras presentaron fecundidad, el porcentaje de hembras que no pusieron siguiendo el número de acoplamiento se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Porcentaje de hembras que no presentaron oviposición.

Número de hembra	%
1	4,3
2	17,4
3	8,7
4	8,7
5	8,7
6	30,4

Existió una correlación muy significativa ($r^2=29,58$; $p < 0,001$) entre la longevidad y la fecundidad total (Fig.16), y también ($r^2=67,41$; $p < 0,001$) entre la fecundidad total y la fecundidad a los 10 días (Fig. 17).

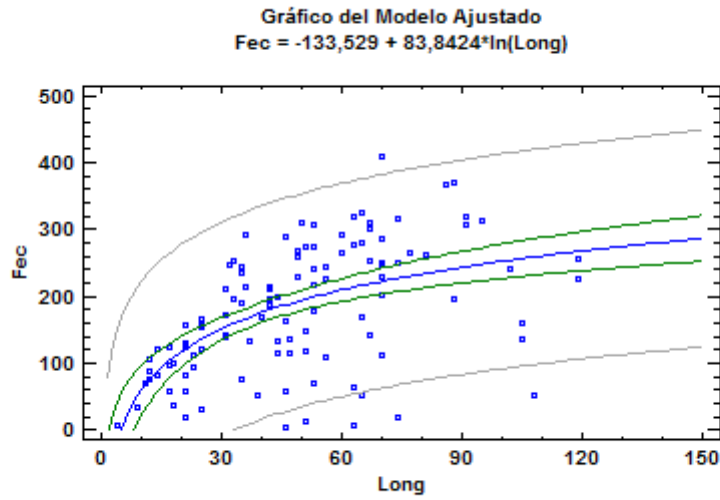


Figura 16: Relación entre la longevidad y el número total de huevos depositados.

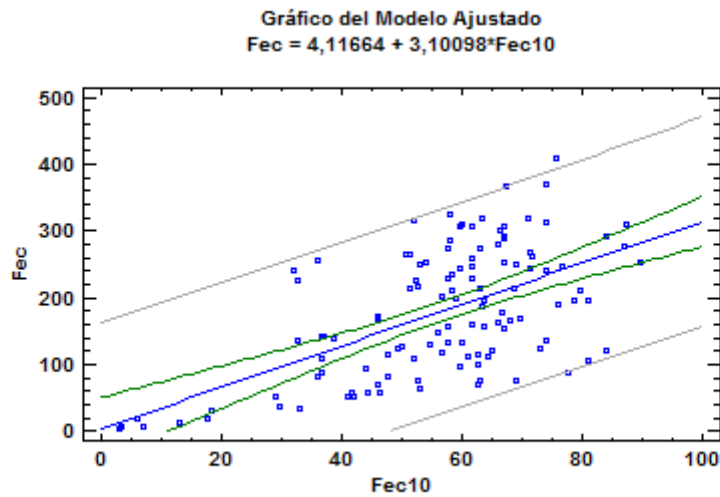


Figura 17: Relación entre el número de huevos depositados a lo largo de toda la vida fértil de la hembra y a los diez primeros días.

De todas las hembras que presentaban fecundidad, no se observaron diferencias significativas en el análisis estadístico de su fecundidad total ($F=1,64$; g.l.=5/109; $p>0,05$) (Fig. 18). Sin embargo, sí se observa una tendencia a una menor fecundidad en la sexta hembra. En la figura 19 se representa la fecundidad total de cada hembra individual según el orden de acoplamiento. Se puede observar que hay poca variación entre el orden de las hembras, pero mucha variación entre las hembras individuales dentro de cada orden. Por ejemplo, en las hembras acopladas en primer lugar, tuvieron una fecundidad desde 7 hasta 366 huevos/hembra, y en las acopladas en segundo lugar desde 19 a 409 huevos/hembra. A pesar de esta elevada variación dentro de cada hembra, sí se aprecia que para las hembras acopladas de primer a quinto lugar pocas hembras ponen por debajo de 50 huevos (una o ninguna), pero llega a haber hasta 8 hembras con baja oviposición entre las hembras acopladas en sexto lugar.

Efectivamente, en la fecundidad temprana (10 días) sí se observaron diferencias significativas ($F=5,9$; g.l.=5/109; $p<0,001$), con una fecundidad significativamente menor en las hembras acopladas en sexto lugar (Fig. 20).

Las que no presentaban fecundidad o las que ponían menos, eran más longevas. Como se puede ver en la representación gráfica de la figura 21, las últimas hembras a las que el macho acopló, quinta y sexta especialmente, tienden a presentar una longevidad superior a las hembras que el macho había acoplado previamente (1^a , 2^a y 3^a) ($F=2,66$; g.l.=5/109; $p<0,05$).

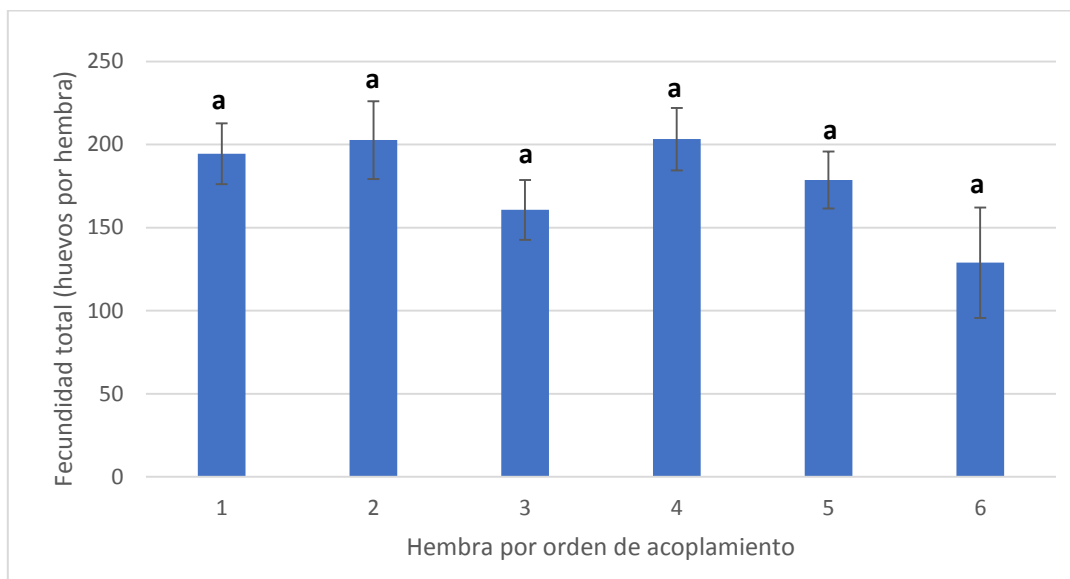


Figura 18: Fecundidad total (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p>0,05$).

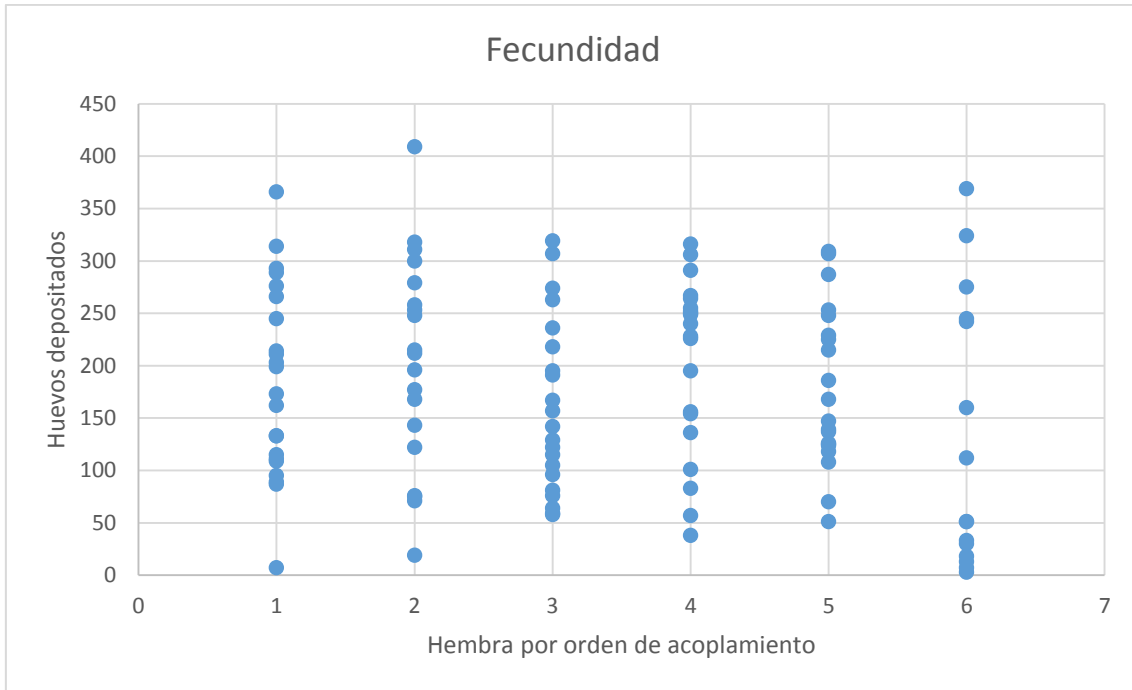


Figura 19: Huevos depositados por cada hembra según su orden de acoplamiento.

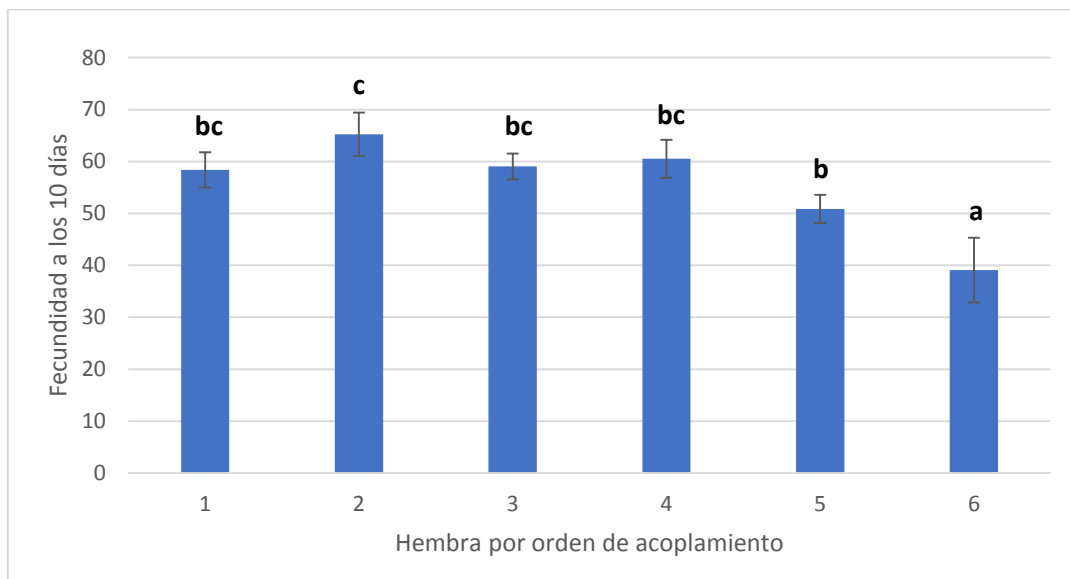


Figura 20: Fecundidad a los diez días (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

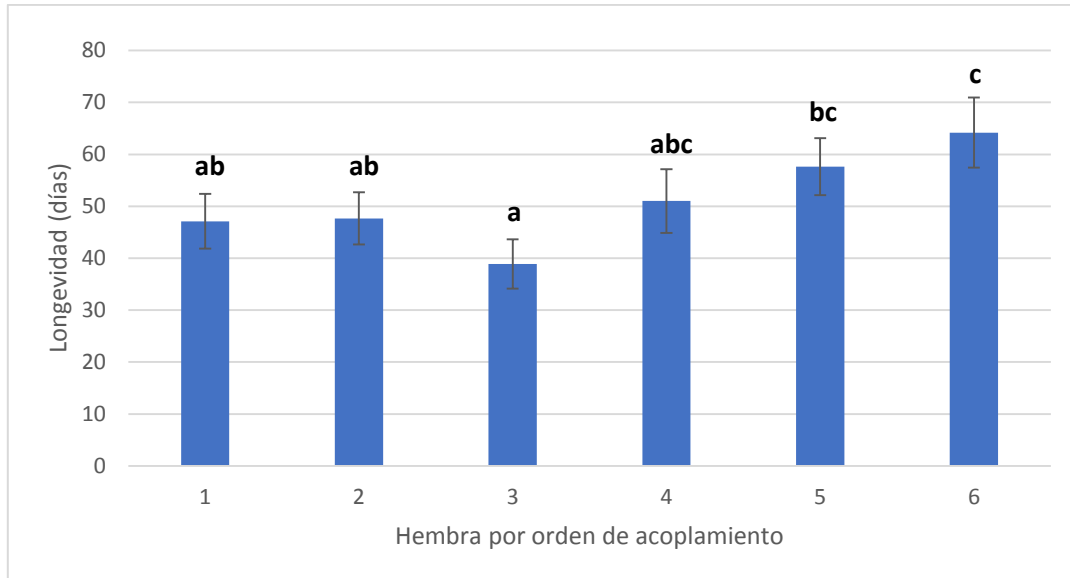


Figura 21: Longevidad (media \pm ET) de cada hembra según el orden correspondiente con el macho. Barras con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.2 Ensayos de edad

El tiempo necesario de preacoplamiento varió significativamente entre las hembras de diferente edad ($F=4,69$; g.l.=2/151; $p < 0,05$), pero no entre machos ($F=1,57$; g.l.=2/151; $p = 0,2$). Cuando las hembras eran recién emergidas el tiempo de preacoplamiento fue mucho menor que cuando tenían 7 o 14 días de edad (Fig. 22).

En cambio, el tiempo para la cópula fue significativamente menor ($F=20,82$; g.l.=2/151; $p < 0,002$) para las hembras de mayor edad (M0H7 y M0H14) que para las recién emergidas (Fig. 26). Por el contrario el tiempo de acoplamiento fue significativamente mayor en los machos de mayor edad ($F=19,70$; g.l.=2/151; $p < 0,002$) (Fig. 23).

Sólo se detectaron diferencias significativas marginales ($F=2,75$; g.l.=2/123; $p = 0,07$) en la fecundidad total en función de la edad de la hembra, pero sí en función de la edad del macho ($F=3,18$; g.l.=2/123; $p < 0,05$) (Fig. 24). Sin embargo, para la fecundidad a los diez días, se aprecia que las hembras jóvenes (M14H0, M7H0, y M0H0) ponen significativamente más que las hembras de una o dos semanas de edad (M0H7 y M0H14), pero, entre las hembras de una o dos semanas de edad no se aprecian diferencias significativas de oviposición (Fig. 25) ($F=7,25$; g.l.=2/119; $p < 0,005$). También existieron diferencias significativas ($F=6,79$; g.l.=2/119; $p < 0,005$) en función de la edad del macho, teniendo las hembras fecundadas por los machos jóvenes (M0H0, M0H7 y M0H14) menor puesta que las hembras acopladas con machos de una o dos semanas de edad (M7H0 y M14H0) (Fig.25).

En cuanto a la fertilidad, existieron diferencias significativas tanto para la edad de la hembra ($F=4,19$; g.l.=2/123; $p < 0,05$) como para la edad del macho ($F=4,00$; g.l.=2/123; $p < 0,05$). La fertilidad aumentó con la edad de la hembra, pero disminuyó con la edad del macho (Fig. 26).

La longevidad de las hembras también varió significativamente en función de la edad de la hembra ($F=5,57$; g.l.=2/121; $p < 0,005$) y del macho ($F=4,78$; g.l.=2/121; $p < 0,05$). Las hembras que fueron fecundadas a mayor edad (M0H7 y M0H14) vivieron más tiempo que las que fueron

fecundadas recién emergidas (Fig. 27). Sorprendentemente la edad del macho también pareció influir en la longevidad de las hembras, siendo menos longevas las hembras fecundadas por los machos más viejos (Fig. 27).

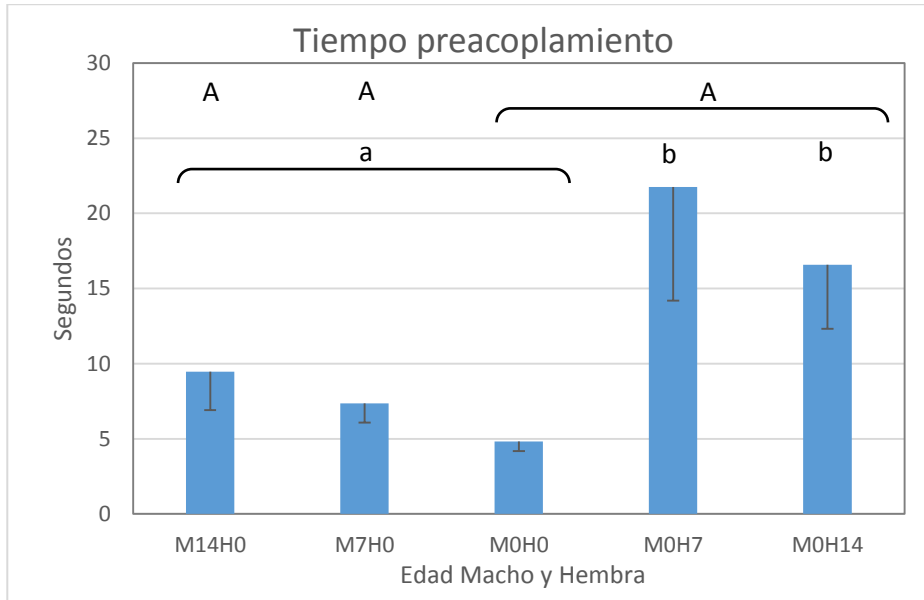


Figura 22: Tiempo de preacoplamiento (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

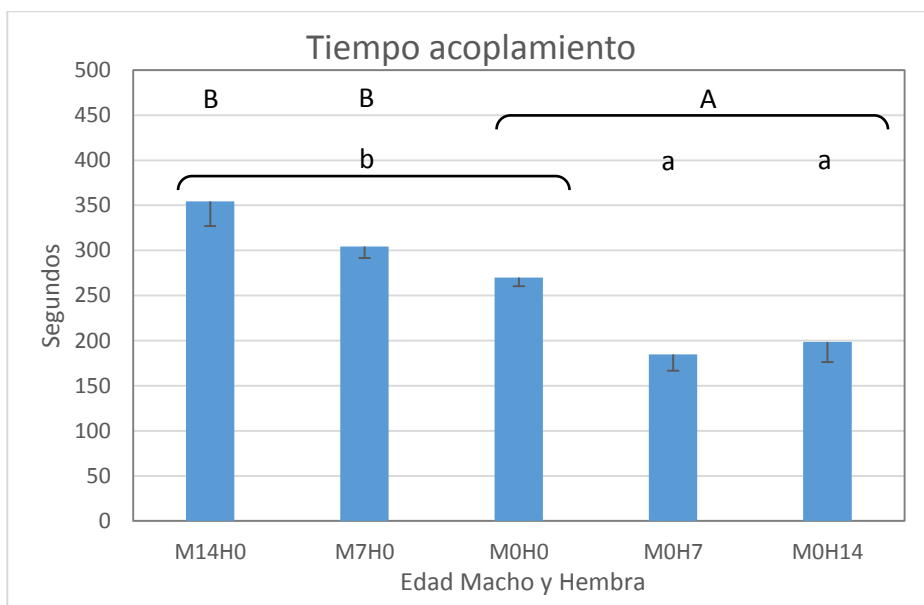


Figura 23: Tiempo de acoplamiento (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

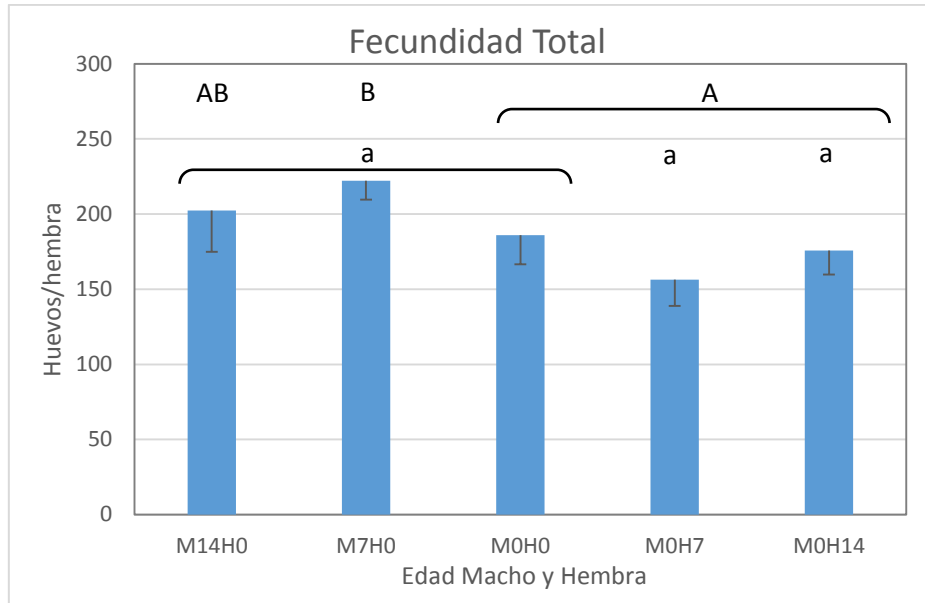


Figura 24: Fecundidad total (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

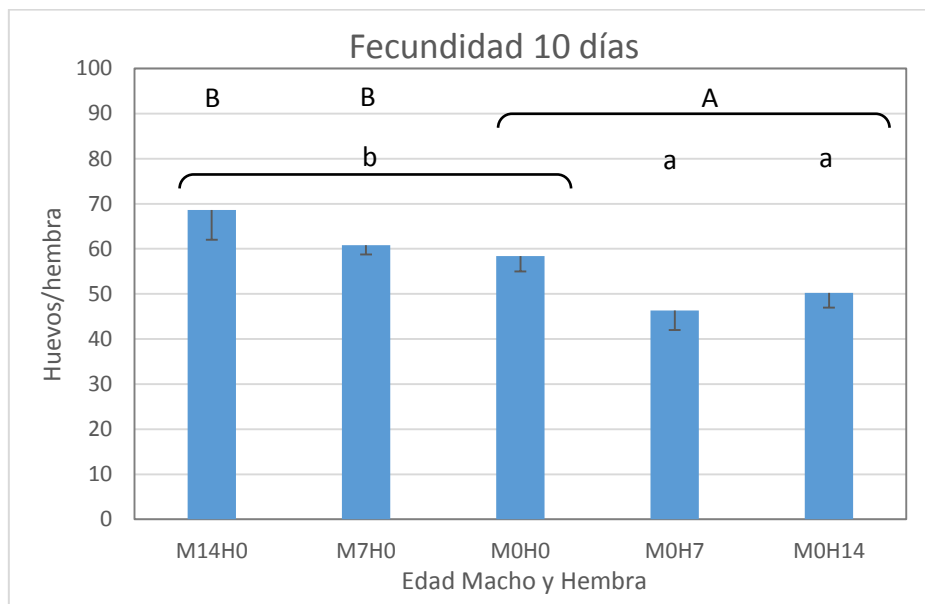


Figura 25: Fecundidad 10 días (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

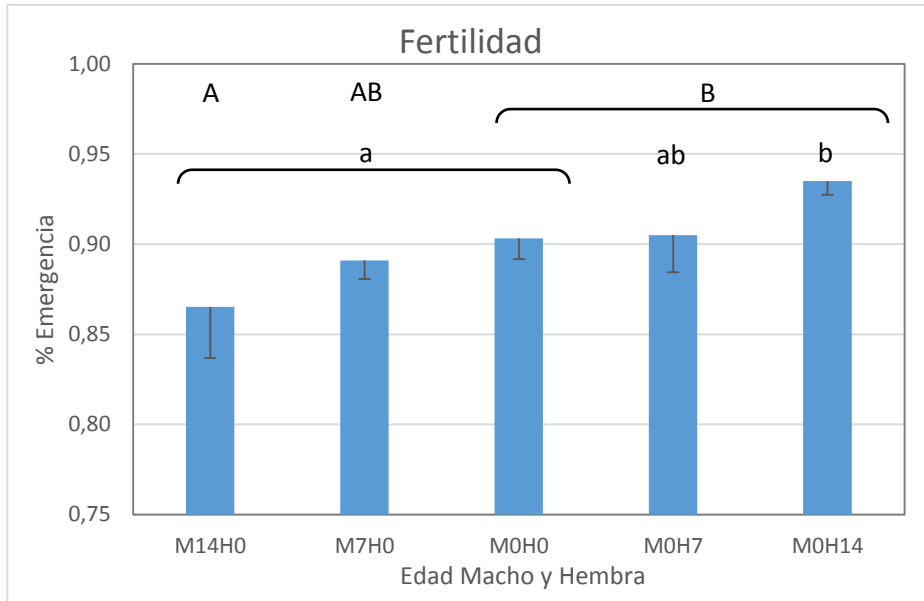


Figura 26: Fertilidad (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

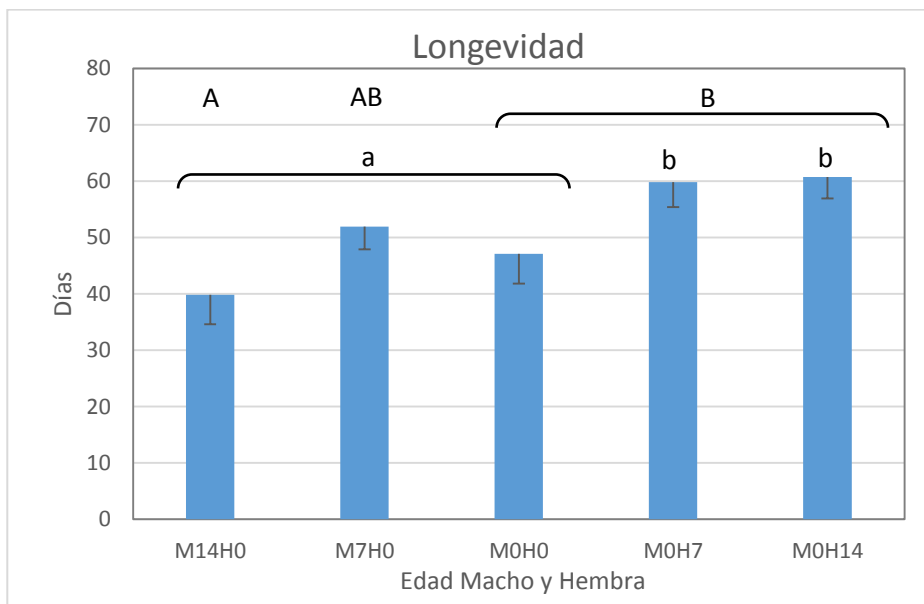


Figura 27: Longevidad (media \pm ET) según la edad de la hembra y del macho. Las barras con la misma letra minúscula (edad de hembras) o mayúscula (edad de machos) no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Ensayos de acoplamiento múltiple

Los resultados que obtuvimos muestran que el tiempo mínimo de acoplamiento para que la inseminación fuese efectiva fue a partir de 61 segundos. En ese caso la fecundidad total fue baja (33 huevos), pero en otra hembra con un tiempo de acoplamiento de 63 s, la fecundidad total fue ya considerable (126 huevos). Estos resultados difieren a los obtenidos por otro estudio que establece este tiempo mínimo en 105 segundos para *O. laevigatus* (Leon-Beck y Coll 2009). También para *O. insidiosus* se estableció un tiempo mayor (90 s) que en nuestro estudio (Vacacela Ajila *et al.* 2019). La diferencia podría achacarse a la utilización de poblaciones distintas. Como se comenta más tarde, nuestra población parece mostrar un mayor vigor, lo que podría también explicar este hecho.

El tiempo de acoplamiento del macho disminuyó desde la primera hembra. Con la primera hembra, el tiempo de acoplamiento es significativamente más alto (270 s) que con la segunda (184 s) y sucesivas (116-166 s). Esto no parece explicarse por un agotamiento del esperma, ya que no hay una disminución de la fecundidad en las siguientes hembras, hasta la sexta y marginalmente desde la quinta. Así tiempos menores de acoplamiento no significaron menores fecundidades, y por tanto tampoco menores cantidades de esperma. En el trabajo de Leon-Beck y Coll (2009) se observa el mismo fenómeno. Cuando las cópulas fueron sucesivas en el mismo día, la duración de la cópula es significativamente mayor con la primera hembra que con las siguientes. Sin embargo, la fecundidad no se redujo en la segunda, sino que fue con la tercera hembra. Así la cantidad de esperma era similar en la segunda hembra pero el tiempo de acoplamiento fue menor que con la primera. Y viceversa, la cantidad de esperma era mayor en la segunda que en la tercera, pero el tiempo de acoplamiento fue similar. De la misma forma, en el mismo trabajo (Leon-Beck y Coll 2009), cuando se dejaron dos días entre acoplamientos, la duración de los mismos fue similar para las tres hembras, pero se produjo la misma reducción de la fecundidad sólo en la tercera hembra.

Así, la duración de la cópula no está relacionada con la cantidad de esperma disponible en el macho, y más bien parece atribuible al agotamiento energético del macho. Con la primera hembra, el macho es capaz de mantener una cópula más larga, pero se ve reducida paulatinamente en cópulas sucesivas. Sin embargo, este agotamiento y reducción del tiempo de cópula no se produce si se deja un tiempo de días de recuperación entre cópulas (Leon-Beck y Coll 2009). Para el macho la cópula requiere un gran esfuerzo, ya que tiene que superar la resistencia de la hembra.

No hubo diferencias significativas en la fecundidad total en función del orden de acoplamiento, aunque se observó una disminución en la sexta hembra (Fig. 18). En un trabajo previo, Leon-Beck y Coll (2009) sí observaron una reducción significativa en la fecundidad total ya en la tercera hembra, concluyendo que había un agotamiento del esperma tras tres cópulas consecutivas, independientemente de si eran en el mismo día, o se dejaba 1 ó 2 días entre ellas. Sin embargo, en nuestro estudio no se observa esa disminución del esperma disponible, ya que incluso algunas hembras acopladas en sexto lugar de forma consecutiva eran capaces de poner muchos huevos. De hecho, la segunda (369 huevos) y cuarta (324 huevos) hembra más fecunda fueron fecundadas en sexto lugar. Sin embargo, sí se observan en las hembras acopladas en sexto lugar,

más hembras con baja fecundidad. De las once hembras menos fecundas (por debajo de 51 huevos), ocho de ellas habían sido fecundadas en sexto lugar. Por tanto, hay machos capaces de mantener su capacidad fecundadora en altos niveles tras seis cópulas seguidas, pero en general más frecuentemente tiende a disminuir.

La falta de diferencias significativas en la fecundidad total puede ser debida a una elevada variabilidad debido a otros factores. Por ejemplo, la longevidad influyó de manera significativa en la fecundidad total (Fig. 16), ya que hembras más longevas tienen mayor oportunidad de poner huevos, como también han descrito otros autores (Leon-Beck y Coll 2009). Por ello, la medida de la fecundidad temprana ha sido propuesta como un mejor indicador del efecto de factores externos en la fecundidad de las hembras (Mendoza et al. 2020b), siendo aún un buen indicador de la fecundidad total esperada (Fig. 20). Sí existieron diferencias significativas en la fecundidad a diez días en función del orden de acoplamiento (Fig. 20), mostrando la sexta hembra una fecundidad temprana menor que las anteriores, con la quinta hembra en una posición intermedia. Así, la capacidad de inseminación de los machos de *O. laevigatus* se mantuvo sin reducción como mínimo hasta la cuarta hembra fecundada consecutivamente. Esto contrasta con los resultados de Leon-Beck y Coll (2009) que concluyeron que disminuía ya en la tercera hembra. Esta diferencia podría explicarse por las diferentes poblaciones utilizadas, siendo la nuestra una mezcla de un amplio rango de poblaciones silvestres, frente a una población comercial utilizada en el trabajo citado. Nuestra población parece mostrar un mayor vigor, medido tanto por una mayor capacidad de inseminación del macho como se ha comentado, como también por una mayor longevidad media (51,0 días frente a 27,0 días), una mayor fecundidad total (185,9 huevos/hembra de media para la primera hembra frente a unos 90 huevos/hembra), así como un menor tiempo efectivo de acoplamiento (61 s frente a 105 s) como se ha comentado más arriba.

Todo esto nos lleva a la reflexión de la conveniencia de utilizar más de una población de una especie cuando se estudian sus características biológicas y ecológicas. En *O. leavigatus* ya se ha destacado este punto al mostrarse la elevada variabilidad entre poblaciones en caracteres tan dispares como su susceptibilidad a insecticidas (Balanza et al. 2019) como en su tamaño (Mendoza et al. 2020b) o en su adaptación a un alimento alternativo como el polen (Mendoza et al 2020a).

5.2 Ensayos de edad

El tiempo de acoplamiento se incrementó con la edad del macho. Los machos recién emergidos (<24 h) pueden no haber madurado completamente y no estar perfectamente listos para el acoplamiento. De hecho, en otras especies de *Orius* se ha descrito que los machos emergen antes que las hembras para estar ya preparados para el acoplamiento (Musolin e Ito 2008). Con la edad del macho, el tiempo de acoplamiento aumenta posiblemente por una mayor cantidad de esperma que haya almacenado y pueda transferir.

Por el contrario, el tiempo de acoplamiento disminuyó con la edad de la hembra. Se ha observado que los machos de algunas especies transfieren más cantidad de esperma a hembras jóvenes que a hembras de más edad (Lüpold et al. 2011). De esta manera, los machos podrían estar transfiriendo menor cantidad de esperma al acoplarse con hembras de más edad y, por

tanto, el tiempo de acoplamiento disminuye. Esto se confirmaría por la menor fecundidad de las hembras de más edad.

La fecundidad total fue mayor cuando el macho tiene más edad, especialmente cuando el macho tiene siete días (222 huevos), algo inferior cuando tiene 14 días de edad (202 huevos). Entre hembras no se obtuvieron diferencias significativas. En la fecundidad a los diez días, entre machos pasa lo mismo que con la fecundidad total, los machos con más días de edad presentaban una fecundidad mayor, siendo en este caso ligeramente superior la fecundidad de los machos de 14 días (68 huevos) frente a los machos de siete días (60 huevos).

Efectivamente, la fecundidad aumentó con la edad del macho y disminuyó con la edad de la hembra. Que las hembras acopladas con machos de más edad sean más fecundas, corrobora lo dicho anteriormente, con una mayor maduración sexual y cantidad de esperma acumulado con la edad del macho. Estos resultados coinciden con otros ensayos en otras especies, donde los machos jóvenes tienen menor cantidad de esperma (Gromko et al. 1984, Rankin et al. 2009). Esto ocurre porque machos con más edad poseen más esperma disponible que aquellos que son jóvenes y eso favorece la cantidad de huevos puestos por las hembras. Nuestros resultados son similares a los de Bonte y De Clercq (2010) con *O. laevigatus*. Las hembras fecundadas con machos de 8 días tuvieron una fecundidad temprana mayor que aquellas acopladas con machos recién emergidos. Cuando se alimentaron de una dieta nutricionalmente rica como huevos de *E. kuehniella* no se detectaron diferencias significativas, pero las hembras con machos jóvenes tuvieron una fecundidad de casi la mitad (38 huevos) que la de las hembras con machos de una semana (71 huevos). Además, con una alimentación más restrictiva como una dieta artificial, sí se observaron diferencias significativas, con una fecundidad mayor en hembras acopladas con machos de 8 días respecto a los recién emergidos. Por tanto, nuestros resultados sugieren que con la edad (1 o 2 semanas) los machos aumentan la cantidad del esperma, aportando más esperma viable a la hembra y por tanto mejorando su fecundidad.

En el caso de las hembras también se aprecian diferencias en la fecundidad entre edades, con las hembras jóvenes mostrando una mayor fecundidad que las de que las hembras de 7 y 14 días. En muchas especies de insectos se ha citado este mismo fenómeno, que las hembras que se acoplan a edades jóvenes son más fecundas que aquellas en las que el acoplamiento de retrasa. Este efecto se ha explicado por un deterioro o reabsorción de los oocitos en proceso de maduración (Torres-Vila et al. 2002; Shapiro y Shirk 2010).

La fertilidad siguió una pauta contraria a la fecundidad, es decir, aumentó significativamente con la edad de la hembra, pero disminuyó con la edad del macho. En un trabajo previo con *O. laevigatus* la fertilidad no varió significativamente con la edad del macho con diferencia de 8 días (Bonte y De Clercq, 2010). En nuestro caso, tampoco existieron diferencias significativas entre los machos recién emergidos y los de 7 días de edad, pero sí con los de 14 días de edad. Estos resultados sugieren que aunque la cantidad de esperma pueda aumentar con la edad del macho, resultando en mayor fecundidad, puede ocurrir que a su vez exista un deterioro de la calidad del esperma, reduciendo la fertilidad. Esto ha sido comprobado en otras especies donde la calidad del esperma sí podría ser un indicativo en el hecho de que la fertilidad de los huevos sea inferior a mayores edades (Price and Hansen 1998, Jones and Edgar 2004) y la edad estimada en la que principalmente se puede producir esta bajada de calidad podría ser entre la semana uno y la semana dos de adulto del macho.

En las hembras ocurre lo contrario, al aumentar la edad de acoplamiento disminuye la fecundidad, pero aumenta la fertilidad. En otras especies se ha observado que tanto la

fecundidad como la fertilidad de la hembra se reduce con la edad a la que se acopla (Torres-Vila et al. 2002). No hemos encontrado una explicación clara a nuestros resultados con *O. laevigatus*. Quizás influya que la familia Anthocoridae junto Cimicidae, ambas del orden Hemiptera, tienen un sistema de fecundación muy distinto al resto de los insectos (Shapiro y Shirk 2010).

Las hembras que fueron fecundadas a mayor edad (7 y 14 d) vivieron más tiempo (60 d) que las que fueron fecundadas recién emergidas (52-40d), haciéndonos suponer que al no tener un gasto energético en las primeras semanas de adultas, no les supuso un deterioro que implique una reducción de la longevidad. Por el contrario, hembras jóvenes que empiezan a poner en sus primeros días de adultas tienen ese desgaste extra que las hembras fecundadas con más edad no. Así, el tiempo de vida previo al acoplamiento no supuso un desgaste significativo. Esto concuerda bien en que las hembras vírgenes tienen una longevidad mayor que las que ponen huevos (Leon-Beck y Coll, 2009).

La edad del macho también pareció influir en la longevidad de las hembras, siendo menos longevas las hembras fecundadas por los machos más viejos. Esto puede explicarse porque la fecundidad de las hembras aumentó con la edad del macho, lo que les supuso un mayor gasto energético que redundó en una menor longevidad. Ya se ha comentado que la longevidad de las hembras fecundadas era mayor en las que no ponían o en las que ponían menos que en las que si presentaban una fecundidad más alta, lo que se explica por costes energéticos que requiere el desarrollo del huevo en el proceso de oviposición (Thornhill y Alcock, 1983) (Simmons y Kotiaho 2007).

6. CONCLUSIONES

Según nuestros resultados los machos de *O. laevigatus* tienen una elevada capacidad de fecundar hembras sucesivamente, no reduciéndose la fecundidad hasta la sexta hembra acoplada. Por tanto, aunque la razón sexual de la especie es de 1:1, no es necesaria esa elevada proporción de machos en los cultivos o en la producción industrial de este enemigo natural. Así sería interesante desarrollar algún método para reducir la proporción de machos, ya que consumen recursos alimenticios cuando no son necesarios tantos.

Por otra parte, se ha visto que la fecundidad de la hembra es mayor cuando el macho no es recién emergido al acoplarse, y cuando la hembra es recién emergida. Aunque la fertilidad varía en sentido inverso, no llega a descompensar la ventaja otorgada por una mayor fecundidad. Por tanto, la capacidad reproductiva se ve incrementada con hembras muy jóvenes y machos con algunos días de edad. Por ello, sería interesante añadir machos de mayor edad en las crías sincronizadas cuando los adultos están a punto de emerger. Así una proporción alta de hembras recién emergidas, se acoplará con adultos de mayor edad. Sin embargo, de esta forma aumentamos mucho el número de machos, que consumirán más recursos alimenticios. Por ello, sería muy conveniente el desarrollar el método propuesto de extraer machos de la cría.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arakawa T, Taniai K, Maeda T. 2018. The mating systems of three species of minute pirate bug, *Orius sauteri*, *O. minutus*, and *O. strigicollis*. The Netherlands Entomological Society *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1-11.
- Balanza V, Mendoza JE, Bielza P. 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. The Netherlands Entomological Society *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167: 626–635, 2019.
- 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* 2020.
- Bonte M, De Clercq P. 2010. Influence of Male Age and Diet on Reproductive Potential of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 103 (4).
- Gromko MH, Newport ME, Kortier MG. 1984. Sperm dependence of female receptivity to remating in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 1237-1282.
- Hardy ICW, Ode PJ, Siva-Jothy M. 2005. Mating Behaviour. In: Jervis M. (Ed.), *Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective*. Springer, pp. 219-260.
- Jones TM, and Edgar MA. 2004. The role of male age sperm age and mating history on fecundity and fertilization success in the hide beetle. *Proc. R. Lond. B Biol.* 271: 1311-1318.
- Lattin JD. 1999. Bionomics of the Anthocoridae. *Annual Review of entomology* 44, 207-231.
- Leon-Beck M, Coll M. 2009. The mating system of the flower bug *Orius laevigatus*. *Biological Control* Volume 50, 199-203.
- Lüpold s, Manier MK, Ala-Honkola O, Belote JM, Pitnick S. 2011. *Male Drosophila melanogaster* adjust ejaculate size based on female mating status, fecundity, and age. *Behavioral Ecology* 22: 184-191(2011).
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. Germany, part of Springer Nature 2020. *Journal of Pest Science*.
- Mendoza JE, Balanza V, Cifuentes D, Bielza P. 2020. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. Elsevier. *Biological control* 148 (2020).
- Musolin DL, K Ito. 2008. Photoperiodic and temperature control of nymphal development and induction of reproductive diapause in two predatory *Orius* bugs: interspecific and geographic differences. *Physiol. Entomol.* 33: 291-301.
- Price DK, and Hansen TF. 1998. How does offspring quality change with age in male *Drosophila melanogaster*? *Behav. Genet.* 28: 395-402.
- Rankin SM, TeBrugge VA, Murray JA, Schuler AM, Tobe SS. 2009. Effects of selected neuropeptides, mating status and castration on male reproductive tract movements and immunolocalization of neuropeptides in earwigs. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152: 83-90.
- Shapiro JP, and Shirk PD. 2010. Ovarian Development in Predacious *Orius pumilo*: Relationship to Diet, Mating, and Juvenile Hormone. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103 (6): 971-978.
- Simmons LW, Kotiaho JS. 2007. The effects of reproduction on courtship, fertility and longevity within and between alternative male mating tactics of the horned beetle, *Onthophagus binodis*. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 488-495.
- Thornhill R, Alcock J. 1983. *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Cambridge.

Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Stockel J. 2002. Delayed mating reduces reproductive output of female European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 92, 241-249.

Vacacela Ajila HE, Michaud JP, Abdelwahab AH, Kuchta SV, Stowe HE. 2019. How Efficient is Fertilization by Traumatic Insemination in *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae)? *Journal of Economic Entomology*, XX(XX), 2019, 1-5.

Van Lenteren JC. 1999. Fundamental knowledge about insect reproduction: essential to develop sustainable pest management. *Invertebrate Reproduction and Development* 36, 1-15.