

Biología de la reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*

Katherine Franco Villamizar

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

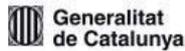
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Biología de la reproducción de los míridos depredadores
Macrolophus pygmaeus y *Nesidiocoris tenuis*

KATHERINE FRANCO VILLAMIZAR

2010



Biología de la reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*

*Memoria presentada para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de
Barcelona*

KATHERINE FRANCO VILLAMIZAR

Barcelona, Septiembre de 2010

Dra. Cristina Castañé
Directora de la tesis
Investigadora Dto. de Entomología
IRTA – Centro de Cabrils

Dra. Marta Goula
Tutora de la tesis
Profesora titular Dto. de Biología Animal
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Biología de la reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*

Katherine Franco Villamizar

Tesis doctoral

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Biología Animal

Programa: Zoología

Bienio: 2005-2007

Este trabajo ha sido realizado en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, en el Centro de Cabrils y ha sido financiado con una Beca pre-doctoral concedida por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias – INIA.

Caratula: Pareja de *N. tenuis* en cópula.

Fotografías tomadas por Katherine Franco, excepto las de la figura 3.2. y la figura 3.5., tomadas por Ana Maria Jauset

*A Mamia, a mis padres y a mis tíos que son como mis padres.
La distancia no ha sido obstáculo para sentir su cariño y apoyo.*

A Juan, a tu lado encontré la tranquilidad.

“Lo que hagas sin esfuerzo y con presteza, durar no puede ni tener belleza”

Plutarco

INTRODUCCIÓN GENERAL	2
El control biológico como sistema de control de plagas	2
Control biológico en cultivos hortícolas en España	4
Características biológicas de <i>M. pygmaeus</i> y <i>N. tenuis</i>	8
Problemática de las dos especies de <i>Macrolophus</i> : <i>M. melanotoma</i> y <i>M. pygmaeus</i>	11
Importancia de profundizar en el conocimiento de su biología reproductora	12
Objetivos	13
Capítulo 1 Estado reproductor de las poblaciones de campo de <i>M. melanotoma</i> y de <i>M. pygmaeus</i>	15
1. Introducción	16
2. Material y Métodos	19
2.1. Recolección de hembras de <i>Macrolophus</i> spp. sobre <i>Dittrichia viscosa</i> , <i>Ononis natrix</i> y <i>Parietaria officinalis</i>	19
2.1.1. Toma de muestras	19
2.2. Evaluación del estado reproductor de las hembras	22
2.2.1. Fertilidad y supervivencia de las hembras en condiciones controladas de temperatura y humedad	22
2.2.2. Supervivencia y estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal de las hembras en condiciones naturales	23
2.3. Análisis de los datos	25
2.3.1. Análisis estadísticos	25
2.3.2. Cálculo en grados día acumulados de la supervivencia de las hembras en la cámara y en el insectario	26
3. Resultados	26
3.1. Características climáticas de la zona de muestreo	26
3.2. Hembras de <i>M. melanotoma</i> recolectadas sobre <i>Dittrichia viscosa</i> y <i>Ononis natrix</i> . Parámetros biológicos en condiciones controladas	28
3.2.1. Supervivencia	29
3.2.2. Fertilidad	30
3.2.3. Correlación entre la supervivencia de las hembras y su fertilidad total	32
3.2.4. Fertilidad de las hembras según las categorías de edades establecidas	34
3.3. Hembras de <i>M. pygmaeus</i> recolectadas sobre <i>Parietaria officinalis</i> . Parámetros biológicos en condiciones controladas y en condiciones ambientales naturales	38
3.3.1. Parámetros biológicos en condiciones controladas	40
3.3.1.1. Supervivencia	40
3.3.1.2. Fertilidad	41
3.3.1.3. Correlación entre la supervivencia de las hembras y su fertilidad total	43
3.3.1.4. Fertilidad de las hembras según las categorías de edades establecidas	45
3.3.2. Parámetros biológicos en condiciones ambientales naturales	50

3.3.2.1. Supervivencia	50
3.3.2.2. Estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal	51
3.3.2.3. Categoría de edades	54
3.3.2.4. Comparación entre las hembras expuestas en condiciones controladas y en condiciones ambientales naturales	56
4. Discusión y Conclusiones	58
4.1. Parámetros biológicos de las hembras de <i>M. melanotoma</i> a 25°C	58
4.2. Parámetros biológicos de las hembras de <i>M. pygmaeus</i>	59
Capítulo 2 Detección del huevo en las hembras del depredador polífago <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Heteroptera: Miridae) por medio de técnicas serológicas	63
1. Introducción	64
2. Material y Métodos	66
2.1. Insectos	66
2.2. SDS-PAGE	67
2.3. Producción de un antisuero policlonal frente a las proteínas del huevo de <i>Macrolophus pygmaeus</i>	67
2.4. Pruebas de detección mediante la técnica ELISA Indirecto	68
2.5. Identificación de las proteínas del huevo mediante Western blotting	71
3. Resultados	72
3.1. Caracterización molecular de las proteínas del huevo	72
3.2. Desarrollo de los ovarios según la edad	72
3.3. ELISA con el antisuero bruto y el agotado	75
3.4. Detección de huevos en hembras de <i>M. pygmaeus</i> recolectadas en campo	76
4. Discusión y Conclusiones	78
Capítulo 3 La monogamia y la poligamia en dos especies de míridos, un enfoque funcional	83
1. Introducción	84
2. Material y Métodos	87
2.1. Comportamiento sexual	87
2.1.1. Número de cópulas sucesivas de hembras y machos en un periodo de 24-48 h	88
2.1.2. Eficacia de una única cópula para la fecundación de todos los óvulos de la hembra	88
2.2. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas de las hembras y los machos	88
2.2.1. Estructuras reproductoras femeninas	88
2.2.1.1. Estado de los espermatozoides en el depósito seminal y en los órganos de almacenamiento	89

2.2.1.2. Vaciado del contenido del depósito seminal	89
2.2.2. Estructuras reproductoras de los machos	90
2.2.2.1. Tamaño de los órganos reproductores masculinos	90
2.2.2.2. Características del esperma	90
2.3. Análisis estadísticos	91
3. Resultados	92
3.1. Comportamiento sexual	92
3.1.1. Número de veces que copularon las hembras y los machos	92
3.1.2. Eficacia de una única cópula para la fecundación de todos los óvulos de la hembra	94
3.2. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas de las hembras y los machos	95
3.2.1. Tamaño de los individuos de las dos especies	95
3.2.2. Estructuras reproductoras de las hembras	95
3.2.2.1. Estado de los espermatozoides en el depósito seminal y en los órganos de almacenamiento	95
3.2.2.2. Vaciado del contenido del depósito seminal	97
3.2.3. Estructuras reproductoras de los machos	98
3.2.3.1. Tamaño de los órganos reproductores masculinos	98
3.2.3.2. Características del esperma	101
4. Discusión y Conclusiones	102
DISCUSIÓN GENERAL	109
CONCLUSIONES GENERALES	115
BIBLIOGRAFÍA	117



Huevo de *M. pygmaeus* emergiendo del tejido vegetal. Nótese el embrión en fase avanzada del desarrollo, ya que se observan los ojos rojos de la ninfa que está a punto de eclosionar.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El control biológico como sistema de control de plagas

El interés por controlar las plagas agrícolas está ligado a la producción en masa de los monocultivos con la finalidad de satisfacer las siempre crecientes necesidades alimenticias de los seres humanos. Esto resulta en una producción que requiere de una constante intervención humana la cual genera inestabilidad en los agroecosistemas y empeoramiento de los problemas de plagas. A partir de los años 30 la principal forma de lucha contra las plagas ha sido la aplicación de productos fitosanitarios (Begon *et al.*, 1990). Su aplicación generalizada durante las siguientes décadas puso de manifiesto toda la problemática asociada a su uso, tanto en relación con su pérdida de eficacia como sus efectos medioambientales y el riesgo para los humanos. Así, se ha observado que las plagas tienen una gran capacidad de adquirir resistencia contra muchas materias activas que se han tornado ineficaces para su control. Como consecuencia de la concienciación hacia la conservación de la naturaleza, así como la de obtener alimentos más saludables, a partir de los años 70 ha habido un aumento considerable en la demanda de productos agrícolas libres de residuos químicos y una producción que sea a la vez respetuosa con el medio ambiente (Boller *et al.*, 2004).

El control integrado de plagas se basa en la aplicación racional de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, culturales y de mejora genética, de modo que el uso de plaguicidas se limite al estrictamente necesario. Dentro del control integrado tiene gran importancia el control biológico como elemento central. El control biológico de plagas es ampliamente utilizado en varios países en diversos cultivos (van Lenteren, 1995; Gerling *et al.*, 2001) entre los que destacan los cultivos hortícolas en invernaderos (Gabarra y Bersi, 1999; Robledo *et al.*, 2009).

El control biológico se define como “la acción de los enemigos naturales (depredadores, parasitoides y entomopatógenos) para mantener la población de otro organismo a

densidades inferiores de las que tendrían en su ausencia” (DeBach, 1964). Existen diversos métodos de control biológico (van Driesche y Bellows, 1996):

1. Clásico: conocido también como importación, está basado en la introducción de agentes exóticos que se importan para el control de una plaga que generalmente es de origen exótico. Una vez introducido el enemigo natural, éste se aclimata y pasa a formar parte de la fauna naturalizada de la región.
2. Inoculativo: en este caso los agentes de control biológico se introducen periódicamente, una o más veces al año, con la finalidad de que se multipliquen en el cultivo de forma que sean sus descendientes quienes acaben controlando la plaga, pero sin establecerse de forma permanente (normalmente ocurre cuando los enemigos naturales no se aclimatan, o lo hacen de forma escasa por una deficiente hibernación, o por un cambio de cultivo como suele suceder en los cultivos protegidos).
3. Inundativo: en esta estrategia la introducción del enemigo natural es masiva pero no persistente y así no es necesario esperar a la aparición de nuevas generaciones para que controlen la plaga. Los microorganismos entomopatógenos constituyen el ejemplo más claro de este tipo de estrategia.
4. Por conservación: consiste en modificar el entorno y manipular el hábitat para favorecer y potenciar la presencia y la actividad de los enemigos naturales presentes en la zona del cultivo (Barbosa, 1998). Se utilizan plantas refugio que proporcionan alimento y/o cobijo a los enemigos naturales durante las épocas desfavorables y que les permiten posteriormente colonizar los cultivos.

La eficacia en la aplicación de estos métodos dependerá en gran medida de las características de cada uno de los enemigos naturales que se utilicen, y de la correcta gestión de dichos métodos. Algunas características que pueden favorecer la eficiencia de los enemigos naturales son, entre otros, la respuesta rápida a incrementos inesperados e imprevisibles de la población plaga, la alta capacidad de dispersión y movilidad, la agregación en las áreas con más presencia de plaga, o la capacidad de sobrevivir a bajas densidades de plaga (Albajes y Alomar, 1999; Gerling *et al.*, 2001).

Control biológico en cultivos hortícolas en España

En España el método clásico se ha utilizado mayoritariamente en cítricos, frutales, olivar y vid. En 1922 se introdujeron en España con gran éxito el depredador *Rodolia cardinalis* Mulsant y el parasitoide *Cryptochetum iceryae* Wiliston para el control de la cochinilla acanalada de los cítricos *Icerya purchasi* Maskell, siguiendo el éxito obtenido en California (EEUU) con estos enemigos naturales. Otro éxito importante se dio en la década de los 70 con la introducción de *Cales noaki* Howard parasitoide de la mosca blanca de los cítricos *Aleurothixus floccosus* Maskell (Jacas *et al.*, 2006). Sin embargo, la urgencia con que generalmente se ponen en marcha estos programas ha hecho que algunos de estos enemigos naturales introducidos no se hayan evaluado convenientemente, y como consecuencia algunas introducciones hayan provocado efectos no deseados (Lynch y Thomas, 2000). Así, en el caso de los cultivos hortícolas la introducción accidental del parasitoide exótico *Encarsia pergandiella* Howard en la década de los 70 ha representado un problema. Este agente se naturalizó en el área Mediterránea, interfiriendo con el buen control de la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, que ejercía *Encarsia formosa* Gaham, parasitoide también exótico que se inoculaba periódicamente en los invernaderos (Gabarra *et al.*, 1999). Así pues, este método de control biológico tiene bastantes riesgos a largo plazo. La aclimatación de algunos agentes exóticos puede alterar definitivamente el ecosistema agrario, llevando al desplazamiento de especies endémicas con la consecuente disminución de la biodiversidad o la transmisión de enfermedades.

En las últimas décadas, la mayor exigencia de los consumidores por productos sin residuos de fitosanitarios y la disminución en el uso de plaguicidas debido a diversas causas, ha impulsado la aplicación de estrategias de control basadas en la suelta de enemigos naturales. Esto ha sido así especialmente en el caso de los cultivos hortícolas protegidos, en los que se ha incrementado de forma masiva la superficie de aplicación de estos métodos en los últimos años. En España, los cultivos protegidos o al aire libre integran en muchas ocasiones diferentes métodos de control biológico, combinando las inoculaciones de enemigos naturales con su posterior conservación, o bien con la aplicación inundativa de microorganismos entomopatógenos.

Los cultivos hortícolas protegidos más importantes en España son:

1. **Tomate.** Es un cultivo de gran importancia económica. La producción de tomate para consumo en fresco es muy intensiva, siendo la provincia de Almería la que presenta la mayor superficie de cultivo en invernadero (8500 ha), seguido de Murcia (3000 ha) y del Nordeste Español. En estas últimas zonas también se produce tomate al aire libre para consumo en fresco (119 ha) (MAPA, 2008). Las plagas más importantes de este cultivo son las moscas blancas, predominando en el Norte *Trialeurodes vaporariorum* y en el Sur *Bemisia tabaci* Gennadius. Además de las elevadas poblaciones que desarrollan en los cultivos, *B. tabaci* es vector del virus de la cuchara o TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) una grave enfermedad que limita en gran medida la producción de tomate (Gabarra *et al.*, 2008). Recientemente ha aparecido una nueva plaga proveniente de SudAmérica, la polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick, que es un grave problema en este cultivo. Los enemigos naturales más importantes para el control de las moscas blancas son los parasitoides *Eretmocerus mundus* Mercet y *Encarsia formosa*, y los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* Rambur y *Nesidiocoris tenuis* Reuter. Estos depredadores son también importantes para el control de la araña roja, los pulgones, los trips (Alomar, 1994; Castañé *et al.*, 2000; Alomar *et al.*, 2006; Gabarra *et al.*, 2006) así como de *T. absoluta* (Arnó *et al.*, 2010). La aplicación del control biológico en este cultivo está limitado en la zona de Almería por la presencia del virus de la cuchara y se aplica en un 25% de la superficie (van der Bloom *et al.*, 2009). En el Nordeste se aplica en una gran parte de la superficie cubierta pero no se conoce con exactitud el porcentaje de la superficie.

2. **Pimiento.** Es también un cultivo de importancia económica, con unas 1700 ha en Murcia y unas 7500 ha en Almería de producción en invernadero. La plaga más importante de este cultivo es el trips, *Frankliniella occidentalis* Pergande, tanto por las altas poblaciones que alcanzan como por la transmisión del virus del bronceado del tomate TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus). También las moscas blancas son plagas importantes de este cultivo. Los enemigos naturales más importantes para el control de trips son los depredadores antocóridos *Orius laevigatus* Fieber y *Orius albidipennis* Reuter, y el ácaro *Amblyseius swirskii* Athias-Hentiot. Para el control de moscas blancas se utilizan el parasitoide *E.mundus*, el mírido *N. tenuis* y el ácaro *A. swiskii* (van der Blom, 2008). El mayor éxito en cuanto a superficie tratada con control biológico se ha alcanzado en este cultivo. Los primeros éxitos a gran escala se obtuvieron en el año 2005 en el Campo de

Cartagena (Murcia), en un área de 1700 ha, donde se aplicó el control biológico en la gran mayoría de los invernaderos de pimiento (90%) (Sanchez *et al.*, 1997; Sanchez y Lacasa, 2006). Más recientemente, en la provincia de Almería se están utilizando enemigos naturales en la totalidad de su superficie (7500 ha) (van der Blom, 2008; van der Blom *et al.*, 2009). Cabe destacar que este programa ha mostrado que el control con enemigos naturales puede ser eficaz incluso en el caso de insectos transmisores de virus.

3. **Cucurbitáceas:** Dentro del grupo de las cucurbitáceas los cultivos que se destacan por su interés económico son el melón, la sandía, el pepino y el calabacín, los cuales suponen un 30% de la superficie agrícola cultivada bajo abrigo en España. Las principales plagas que afectan a estos cultivos son las moscas blancas *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, y el trips *F. occidentalis*, que además de alcanzar poblaciones muy elevadas son vectores de diversos virus que afectan a estos cultivos. Los agentes biológicos más importantes son el parasitoide *E. mundus*, el ácaro *A. swirskii*, el antocórido *O. laevigatus* y los míridos *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. El control biológico de plagas en cucurbitáceas ha aumentado en la última década de forma importante, y así, en el año 2008-2009, se liberaron enemigos naturales en un total de unas 9100 ha (Calvo y Belda, 2008).

Con base en los datos de Robledo *et al.* (2009), se ha elaborado una tabla que incluye las principales plagas y los enemigos naturales que se utilizan en los cultivos hortícolas en invernadero en España (**Tabla 1**).

En cuanto al método de control biológico por conservación, hace falta mucha investigación básica para poder desarrollar estrategias acertadas. Hay que profundizar en el conocimiento del funcionamiento de los ecosistemas agrícolas y en la interrelación de los diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, que pueden incidir en la conservación de especies beneficiosas. Hay por tanto pocos ejemplos de programas de control biológico por conservación, pero en hortícolas se destaca su aplicación desde los 90 en Cataluña sobre cultivos de tomate al aire libre basado en la conservación de las poblaciones de míridos depredadores (Alomar *et al.*, 2002). *M. pygmaeus* es la especie que mayoritariamente coloniza estos cultivos, pero cada vez con más frecuencia se hallan

poblaciones de *N. tenuis* (Arnó *et al.*, 2006a). Estos depredadores mantienen bajo control a las principales plagas del cultivo.

Tabla 1. Principales plagas que afectan a los cultivos hortícolas en invernadero en España y los respectivos enemigos naturales utilizados

Plaga	Enemigo Natural
Moscas blancas: <i>Trialeurodes vaporariorum</i> <i>Bemisia tabaci</i>	Parasitoides: <i>Encarsia formosa</i> , <i>Eretmocerus mundus</i> Depredadores: <i>Nesidiocoris tenuis</i> , <i>Macrolophus pygmaeus</i> , <i>Amblyseius swirskii</i> Hongos entomopatógenos: <i>Beauveria bassiana</i> Vuill, <i>Verticillium lecanii</i> Zimmerman
Trips: <i>Thrips tabaci</i> Lindeman <i>Frankliniella occidentalis</i>	Depredadores: <i>Orius laevigatus</i> , <i>Orius albidipenis</i> , <i>N. tenuis</i> , <i>M. pygmaeus</i> , <i>A. swirskii</i>
Pulgones: <i>Aphis gossypii</i> Glover <i>Myzus persicae</i> Sulzer	Parasitoides: <i>Aphidius colemani</i> Viereck <i>Lysiphlebus testaceipes</i> Cresson <i>Aphidoletes aphidimyza</i> Rondani Depredadores: <i>Coccinella septempunctata</i> L <i>Adalia bipunctata</i> L, <i>Chrysoperla carnea</i> Stephens, <i>N. tenuis</i> , <i>M. pygmaeus</i>
Araña roja: <i>Tetranychus urticae</i> Koch <i>T. turkestanii</i> Ugarov y Nikolski <i>T. ludeni</i> Zacher <i>T. evansi</i> Baker y Pritchard	Depredadores: <i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Hentiot <i>Amblyseius californicus</i> McGregor <i>Feltiella acarisuga</i> Vallot <i>N. tenuis</i> , <i>M. pygmaeus</i>
Ácaro del bronceado: <i>Aculops lycopersici</i> Masse	Depredador: <i>Amblyseius andersoni</i> Chant
Araña blanca de los invernaderos: <i>Polyphagotarsonemus latus</i> Banks	Depredadores: <i>Amblyseius cucumeris</i> Oudemans <i>A. swirskii</i> , <i>A. californicus</i>
Minador de las hojas: <i>Liriomyza bryoniae</i> Kaltenbach <i>L. trifolii</i> Burgess	Parasitoides: <i>Diglyphus isaea</i> Walker <i>Neochrysocharis formosa</i> Westwood Depredadores: <i>Coenosia attenuata</i> Stein, <i>M. pygmaeus</i> , <i>N. tenuis</i>
Lepidópteros: <i>Spodoptera exigua</i> Hüber <i>Helicoverpa armigera</i> Hüber <i>Tuta absoluta</i>	Parasitoide: <i>Trichogramma achaeae</i> Nagaraja y Nagarkatti Depredadores: <i>Nabis pseudoferus ibericus</i> Remane, <i>O. laevigatus</i> , <i>N. tenuis</i> , <i>M. pygmaeus</i> , <i>C. carnea</i> Insecticida microbiológico: <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner

Características biológicas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis*

La importancia de estos dos depredadores en los programas de control biológico de plagas en cultivos hortícolas en la región Mediterránea se fundamenta principalmente en el hecho de que son especies nativas con gran eficacia como depredadores de un amplio rango de huéspedes (áfidos, aleurodidos, ácaros, trips, huevos y larvas de lepidópteros y coleópteros, etc.). Sin embargo, tienen un régimen alimenticio mixto, zoófago y fitófago, que representan un cierto riesgo de dañar el cultivo, factores que se deben tener en cuenta. Por lo general, la alimentación vegetal aumenta cuando la densidad de presa disminuye y en esto se ha basado la elaboración una carta de decisión para el manejo de poblaciones de la especie *Dicyphus tamaninii* Wagner en tomate de exterior (Alomar y Albajes, 1996). En el caso de *M. pygmaeus* no se han detectado consecuencias negativas importantes en los cultivos. En cambio, el papel zoofitófago de *N. tenuis* es controvertido, ya que si escasea la presa puede llegar a ocasionar daños considerables en el cultivo del tomate (Urbaneja *et al.*, 2005a; Arnó *et al.*, 2006b; Calvo *et al.*, 2008; Sanchez y Lacasa, 2008; Arnó *et al.*, 2010).

Los adultos de *M. pygmaeus* son de tonos amarillentos o verdosos tanto dorsal como ventralmente; la cabeza vista dorsalmente es de silueta casi pentagonal, y es típica del género la presencia de sendas bandas negras longitudinales, más o menos anchas, entre el ojo y el margen anterior del pronoto; el resto de la cabeza es claro (Goula y Alomar, 1994). Las dimensiones medias de los adultos son de entre 3-4 mm de longitud. Los adultos de *N. tenuis* son muy parecidos a los de *M. pygmaeus*, con una coloración también amarilla o verdosa aunque algo más oscura; sin embargo, la cabeza presenta una silueta ovalada y no pentagonal, y carece de bandas longitudinales por detrás de los ojos. Esta especie mide también entre 3 y 4 mm de longitud (Goula y Alomar, 1994). En la figura 1 A, B, podemos ver el aspecto general de las hembras de ambas especies.

El desarrollo de estas especies así como el de todas las pertenecientes al orden Heteróptera es hemimetábolo, comprendiendo 5 estadios ninfales con hábitos alimenticios semejantes a los de los adultos. Los huevos son depositados por las hembras dentro del

tejido vegetal, preferiblemente en los pecíolos o en los nervios foliares de la planta huésped. Identificar estos huevos es difícil y tedioso y lo único que se aprecia es la lígula - apéndice respiratorio que sobresale del tejido vegetal (**Fig. 2A**). Los huevos de *M. pygmaeus* tienen una forma encorvada con aspecto de saco y miden 0,24 mm de diámetro y 0,97 mm de longitud (Constant *et al.*, 1994).

Como es común en los insectos, la duración del ciclo biológico y la supervivencia de estas especies están influenciadas por la calidad de presa que consumen, la planta huésped y sobre todo por la temperatura ambiente. El desarrollo embrionario de *M. pygmaeus* dura unos 11 días y el desarrollo ninfal unos 18 días a una temperatura de 25°C y alimentados con huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Castañé y Zapata, 2005); el umbral térmico inferior del desarrollo está calculado en 7,2°C (Hart *et al.*, 2002). El periodo de preoviposición oscila entre 4 y 6 días y la fecundidad puede oscilar entre 1 y 7 huevos por hembra por día durante la mayor parte de su vida. Pueden llegar a tener una longevidad entre 26 y 80 días según la presa ingerida y la temperatura ambiental (Vandekerkhove *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 1999; Constant *et al.*, 1996; Castañé y Zapata, 2005; Fauvel *et al.*, 1987).

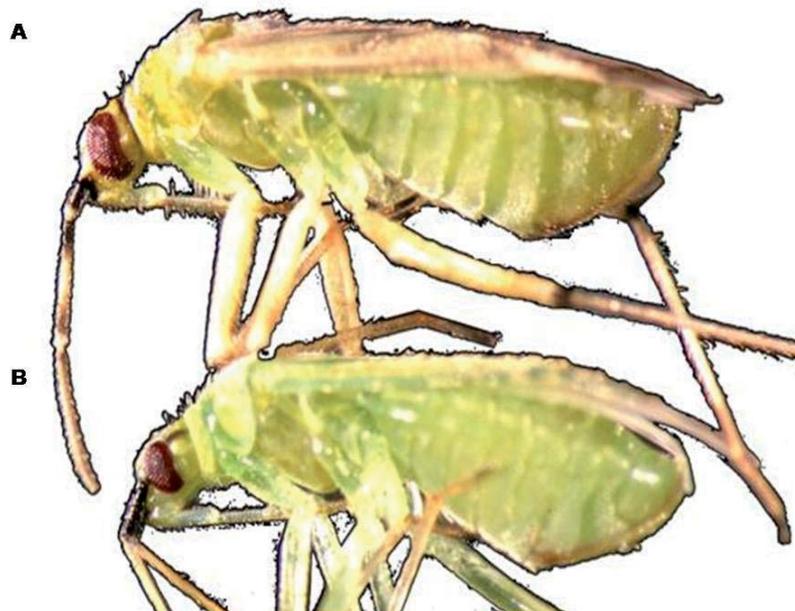


Figura 1. Hembras de 7 días de edad. **A)** *Nesidiocoris tenuis*, **B)** *Macrolophus pygmaeus*.

Introducción General

En el caso de *N. tenuis* el periodo de desarrollo embrionario a 25°C es de 8,9 días y el desarrollo ninfal de 12,9 días (Sanchez *et al.*, 2009). El umbral térmico del desarrollo es de 10,3°C (Sanchez *et al.*, 2009). El periodo de preoviposición de las hembras oscila entre 3 y 7 días de edad (El-Dessouki *et al.*, 1976) y la fecundidad entre 1 y 4,6 huevos por hembra por día, llegando a vivir entre 16 y 25 días (Torreno y Magallona, 1994; Calvo y Urbaneja, 2003). En la figura 2 podemos ver el aspecto de los huevos, las ninfas, los machos y las hembras de *M. pygmaeus*, siendo el aspecto general muy similar para los estadios del desarrollo de *N. tenuis*.

El comportamiento de cortejo en míridos puede llegar a ser relativamente elaborado según las especies; sin embargo, la posición de la copula es similar en muchas especies debido a la configuración asimétrica de los machos. Estos tienen el parámero izquierdo más largo, por lo que la copula se realiza por el lado derecho de la hembra y una vez la pareja esta acoplada el macho se gira 180° (Wheeler, 2001).

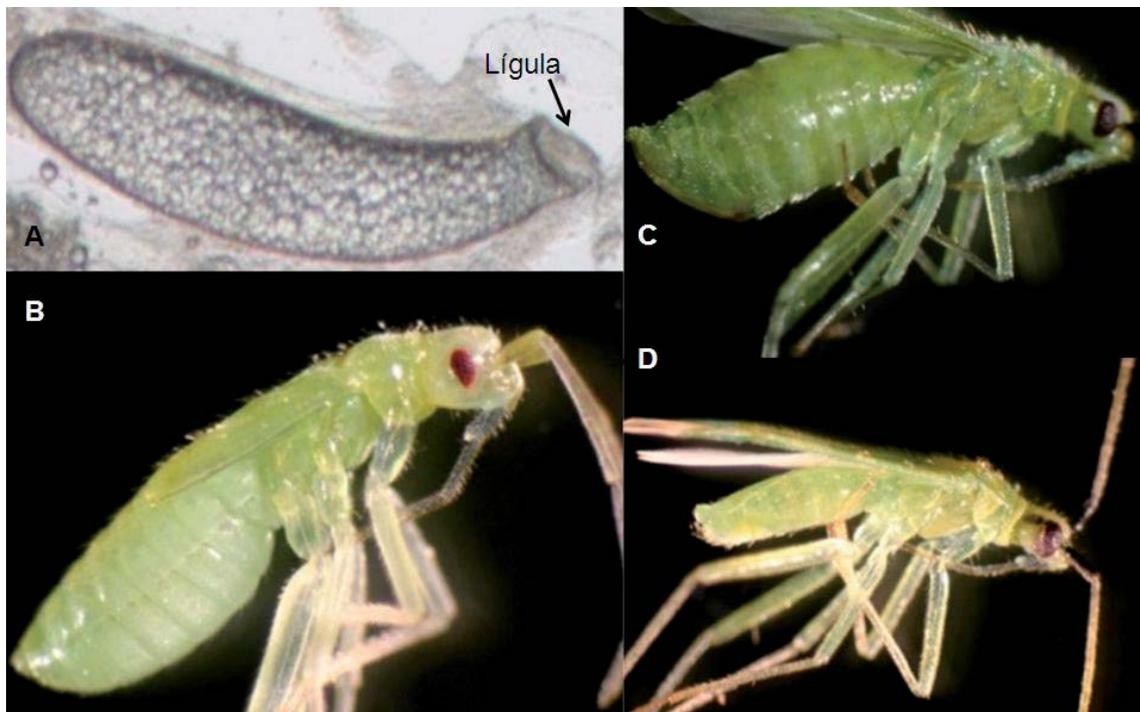


Figura 2. Diferentes estadios de *Macrolophus pygmaeus*. **A)** Huevo corionado extraído de los ovarios de una hembra adulta, **B)** ninfa de quinto estadio, **C)** hembra de 7 días de edad, **D)** macho de 7 días de edad.

El comportamiento reproductor de *M. pygmaeus* ha sido descrito por Gemeno *et al.* (2007): el período de apareamiento es más intenso en la noche, las hembras no aceptan con facilidad al macho para la copula y ésta es de corta duración (<4 min). Los autores también citan que después de una primera copula las hembras no aceptan una nueva copula al menos durante 3 semanas aunque los machos sí pueden acoplarse varias veces. Este comportamiento monándrio de las hembras es poco común entre los míridos. En el caso de *N. tenuis* el comportamiento reproductor no ha sido estudiado y sólo se mencionan algunas observaciones por El-Dessouki *et al.* (1976): el período de apareamiento puede ser tanto diurno como nocturno y las hembras parecen aceptar fácilmente al macho para la copula. Además, la duración de la copula es larga (> 2h) y una vez finalizada la primera copula, tanto las hembras como los machos son capaces de acoplarse varias veces.

Problemática de las dos especies de *Macrolophus*: *M. melanotoma* y *M. pygmaeus*

Recientemente ha surgido la polémica de si hay una o dos especies de *Macrolophus* en nuestros cultivos de tomate. Aunque en la cuenca mediterránea está descrita la presencia de dos especies, *Macrolophus melanotoma* Costa y *Macrolophus pygmaeus*, su separación es difícil, debido a su extremo parecido. Los datos biométricos revelan que hay un solapamiento de los valores considerados como válidos para la distinción de ambas especies (Goula y Alomar, 1994) y los autores hablan del complejo *M. pygmaeus/M. melanotoma*. Sin embargo más recientemente, se han descrito algunas diferencias morfológicas y moleculares en los trabajos de Perdakis *et al.* (2003) y Martínez-Cascales *et al.* (2006) donde se indica que la especie que se encuentra sobre los cultivos de tomate corresponde a *Macrolophus pygmaeus*, y que las poblaciones que habitan sobre plantas de *Dittrichia viscosa* L. Greuter son mayoritariamente de *M. melanotoma*. Además se han descrito problemas de colonización del cultivo del tomate por parte de las poblaciones de *M. melanotoma* provenientes de *D. viscosa* (Bas *et al.*, 2001) sin embargo, la instalación mejoraba cuando las poblaciones procedían de tabaco o tomate (Alomar *et al.*, 2002). Parece que los estudios publicados en las últimas décadas, que reportan a *M. melanotoma* como enemigo natural de plagas sobre tomate y otras hortícolas, estarían realmente refiriéndose a *M. pygmaeus*. Actualmente las empresas que

comercializan fauna útil siguen nombrando a la especie que se libera en tomate como *M. caliginosus* (= *M. melanotoma*), cuando en realidad debería llamarse *M. pygmaeus*. También muchos usuarios del control biológico y mucha divulgación científica siguen utilizando el término *M. caliginosus* lo que lleva a confusión (Castañé *et al.*, 2008). En la actualidad hay trabajos en curso con el objeto de clarificar la identificación de estas especies.

Importancia de profundizar en el conocimiento de su biología reproductora

Aunque tanto *M. pygmaeus* como *N. tenuis* se utilizan ampliamente en el control biológico de moscas blancas en cultivos hortícolas en España, hay aspectos biológicos y ecológicos que los caracterizan como agentes de control que no son bien conocidos, especialmente de la segunda especie. En el caso de *M. pygmaeus* hay varios trabajos relacionados con su biología como depredador. Por ejemplo se ha estudiado su respuesta funcional y tablas de vida con diversas presas (Alvarado *et al.*, 1997; Riudavets y Castañé, 1998; Hansen *et al.*, 1999; Montserrat *et al.*, 2000), y se han propuesto dietas alternativas para mejorar la producción comercial (Castañé y Zapata, 2005; Castañé *et al.*, 2006). Se han realizado estudios de colonización de las poblaciones de *M. pygmaeus* hacia cultivos hortícolas (Arnó *et al.*, 2000; Alomar *et al.*, 2002; Alomar y Albajes, 2003; Castañé *et al.*, 2004; Gabarra *et al.*, 2004; Arnó *et al.*, 2005). Aunque estos estudios han contribuido a entender la biología de esta especie y a mejorar su manejo, aún se presentan problemas en el establecimiento de las poblaciones en algunos ciclos de los cultivos sin que se sepan las causas. Respecto a *N. tenuis*, poco se ha estudiado sobre su biología. Se sabe que es un eficiente consumidor de moscas blancas y que puede desarrollarse a distintas temperaturas constantes (Urbaneja *et al.* 2005b; Sanchez *et al.* 2009). Sin embargo la mayoría de estudios que hay están relacionados con la evaluación del impacto negativo que este insecto puede tener sobre la planta huésped cuando sus poblaciones alcanzan densidades muy elevadas (Sanchez, 2008; Sanchez y Lacasa, 2008; Arnó *et al.*, 2010).

Con respecto a la reproducción de estos depredadores se han hecho algunos estudios sobre el comportamiento sexual y la reproducción de *M. pygmaeus* (Castañé *et al.*, 2007; Gemeno *et al.*, 2007), pero muy poco se sabe sobre este aspecto de *N. tenuis*. El conocimiento más amplio del comportamiento reproductor de estos insectos puede incidir en la mejora de su producción masiva comercial, el manejo de las introducciones inoculativas comerciales, así como el manejo de sus poblaciones naturales en los programas de control biológico por conservación.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la biología reproductora de dos especies de míridos, *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*, que se están utilizando extensamente en el control biológico de plagas en cultivos hortícolas.

El objetivo del primer capítulo es evaluar el estado reproductor de las hembras de *M. melanotoma* / *M. pygmaeus* procedentes de poblaciones naturales a lo largo del año con el objeto de determinar si presentan o no una parada invernal que afecte a su capacidad de instalación en los cultivos.

El objetivo del segundo capítulo es desarrollar un anticuerpo policlonal que permita detectar la presencia de huevos en las hembras de *M. pygmaeus* como una medida aproximada de su fecundidad.

El objetivo del tercer capítulo es evaluar las adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento relacionadas con las dos estrategias reproductoras que presentan *M. pygmaeus* (monógama) y *N. tenuis* (polígama).

Capítulo 1

Estado reproductor de las poblaciones de campo de *M. melanotoma* y de *M. pygmaeus*

Ovario de *M. pygmaeus* con diferentes tipos de oocitos en cada uno de sus ovariolos. En la parte superior de cada ovariole se encuentra el *vitellarium*. En los dos oocitos coronados (tipo α) se aprecia la lígula. En los otros dos ovariolos se observan oocitos vitelogénicos (tipo β), mientras que en los tres restantes solo se aprecia el *vitellarium*. Clasificación de los ovarios según Ma y Ramaswamy (1987).

1. INTRODUCCIÓN

El paisaje agrícola del litoral Catalán se caracteriza principalmente por la presencia de cultivos hortícolas que se alternan con superficies no cultivadas. Los cultivos al aire libre coexisten con los de invernaderos, siendo estas estructuras semi-abiertas cubiertas de plástico, que permiten el intercambio de insectos, ya sean plagas o enemigos naturales, entre los cultivos y las plantas circundantes. Estas superficies no cultivadas incluyen la vegetación de los bordes de los campos, los bosques adyacentes y la vegetación ornamental, como parques públicos y jardines privados (Alomar *et al.*, 2002). Las plantas no cultivadas son un componente importante para la diversidad de artrópodos dentro del agroecosistema, mientras haya variedad y abundancia de plantas mayor será la diversidad de organismos benéficos (depredadores, parasitoides y hongos entomopatógenos) (Landis *et al.*, 2000; Altieri y Nicholls, 2004). Esta flora actúa como refugio, fuente de alimento (polen, néctar, presas) o soporte para la reproducción de estos organismos (Letourneau, 1998; Landis *et al.*, 2000).

A finales de los años 70 el uso intensivo de insecticidas en cultivos hortícolas del litoral catalán provocó un grave problema de plagas, tales como las moscas blancas, debido a que se volvieron resistentes a las materias activas más utilizadas. Se buscaron entonces nuevas alternativas de control al uso de insecticidas, y para ello se estudió la fauna auxiliar que aparecía cuando se reducían drásticamente los tratamientos plaguicidas de amplio espectro. Como resultado, se observó la colonización espontánea de los cultivos de tomate, tanto en invernadero como de aire libre, por dos especies de míridos depredadores, *Dicyphus tamaninii* Wagner y *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Gabarra *et al.* 1988; Alomar *et al.*, 1991; Gabarra *et al.*, 2004; Castañé *et al.*, 2004), que eran capaces de controlar las poblaciones de mosca blanca, la plaga principal del cultivo. Estos depredadores polípagos se alimentan además de un amplio abanico de presas entre las que se encuentran muchas de las plagas presentes en los cultivos hortícolas (Alvarado *et al.*, 1997; Barnadas *et al.*, 1998; Montserrat *et al.*, 2000). Por ello son depredadores importantes que se utilizan en programas de control biológico de plagas, tanto inoculativos como por conservación, ya que se hallan ampliamente distribuidos a lo largo

de la región Mediterránea española. Aunque *D. tamaninii* era muy abundante en los años 80 y 90, sus poblaciones fueron desapareciendo paulatinamente y ha sido sustituido mayoritariamente por *Macrolophus pygmaeus* Rambur.

A lo largo del año *M. pygmaeus* está presente sobre diferentes cultivos, tanto de aire libre como en invernadero, y también se encuentran sobre diversas especies de vegetación no cultivada (Alomar, 1994). La flora espontánea actúa como refugio de las poblaciones que colonizan los cultivos como el tomate, tabaco, pimiento, calabaza, berenjena, pepino o calabacín en los meses de primavera, verano y otoño (Alomar y Albajes, 2003; Arnó *et al.*, 2000). *Dittrichia viscosa* L. es una de las especies más abundante y sobre ella se han hallado poblaciones de adultos y ninfas de *M. melanotoma* durante casi todo el año. Estas poblaciones son especialmente numerosas en los meses de Mayo y Junio, decaen a partir del mes de Julio y durante los meses de Septiembre a Marzo (otoño a invierno) las poblaciones son muy bajas (Alomar *et al.*, 1994; Vila, 2004). Las poblaciones del depredador están estrechamente relacionadas con la fenología de la planta, ya que esta se mantiene verde de Febrero a Agosto y florece al final del verano. Después de la floración se seca, pasando así el invierno (Vila, 2004). Asimismo se han encontrado poblaciones abundantes de *Macrolophus* spp. sobre otras especies de plantas no cultivadas como son *Ononis natrix* L. y *Parietaria officinalis* L., entre otros muchos huéspedes (Alomar, 1994; Vila, 2004).

En los cultivos de tomate de primavera y de verano la regulación de las poblaciones de mosca blanca por *M. pygmaeus* es adecuada, y tanto las colonizaciones espontáneas como las inoculaciones comerciales del depredador resultan en un buen control de la plaga. Sin embargo, estos depredadores no parecen ser capaces de frenar el desarrollo de la plaga en los cultivos de otoño y de invierno que se hacen en invernadero sin calefacción, ya que los programas de control biológico fallan en este ciclo de cultivo. Una posible causa de estos fallos podría ser que estos insectos no estuvieran reproductivamente activos durante este período, es decir, que sufrieran una diapausa invernal o bien una quiescencia. La diapausa es un estado predeterminado genéticamente de baja actividad metabólica de los individuos, que está controlado por factores ambientales. Es un mecanismo adaptativo de dormancia para periodos de condiciones ambientales desfavorables. La quiescencia es

una respuesta directa a las condiciones físicas deletéreas y que finaliza en cuanto estas condiciones mejoran (Beck, 1980). Se hace por tanto necesario conocer cuál es la biología reproductora de estos depredadores durante el otoño e invierno para poder determinar su posible limitación como agentes de control de plagas en esos ciclos del cultivo del tomate.

El objetivo de este estudio es evaluar el estado reproductor de las hembras de *M. melanotoma*/*M. pygmaeus* procedentes de poblaciones naturales a lo largo del año con el objeto de determinar si presentan o no una parada invernal que afecte a su capacidad de instalación en los cultivos.

Con el fin de evaluar el estado reproductor de las hembras del depredador se recogieron individuos de campo sobre algunas especies de plantas no cultivadas a lo largo de todo el año. Aunque inicialmente se recolectaron hembras sobre *D. viscosa* y *O. natrix*, posteriormente se llegó a la conclusión de que las poblaciones que se encontraban sobre estas plantas eran de *M. melanotoma*, especie que no se encuentra sobre cultivos de tomate. A partir del año 2007 se iniciaron muestreos sobre la vegetación ruderal de la finca Can Tutò (Arenys de Mar), productora de tomate en invernaderos semi-abiertos y en aire libre. Los cultivos de esta finca se llevan con un programa de control integrado de plagas basado en la colonización espontánea del cultivo por poblaciones de *M. pygmaeus*. Estas poblaciones provienen principalmente de las comunidades de *Parietaria officinalis* que son muy abundantes en la zona (comunicación personal de J. Ariño, técnico de la Asociación de Defensa Vegetal a la que pertenece la finca).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Recolección de hembras de *Macrolophus* spp. sobre *Dittrichia viscosa*, *Ononis natrix* y *Parietaria officinalis*

2.1.1. Toma de muestras

Los muestreos sobre *D. viscosa* y *O. natrix* se realizaron en una finca experimental localizada en las instalaciones del IRTA, el cual se encuentra localizado en la población de Cabrils (altitud 82 msnm, latitud 41,518°, longitud 2,378°) en la comarca de El Maresme y los individuos fueron procesados en el Departamento de Entomología. En la parcela se sembraron grupos de plantas de *D. viscosa* y *O. natrix*, las cuales se separaban entre sí 2 m aproximadamente en una parcela de 40 x 40 m. Los muestreos se iniciaron a mediados de Marzo de 2006 y prosiguieron hasta Noviembre del mismo año, y en cada uno se procesaron aproximadamente entre 50 y 100 plantas (**Fig. 1.1**). Durante los meses de primavera y otoño las plantas se mantuvieron en buen estado con abundante vegetación, pero durante los meses de verano e invierno las plantas estaban en peor estado y algunas se secaron.

Los muestreos sobre *P. officinalis* se realizaron en la finca comercial de tomate Can Tutò en Arenys de Mar (altitud 10 msnm, latitud 41,345, longitud 2,33°), la cual estaba inscrita en la Asociación de Defensa Vegetal del Alt Maresme (ADV-Selmar) y recibía asesoramiento técnico para aplicar en sus cultivos control biológico de plagas. Las plantas de *P. officinalis* bordeaban los invernaderos y eran abundantes en los caminos adyacentes (**Fig. 1.2**). Los muestreos sobre estas plantas se realizaron desde Enero de 2007 hasta Abril de 2009, en una franja aproximada de 100 a 200 m de longitud y en cada uno se procesaron aproximadamente entre 50 y 100 plantas. Las plantas se mantuvieron en buen estado durante los meses de primavera, otoño e invierno, mientras que en el verano algunas plantas se secaron y perdieron todas sus hojas.



Figura 1.1. Plantas de *D. viscosa* (izquierda) y *O. natrix* (derecha) en una parcela experimental de 40 x 40 m situada en las instalaciones del IRTA, en Cabrils.



Figura 1.2. Finca Can Tutò (Arenys de Mar). Invernaderos de tomate y plantas de *P. officinalis* rodeando el invernadero y en los caminos adyacentes.



Figura 1.3. Materiales utilizados en los muestreos de hembras de *Macrolophus* spp.: planta de *D. viscosa*, bandeja plástica y aspirador de boca.

Todos los muestreos, tanto los realizados sobre *D. viscosa* y *O. natrix* como los realizados sobre *P. officinalis*, se hicieron con una periodicidad de 3 semanas. El método de muestreo consistió en golpear suavemente las plantas sobre una bandeja plástica blanca (15 x 30 cm), puesto que estos insectos se dejan caer al ser molestados, y por medio de un aspirador de boca atrapar a las hembras despreciando machos y ninfas. (**Fig. 1.3**).

El tiempo de recolección de las hembras fue aproximadamente de 1 a 2 horas por muestreo. El tiempo y la facilidad de recolección variaron según la abundancia de individuos encontrada en las plantas, que se relacionó con la calidad de las plantas que a su vez variaba según las estaciones del año. En plantas con poca superficie foliar o cubiertas de polvo fue difícil encontrar individuos. Se recolectaron cerca de 40 hembras por muestreo de las cuales se escogieron las 20 “mejores”, es decir, hembras que no tuvieran las alas rotas, las patas incompletas, ni mostraran signos de enfermedad. Estas hembras fueron utilizadas para evaluar su fertilidad y supervivencia. Las hembras restantes fueron individualizadas en eppendorfs® y congeladas a -20°C para posteriormente evaluar el estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal.

2.2. Evaluación del estado reproductor de las hembras

2.2.1. Fertilidad y supervivencia de las hembras en condiciones controladas de temperatura y humedad

Las condiciones de la cámara fueron $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ HR y 16h Luz : 8h Oscuridad. Para evaluar la fertilidad de las hembras traídas del campo se les ofrecieron discos de hoja de tabaco (5 cm de diámetro) que incluían un nervio foliar ya que es ahí donde depositan los huevos. Estos discos de hoja se colocaron en cajas de plástico que contenían una solución de agar al 0,5% con el objeto de mantenerlos en buen estado durante dos-tres semanas. Las plantas de tabaco de las que se sacaban los discos procedían de un plantel propio que se mantenía en el invernadero libre de posibles presas. (Fig. 1.4 A, B). Además del disco de hoja de tabaco, a cada hembra se le proporcionaron huevos del lepidóptero *Ephestia kuehniella* como presa. Cada 3-4 días las hembras se cambiaban a una nueva caja hasta que morían.

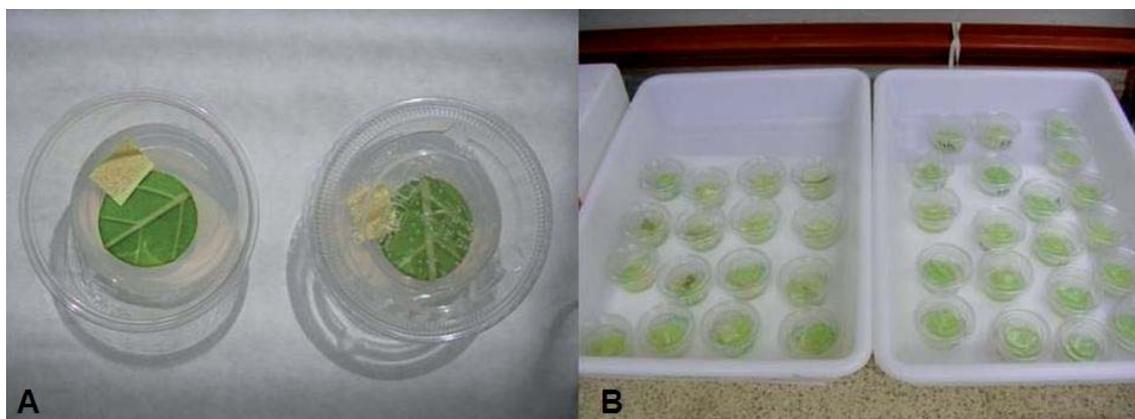


Figura 1.4. A) Cajas de ovoposición con un disco de hoja de tabaco con nerviación dispuesto sobre una capa de agar al 0,5%; se incluye una tira adhesiva con huevos de *E. kuehniella* como presa. B) Disposición de las cajas en la cámara de condiciones controladas.

Las cajas de ovoposición se mantuvieron en la cámara de temperatura controlada hasta que empezaron a eclosionar las ninfas, unos 10 días después de haber retirado la hembra de la caja. El conteo de ninfas se prolongó durante unos 10 días más, tras los cuales se comprobó que ya hubieran eclosionado todos los huevos. Se contabilizó también el número de días que las hembras sobrevivieron, desde el día en que se recolectaron en el

campo hasta que murieron. En total se evaluaron entre 10 y 20 hembras por cada fecha de muestreo.

2.2.2. Supervivencia y estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal de las hembras en condiciones naturales

Para la evaluación de la supervivencia de las hembras en condiciones naturales se utilizó la misma metodología de discos de hoja de tabaco que se explico en el apartado anterior, pero en este caso las cajas de ovoposición se mantuvieron en un insectario. Esta es una estructura techada construida con laminas de madera que dejan un espacio entre cada una para facilitar la ventilación y mantener la temperatura y humedad lo más parecido posible a la del ambiente (**Fig. 1.5**). El insectario simula las condiciones ambientales que las hembras encuentran en el campo pero sin la radiación solar directa ni la precipitación.



Figura 1.5. Insectario. Estructura techada construida con láminas de madera que simula las condiciones ambientales del campo pero sin la radiación solar directa ni la precipitación.

Inicialmente se prepararon cajas con agar y discos de hoja de tabaco para evaluar la fertilidad de las hembras en condiciones ambientales naturales, pero abandonamos este procedimiento porque el tiempo del desarrollo del huevo se alargaba demasiado a temperaturas bajas y los discos de hoja de tabaco se pudrían antes de que nacieran las ninfas. Así pues, optamos por evaluar el estado del desarrollo de los ovarios como estima de su fecundidad, y el estado del depósito seminal como estima de su estado reproductor (acopladas o no).

Para la evaluación del estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal, se realizaron disecciones de las hembras recolectadas en cada muestreo que se habían almacenado a -20°C . Las hembras se retiraron del congelador y se posicionaron sobre un portaobjetos. Con un bisturí se separó el abdomen del tórax y el abdomen se pegó dorsalmente sobre un celo adhesivo de doble cara que estaba adherido al portaobjetos. Luego se cortó transversalmente el extremo anal del abdomen y se agregó una gota de solución salina (115 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl_2 y 2 mM de tampón de fosfato de sodio; pH 7,2) de forma que cubriera totalmente el abdomen. Con una aguja entomológica se cortó el tegumento del abdomen por el lateral izquierdo y se abrió dejando al descubierto las estructuras internas. A continuación se retiraron los ovarios con unas pinzas entomológicas y se pusieron sobre una gota de solución salina en un nuevo portaobjetos para su observación (**Fig. 1.6 A, B, C**).

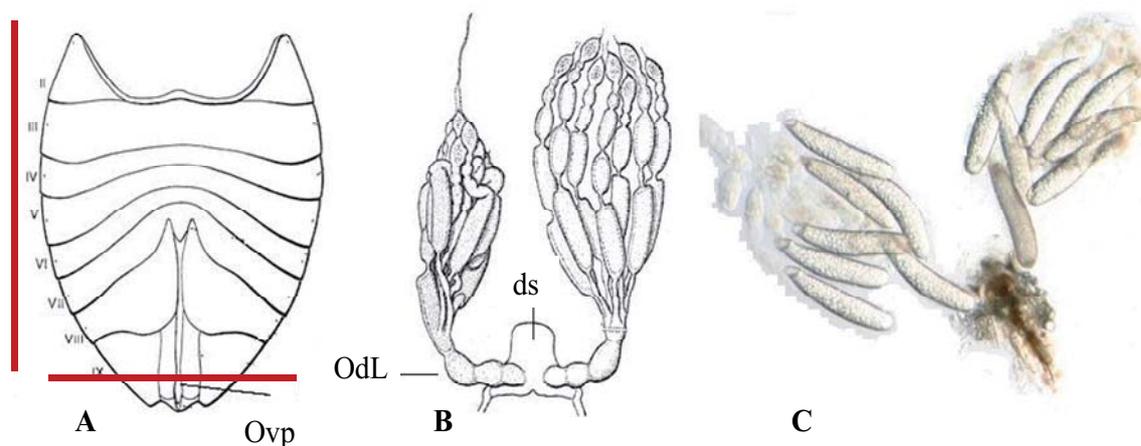


Figura 1.6. A) Esquema del abdomen de *Lygus lineolaris* en visión ventral identificando el ovopositor *Ovp*, y las zonas que se cortaron para hacer la disección (líneas rojas). B) Esquema de los ovarios de *Lygus lineolaris* identificando los ovariolos, los oviductos laterales *OdL* y el depósito seminal *ds*, (Davis, 1955). C) Foto de los ovarios de *M. pygmaeus* con folículos corionados.

Se anotó el número de oocitos corionados y vitelogénicos presentes en todos los ovarios de los dos ovarios, siguiendo la clasificación de los oocitos que realizaron Ma y Ramaswamy (1987) para el mirmido *Lygus lineolaris*. Se observó si el depósito seminal se encontraba lleno (color blanquecino opaco) o vacío (transparente), según el trabajo de Villavaso (2007) con hembras de *Lygus hesperus* y *Lygus lineolaris*.

2.3. Análisis de los datos

2.3.1. Análisis estadísticos

Las variables “temperatura diaria”, “supervivencia”, “fertilidad total”, “fertilidad por hembra y por día” y “número de oocitos totales” se analizaron por medio de un análisis de la varianza de una vía. Para las variables cuyas varianzas no eran homogéneas ni se homogenizaban con una transformación matemática simple se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de dos muestras de Wilcoxon para hacer las comparaciones múltiples entre medias. Se aplicó el test secuencial de Bonferroni para corregir el error del tipo I.

Para las variables cuyas varianzas eran homogéneas o bien se homogeneizaban mediante una transformación logarítmica o de raíz cuadrada se empleó un análisis de la varianza paramétrico seguido del test de Tukey para comparar las medias. El nivel de significación fijado fue de $\alpha=0,05$.

Con el objetivo de establecer el grado de asociación entre las variables “fertilidad total” y “supervivencia” de las hembras a lo largo de todo el periodo de muestreo se realizó un análisis de correlación de Pearson.

Para comparar los grados día acumulados por las hembras expuestas a temperatura controlada en la cámara con las que se mantuvieron en el insectario a temperatura ambiente se hizo la prueba de la t de Student. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS Systems Release 8.02.

2.3.2. Cálculo en grados día acumulados de la supervivencia de las hembras en la cámara y en el insectario

Con el fin de poder comparar la supervivencia de las hembras de cada muestreo que se mantuvieron en la cámara de condiciones controladas y en el insectario se calcularon los grados día acumulados desde la fecha de recolección hasta su muerte. Los grados-día son una conversión de los días que permanecen vivas las hembras expresados en la acumulación de grados centígrados (°C). El cálculo se hizo con las temperaturas máximas y mínimas diarias registradas en la cámara de temperatura controlada y en el insectario al aire libre. Se aplicó la ecuación para los grados-día acumulados según el método de triangulación simple $(T_{\max} - T_{\min} / 2)$ (Zalom *et al.*, 1983).

3. RESULTADOS

3.1. Características climáticas de la zona de muestreo

La caracterización de la climatología de la zona en la que se realizaron los muestreos se realizó tomando los datos meteorológicos de la estación de Cabrils (Xarxa Agrometeorológica de Catalunya). En la tabla 1.1 se muestran los valores medios anuales de temperatura, humedad relativa, precipitación y días de helada del período durante el que se realizaron los muestreos, entre los años 2006 al 2009. La zona de estudio presenta temperaturas suaves en el invierno (nunca bajaron de los 0°C con valores mínimos medios que oscilaron entre los 10 y los 15°C), moderadamente cálidas en verano, (la temperatura máxima no fue superior a 34°C con valores máximos medios que oscilaron entre los 19 y los 23°C) y la humedad relativa se mantuvo entre el 58 y 75%. El régimen de precipitaciones fue irregular siendo el mes con mayor precipitación diferente para cada año: en el 2006 fue Septiembre con 93,60 mm de lluvia acumulada; en el 2007 fue Agosto con 121,40 mm; en el 2008 Octubre con 116,20 mm y en el 2009 fue Enero con 79,80 mm. La mayor precipitación acumulada tuvo lugar en el 2008 con un total de 105 días de lluvia, sin embargo la máxima humedad relativa tuvo lugar en el 2006 con un 72,58%.

Tabla 1.1. Resumen de datos meteorológicos de la estación de Cabrils del periodo de Marzo de 2006 a Junio de 2009 (<http://xarxes.meteocat.com/xac/>). Se muestran los valores medios anuales de temperatura máxima, mínima y media, así como de humedad relativa. También se presenta el total anual de precipitación, el número de días de lluvia y de helada.

Año	Temperatura °C			Humedad Relativa Media	Precipitación acumulada (mm)	Días de lluvia acumulados	Días de helada
	Media	Max	Min				
2006	18,40	22,8	14,76	72,58	424,80	76	0
2007	16,78	21,35	12,75	66,16	358,00	78	0
2008	16,30	20,53	12,33	69,66	673,70	105	0
2009	14,54	18,83	10,32	68,00	258,70	54	0

En la figura 1.7 podemos ver los registros mensuales de las temperaturas mínimas, máximas y medias durante el periodo de muestreo y marcadas con colores según las estaciones del año. Las temperaturas máximas y mínimas se alejaban de la media aproximadamente 5°C. Las temperaturas más altas se registraron durante el verano siendo las máximas absolutas de 33,3°C en el 2006; 32°C en el 2007 y 32,1°C en el 2008. Las temperaturas más bajas se dieron en el invierno siendo las mínimas absolutas de 2,6°C en el 2006; de 0,6°C en el 2007; de 0,9°C en el 2008 y de 0,2°C en el 2009. Los meses de primavera y de otoño registraron temperaturas medias entre 12° y 19°C respectivamente.

Se evaluaron las temperaturas diarias y se encontraron diferencias significativas entre las estaciones ($F=193,97$; $g/l=13$; $P < 0,0001$). Los veranos del 2006 ($23,98 \pm 0,21$ °C), del 2007 ($23,11 \pm 0,18$ °C) y del 2008 ($23,80 \pm 0,18$ °C) registraron temperaturas significativamente mayores a las de las otras estaciones, sin ser diferentes entre ellas. Así mismo, los inviernos del 2006 ($11,20 \pm 0,39$ °C), del 2007 ($11,68 \pm 0,24$ °C), del 2008 ($11,29 \pm 0,18$ °C) y del 2009 ($10,24 \pm 0,23$ °C) registraron temperaturas significativamente menores a las otras estaciones, sin ser diferentes entre ellas. En las demás estaciones la temperatura presento valores intermedios y sólo se diferenciaron estadísticamente la primavera del 2009 ($17,87 \pm 0,41$ °C), la primavera del 2007 ($17,80 \pm 0,42$ °C) y la primavera del 2006 ($17,23 \pm 0,30$ °C) de los otoños del 2007 ($14,53 \pm 0,42$ °C) y del otoño del 2008 ($14,0 \pm 0,44$ °C).

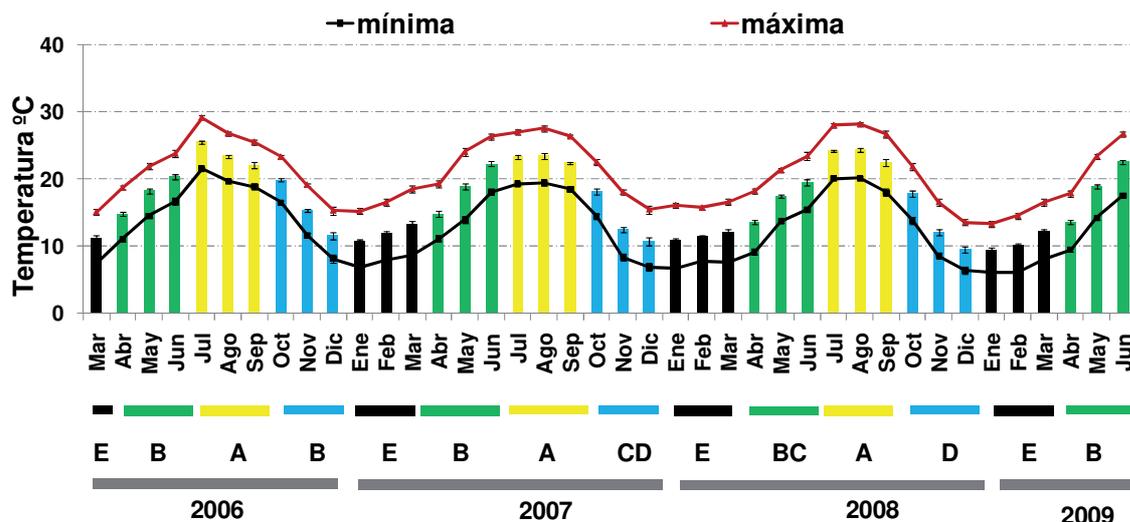


Figura 1.7. Registro de temperaturas mensuales (media, mínima y máxima \pm error típico) en la estación meteorológica del IRTA de Cabrils, de Marzo del 2006 a Junio del 2009. Las barras indican la temperatura media y los colores indican aproximadamente las estaciones (Negro: invierno; Verde: primavera; Amarillo: verano; Azul: otoño). La línea roja muestra las temperaturas máximas y la línea negra las mínimas.

3.2. Hembras de *M. melanotoma* recolectadas sobre *Dittrichia viscosa* y *Ononis natrix*. Parámetros biológicos en condiciones controladas

La tabla 1.2 indica el número de muestreos realizados, la planta en la cual se recolectaron las hembras, el número de hembras por muestreo y sus respectivas fechas. Se recolectaron un total de 272 hembras entre Marzo y Noviembre del 2006. Los primeros 4 muestreos sobre *O. natrix* no tuvieron continuidad debido a que las plantas se secaron. Por ello, se continuaron los muestreos sobre *D. viscosa* hasta finales de Noviembre. Durante el último muestreo de 2006, el N°13, se dificultó la captura de las hembras debido a la calidad de las plantas que se observaban secas y con poca superficie foliar

Tabla 1.2. Muestreos realizados para la recolección de las hembras de *M. melanotoma* en una parcela experimental del IRTA (Cabrils) entre Marzo y Noviembre del 2006.

Nº de muestreo	Planta	n	Fecha 2006
1	<i>O. natrix</i>	21	30-Mar
2	<i>O. natrix</i>	21	12-Abr
3	<i>O. natrix</i>	20	2-May
4	<i>O. natrix</i>	22	22-May
5	<i>D. viscosa</i>	21	13-Jun
6	<i>D. viscosa</i>	21	1-Jul
7	<i>D. viscosa</i>	21	25-Jul
8	<i>D. viscosa</i>	21	16-Ago
9	<i>D. viscosa</i>	21	8-Sep
10	<i>D. viscosa</i>	21	26-Sep
11	<i>D. viscosa</i>	22	17-Oct
12	<i>D. viscosa</i>	20	7-Nov
13	<i>D. viscosa</i>	20	28-Nov
TOTAL		272	

3.2.1. Supervivencia

Las hembras permanecieron vivas en la cámara de 25°C un promedio de $13,44 \pm 0,30$ días (rango entre 4 y 25 días). Teniendo en cuenta el número medio de días que sobrevivieron las hembras y que cada hembra se cambió de caja de ovoposición cada 3-4 días, se manipularon un total de 1088 cajas de ovoposición.

En la figura 1.8 podemos ver el promedio de días que sobrevivieron las hembras de cada muestreo a 25°C. Los resultados del test de Kruskal-Wallis indican que hay diferencias significativas entre las fechas de muestreo ($X^2=33,01$; $gl = 12$; $P = 0,001$), siendo las hembras del muestreo del 1 de Julio las que menos vivieron. No se observa un patrón estacional de la supervivencia de las hembras y las variaciones entre los distintos muestreos no son muy marcadas.

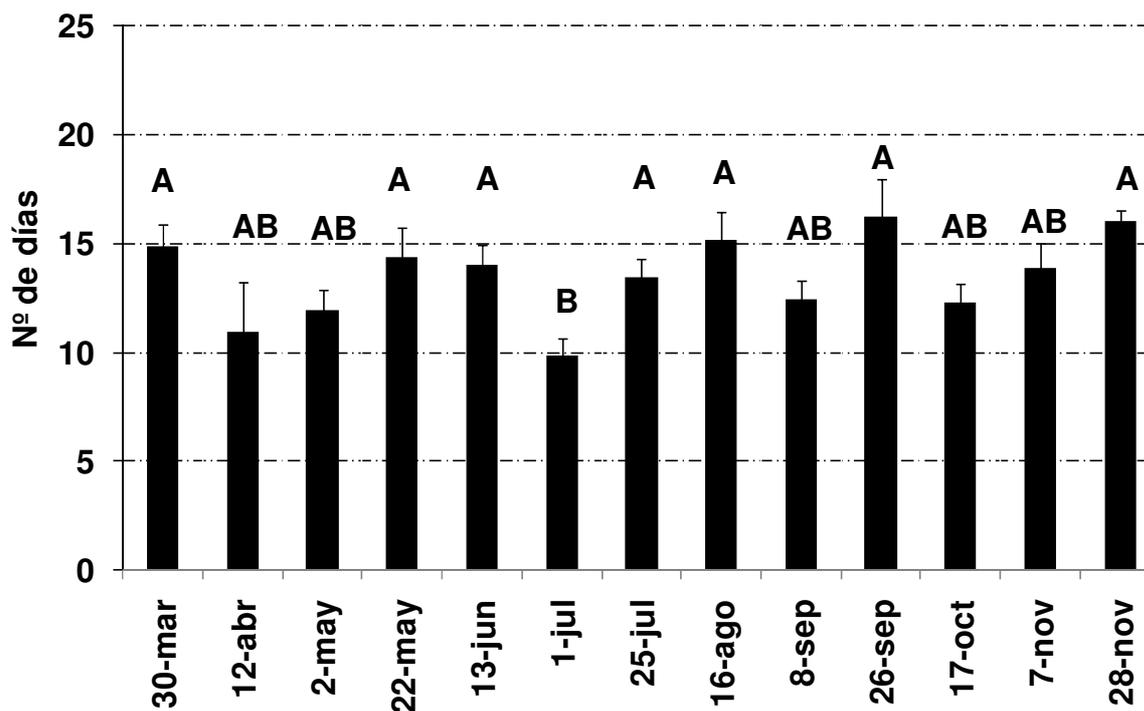


Figura 1.8. Número de días (media \pm error típico) que sobrevivieron las hembras recolectadas en las diferentes fechas en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70 \pm 10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad). Los muestreos con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P=0,001$).

3.2.2. Fertilidad

Se contaron un total de 5331 ninfas de primer estadio procedentes de las puestas de las hembras recolectadas durante los muestreos del 2006. La fertilidad total media fue de 21,23 \pm 1,19 ninfas /hembra (rango entre 1 y 133). En la figura 1.9 se representa la media (\pm error típico) del número total de ninfas producido por las hembras de cada muestreo en la cámara de condiciones controladas.

El resultado del test de Kruskal-Wallis indica que hay diferencias significativas en el número de ninfas producidas por las hembras recolectadas en diferentes fechas ($X^2=80,70$; $gl=12$; $P<0,0001$).

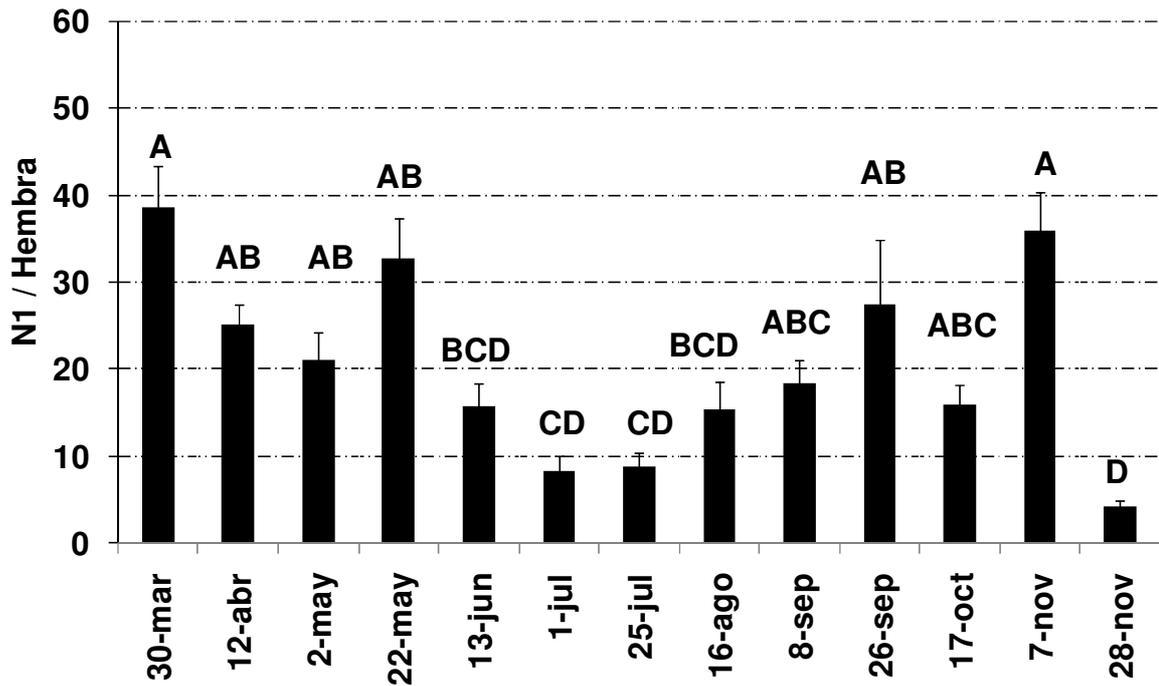


Figura 1.9. Número de ninfas (media \pm error típico) producidas en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70 \pm 10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad) por las hembras recolectadas sobre *O. natrix* y *D. viscosa* en cada fecha de muestreo del 2006. Los muestreos con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P < 0,0001$).

La fertilidad total más baja se dio en verano con valores de $8,38 \pm 1,73$ (1 de Julio) y $8,85 \pm 1,54$ (25 de Julio), así como en la segunda quincena de Noviembre con $4,14 \pm 0,77$ ninfas/hembra. La fertilidad total más alta se dio al inicio de la primavera con valores medios de $38,61 \pm 4,81$ (30 de Marzo) y la primera quincena de Noviembre $36 \pm 4,43$ ninfas/hembra. Los resultados de este ensayo muestran que las hembras recogidas en verano presentaban una fertilidad menor que las recogidas en épocas más frías.

La fertilidad media por hembra y por día fue de $1,51 \pm 0,070$ ninfas (rango entre 0,055 y 5,32). En la figura 1.10 podemos ver la producción de ninfas de primer estadio por hembra y por día de vida para cada fecha de muestreo. El ANOVA es significativo indicando de nuevo que la fertilidad de las hembras varía a lo largo del año en los distintos muestreos realizados ($F = 14,32$; $gl = 12$; $P < 0,0001$).

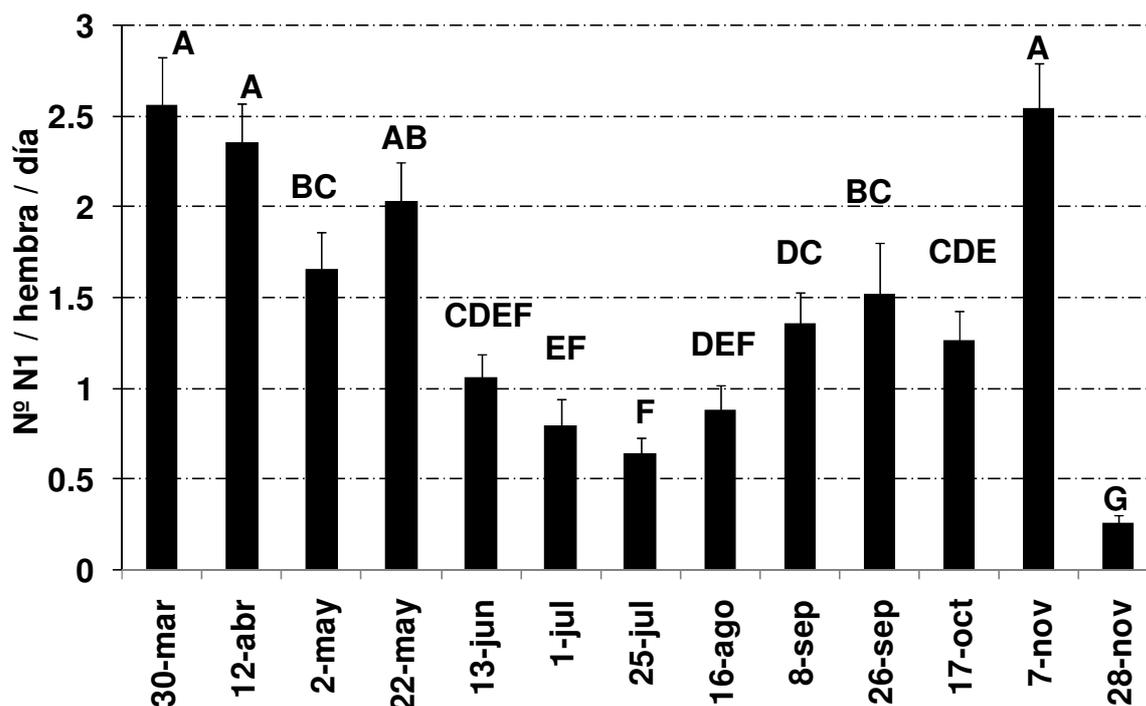


Figura 1.10. Número de ninfas (media ± error típico) producidas por hembra y por día de vida en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70±10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad) de las hembras recolectadas sobre *O. natrix* y *D. viscosa* en cada fecha de muestreo del 2006. Muestréos con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P < 0,0001$).

Los resultados muestran un patrón parecido al obtenido para la fertilidad total. Las hembras con menor fertilidad son las recolectadas en la segunda quincena de Noviembre con una media de menos de media ninfa por día y las recolectadas en el mes de Julio con una media de menos de una ninfa al día. Sin embargo, durante los meses de primavera temprana y otoño tardío (Marzo, Abril, segunda quincena de Mayo y primera quincena de Noviembre) la fertilidad es máxima y superior a 2 ninfas por hembra y por día. La excepcionalmente baja fertilidad registrada el 28 de Noviembre probablemente se deba al mal estado de las plantas huésped cuando se realizó el muestreo.

3.2.3. Correlación entre la supervivencia de las hembras y su fertilidad total

Los resultados del análisis de correlación de Pearson indican que las variables “fertilidad total” y “supervivencia” se asocian entre sí cuando se analizan los datos de todas las hembras muestreadas conjuntamente, obteniendo una relación positiva significativa

($r=0,542$; $P =0,0001$). Esto nos indica que tienen una mayor fertilidad aquellas hembras que han permanecido más tiempo vivas, tal y como podría esperarse. La tabla 1.3 muestra que igualmente se encontró una asociación positiva significativa de la “fertilidad total” y los “supervivencia” para cada uno de los muestreos, exceptuando el del 28 de Noviembre que como ya se ha mencionado fue un poco atípico por el mal estado de las plantas.

Teniendo en cuenta la correlación positiva que se observó entre estas variables y debido a que no sabemos la edad real de las hembras, formulamos la hipótesis de que aquellas hembras que vivieron menos días en la cámara de condiciones controladas eran hembras de mayor edad que se encontraban en estado post-vitelogénico, y por tanto producen pocos o ningún huevo. Por el contrario, aquellas hembras que han permanecido más tiempo vivas podrían corresponder a hembras jóvenes en estado vitelogénico de su desarrollo, es decir donde la producción de huevos es máxima. Con base a esta hipótesis decidimos establecer rangos de días en los que las hembras permanecieron vivas y clasificar las hembras muestreadas según unas categorías de edades definidas.

Tabla 1.3. Análisis de correlación entre las variables “fertilidad total” y “supervivencia” de las hembras recolectadas en cada uno de los muestreos. NS= no significativo.

Fecha de muestreo	<i>r</i>	<i>P</i>
30-Mar	0,535	0,012
12-Abr	0,547	0,010
2-May	0,639	0,002
22-May	0,780	<0,0001
13-Jun	0,633	0,002
1-Jul	0,516	0,016
25-Jul	0,493	0,023
16-Ago	0,907	<0,0001
8-Sep	0,720	0,0002
26-Sep	0,569	0,007
17-Oct	0,571	0,005
7-Nov	0,574	0,008
28-Nov	0,392	0,086 NS

3.2.4. Fertilidad de las hembras según las categorías de edades establecidas

Teniendo en cuenta que el valor más alto de supervivencia encontrado en este ensayo fue de 25 días se establecieron las siguientes categorías de edades:

- a) hembras “viejas”: se mantuvieron vivas menos de 7 días
- b) hembras “maduras”: se mantuvieron vivas entre 8 y 14 días
- c) hembras “jóvenes”: permanecieron vivas entre 15 y 21 días
- d) hembras “muy jóvenes”: se mantuvieron vivas más de 22 días

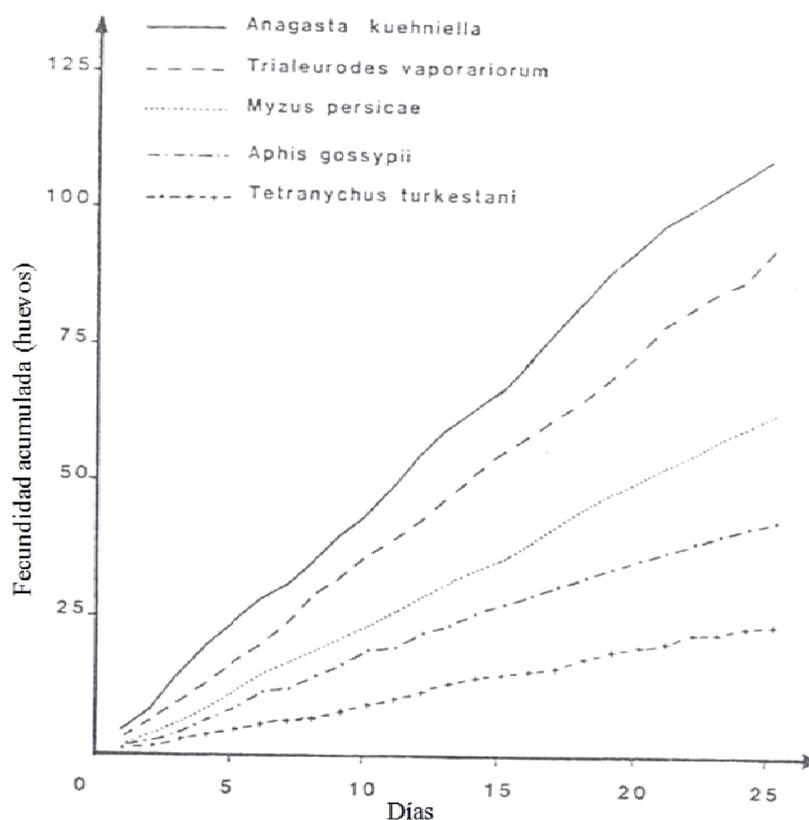


Figura 1.11. Número total de huevos acumulados por hembras de *M. melanotoma* alimentadas con diferentes dietas, a 25°C (Fauvel *et al.*, 1987).

Los tramos de 7 días por categoría se hicieron teniendo en cuenta los cambios de las hembras de cajas de ovoposición que se realizaron cada 3 y 4 días, y así fue más fácil agrupar las hembras por semanas de puesta. Si observamos los datos de fecundidad

acumulada de hembras de *M. melanotoma* procedentes de una cría sobre *Pelargonium peltatum* a 25°C (Fig. 1.11, Fauvel *et al.*, 1987) vemos que cuando se las alimenta con huevos de *Anagasta kuehniella*, las hembras alcanzan la mayor fecundidad al cabo de tres semanas y media, sobreviviendo aproximadamente 40,2 días.

En la figura 1.12 se observa la distribución de las 272 hembras recolectadas en todos los muestreos en las diferentes categorías de edad. La mayor parte de las hembras (50%) correspondían a la categoría “maduras”, seguido de las hembras de la categoría “jóvenes” (31%). El menor número de hembras se encontró en la categoría de “viejas” (11%) y “muy jóvenes” (8%).

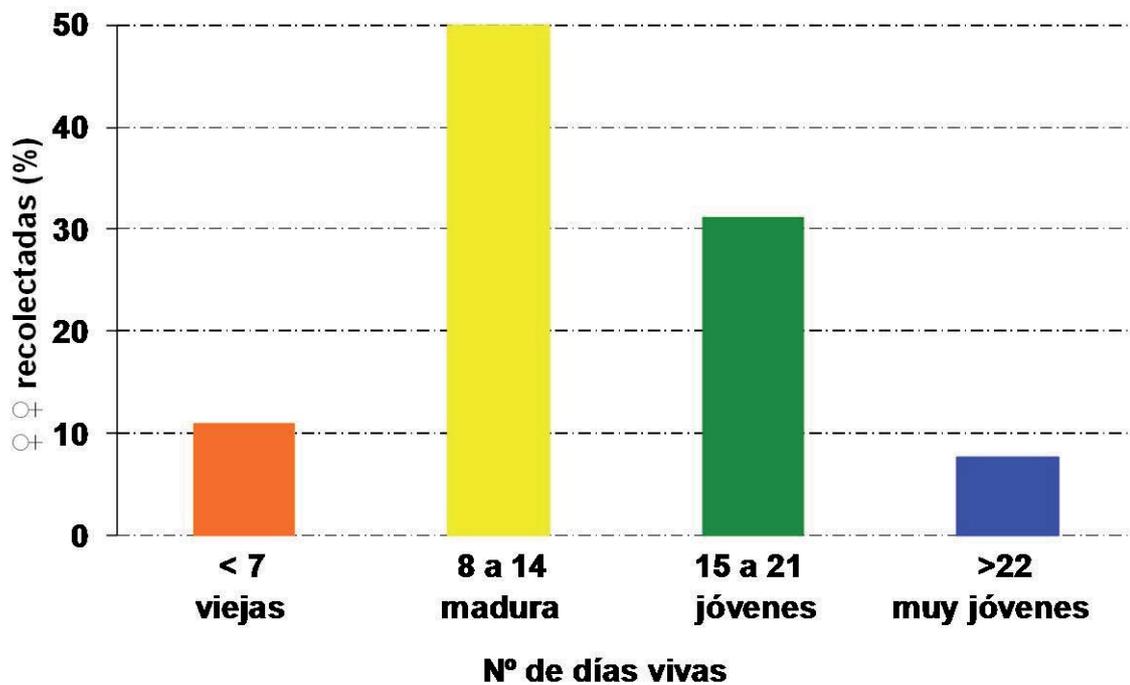


Figura 1.12. Distribución de todas las hembras recolectadas en los muestreos del año 2006 (n=272) por categorías de edad establecidas según el número de días que sobrevivieron a 25°C. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 14 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 15 y 21 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven más de 22 días).

Un total de 21 hembras, de las 272 recolectadas, resultaron ser infértiles, y representan el 7,7% del total de las hembras evaluadas. En la figura 1.13 podemos ver que el mayor número de hembras infértiles estaba en la categoría de hembras “maduras” y hembras “viejas”. Esto confirma la hipótesis que nos formulamos: las hembras infértiles están mayoritariamente distribuidas en las categorías “viejas” y “maduras” posiblemente

porque se encuentren en su periodo post-vitelogénico. Sólo una hembra “joven” fue infértil, siendo el resto de hembras “jóvenes” y “muy jóvenes” fértiles.

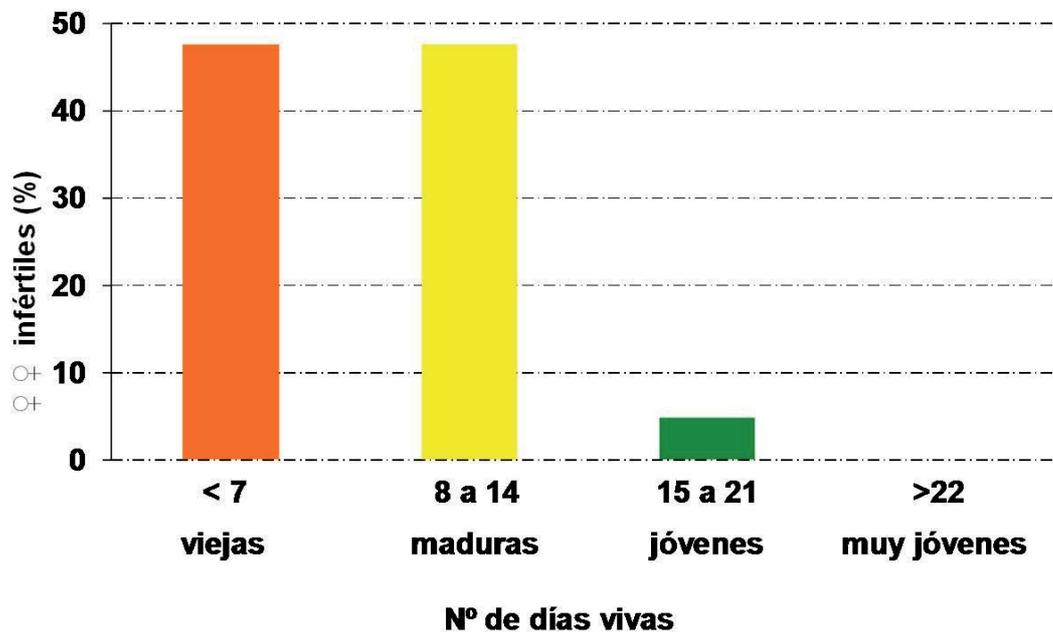


Figura 1.13. Distribución de las hembras infértiles según las categorías de edad establecidas.

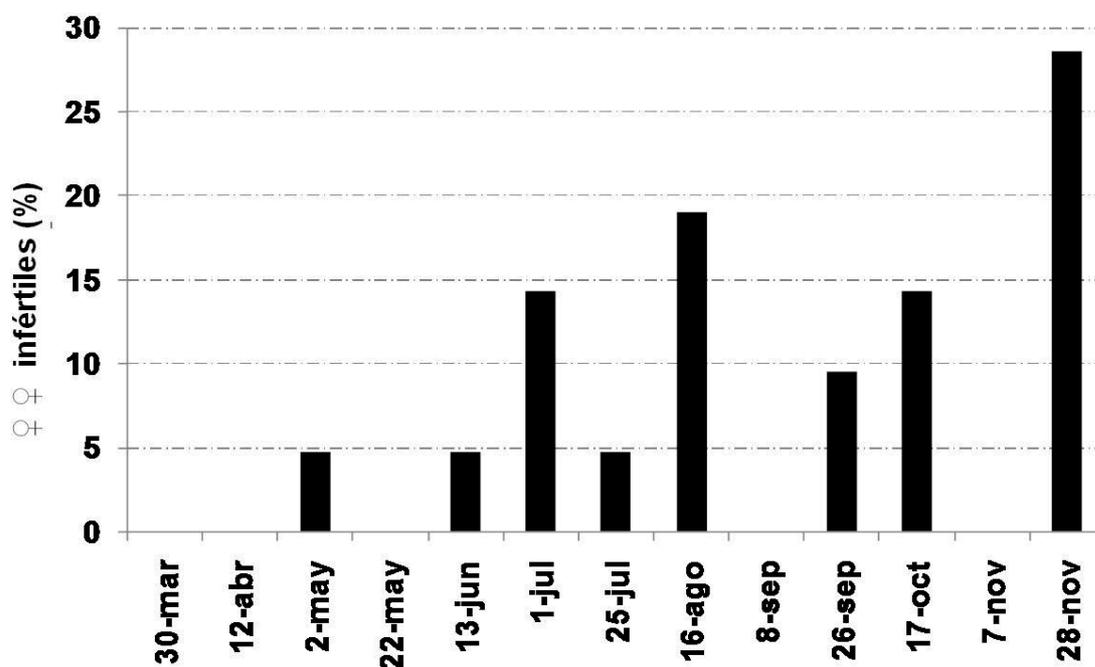


Figura 1.14. Distribución de las hembras infértiles según la fecha de su recolección durante el 2006.

Aparentemente no hay un periodo particular del año donde haya más hembras infértiles (Fig. 1.14). Se encontraron 6 hembras infértiles en el muestreo del 28 de Noviembre, 4 hembras en el del 16 de Agosto, 3 hembras en el del 17 de Octubre y en el del 1 de Julio, 2 hembras en el del 26 de Septiembre, y una sola hembra en los muestreos del 2 de Mayo, 13 de Junio y 25 de Julio. En los restantes 5 muestreos no se hallaron hembras infértiles.

En la figura 1.15 se representa la distribución de las hembras recolectadas en cada fecha de muestreo según la categoría de edad asignada. Se observa un predominio de hembras de la categoría “maduras” y “jóvenes” en la mayoría de los muestreos. Las hembras de la categoría “viejas”, o aquellas que vivieron menos de 7 días se encuentran en mucha menor proporción. Hembras de la categoría “viejas” sólo se encontraron en 8 de los muestreos siendo el del 1 de Julio el de mayor número de hembras “viejas”. Las hembras de la categoría “muy jóvenes” se encontraron en 5 muestreos siendo el muestreo del 26 de Septiembre el que tuvo un mayor número. En esta distribución no se incluyeron las hembras infértiles.

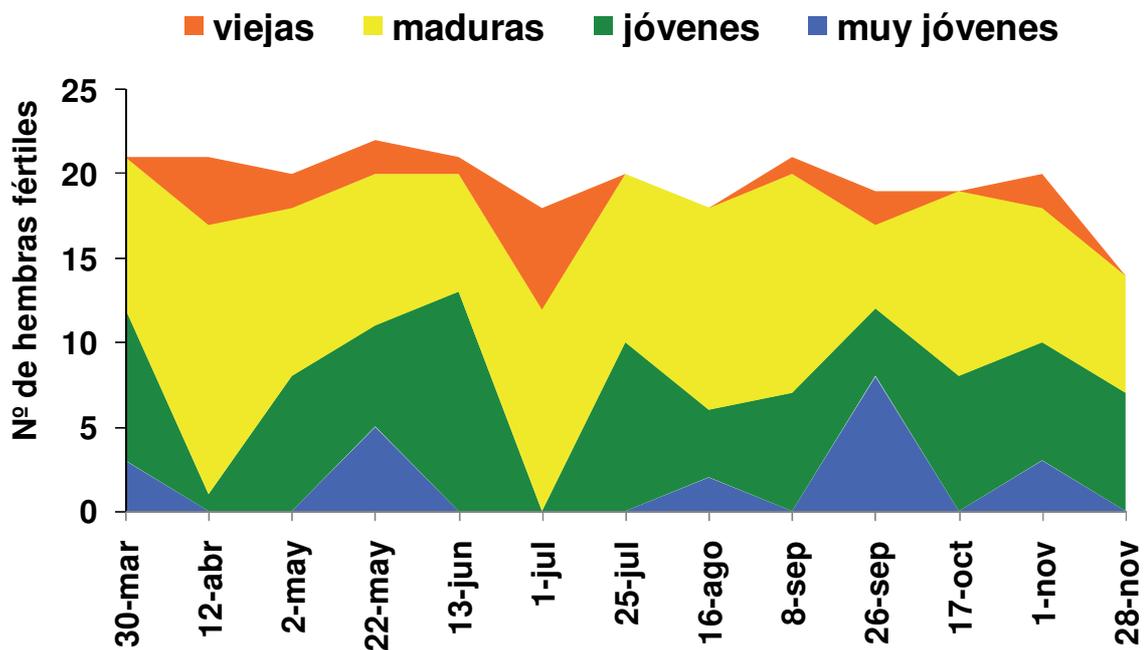


Figura 1.15. Número de hembras fértiles distribuidas según la categoría de edad asignada en cada fecha de muestreo durante el 2006. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 14 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 15 y 21 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven más de 22 días).

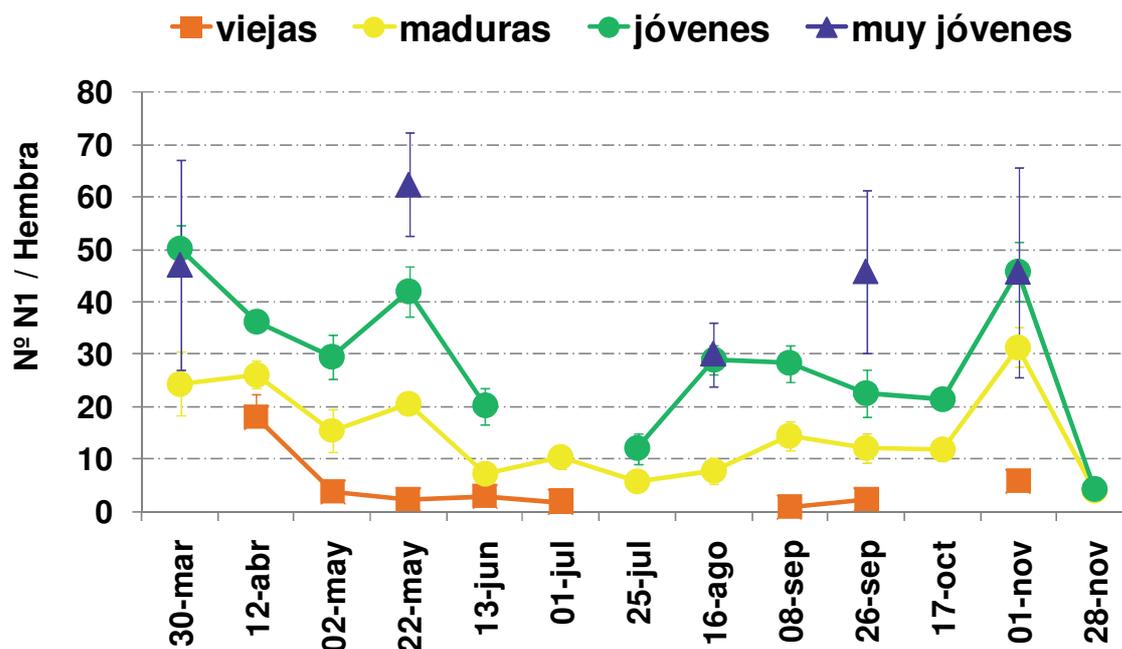


Figura 1.16. Número de ninfas (media \pm error típico) producidas por hembra según su categoría de edad y para cada uno de los muestreos realizados durante el 2006. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 14 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 15 y 21 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven más de 22 días).

La figura 1.16 muestra la fertilidad total de las hembras recogidas en cada muestreo según su categoría de edad. La fertilidad más alta se da en la categoría de hembras “muy jóvenes”, aunque con una gran variabilidad como denotan los errores típicos grandes. La siguiente fertilidad más alta se da en la categoría de hembras “jóvenes”, que permanece alta durante todos los muestreos excepto en la segunda quincena de Noviembre. La fertilidad de las hembras “maduras” se mantuvo baja y constante durante todos los muestreos, y la de las hembras “viejas” fue la más baja.

3.3. Hembras de *M. pygmaeus* recolectadas sobre *Parietaria officinalis*. Parámetros biológicos en condiciones controladas y en condiciones ambientales naturales

Una vez aclarado que las poblaciones de *Macrolophus* que colonizan los invernaderos y campos de tomate son las de *M. pygmaeus* (Martinez-Cascales *et al.*, 2006) buscamos una finca comercial que tuviera un prolongado historial de colonización espontánea de sus invernaderos de tomate por *Macrolophus* spp.

Tabla 1.4. Muestreos realizados para la recolección de hembras de *M. pygmaeus* en una zona de vegetación ruderal (*P. officinalis*) cercana a un invernadero comercial de tomate en Arenys de Mar. Las tomas de muestras se realizaron entre Enero del 2007 y Abril del 2009.

	Nº de muestreo	n	Fecha
2007	14	20	11-Ene
	15	20	30-Ene
	16	20	21-Eeb
	17	20	16-Mar
	18	20	2-Abr
	19	20	25-Abr
	20	20	15-May
	21	20	12-Jun
	22	30	6-Jul
	23	30	24-Jul
	24	30	26-Ago
	25	30	3-Sep
	26	30	24-Sep
	27	30	10-oOct
28	30	6-Nov	
2008	29	30	27-Nov
	30	30	18-Dic
	31	30	8-Ene
	32	30	29-Ene
	33	30	19-Feb
	34	30	11-Mar
	35	30	1-Abr
	36	30	22-Abr
	37	30	13-May
	38	30	3-Jun
	39	30	24-Jun
	40	30	15-Jul
	41	30	5-Ago
	42	30	26-Ago
43	30	16-Sep	
44	30	7-Oct	
45	30	28-Oct	
46	30	18-Nov	
47	30	12-Dic	
2009	48	30	9-Ene
	49	30	27-Ene
	50	30	17-Feb
	51	30	10-Mar
	52	30	31-Mar
	53	30	21-Abr
TOTAL		1120	

Esta finca fue Can Tutó y en ella buscamos las comunidades de plantas ruderales más abundantes que estuvieran citadas como hospedantes de *M. pygmaeus* y de esta forma nos centramos en *P. officinalis*. Es importante mencionar que la fenología de las plantas varió considerablemente entre los años de muestreo. Durante el 2007 muchas de las plantas perdieron sus hojas en el verano, mientras que en el 2008 las plantas se mantuvieron verdes y frondosas durante todos los periodos de muestreo. La tabla 1.4 indica el número de muestreos realizados, el número de hembras recolectadas por muestreo y sus respectivas fechas. Se recolectaron un total de 1120 hembras entre Enero del 2007 y Abril del 2009. Del total de las hembras recolectadas, 400 de ellas se mantuvieron en condiciones controladas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ $70\pm 10\%$ HR y 16:8 h Luz:Oscuridad. Otra parte, 320 hembras recolectadas a partir del 6 de Julio de 2007 se mantuvieron en el insectario, en condiciones ambientales naturales. El resto de hembras se guardaron congeladas hasta que fueron diseccionadas.

3.3.1. Parámetros biológicos en condiciones controladas

3.3.1.1. Supervivencia

Las hembras permanecieron vivas en la cámara de 25°C un promedio de $19,32 \pm 0,65$ días (rango entre 3 y 82 días). Teniendo en cuenta el número medio de días que sobrevivieron las hembras y que cada hembra se cambió de caja cada 3-4 días, se manipularon aproximadamente unas 2000 cajas de ovoposición. En la figura 1.17 podemos ver el promedio de días que sobrevivieron las hembras de cada muestreo a 25°C . Las hembras que permanecieron más tiempo vivas a 25°C fueron las de los muestreos del 6 y el 27 de Noviembre del 2007 con una media de 38,2 y 41 días respectivamente. El 21 de Abril del 2009 fue la fecha en que las hembras sobrevivieron menos días con una media de $7,1 \pm 1,38$ días, seguida de la segunda quincena de Marzo del mismo año ($8,8 \pm 1,47$ días). Para establecer si había una tendencia estacional en la supervivencia de las hembras se agruparon los muestreos según las estaciones del año y se compararon entre sí. Se encontraron diferencias significativas entre las estaciones ($F=6,05$; $gl=9$; $P < 0,0001$).

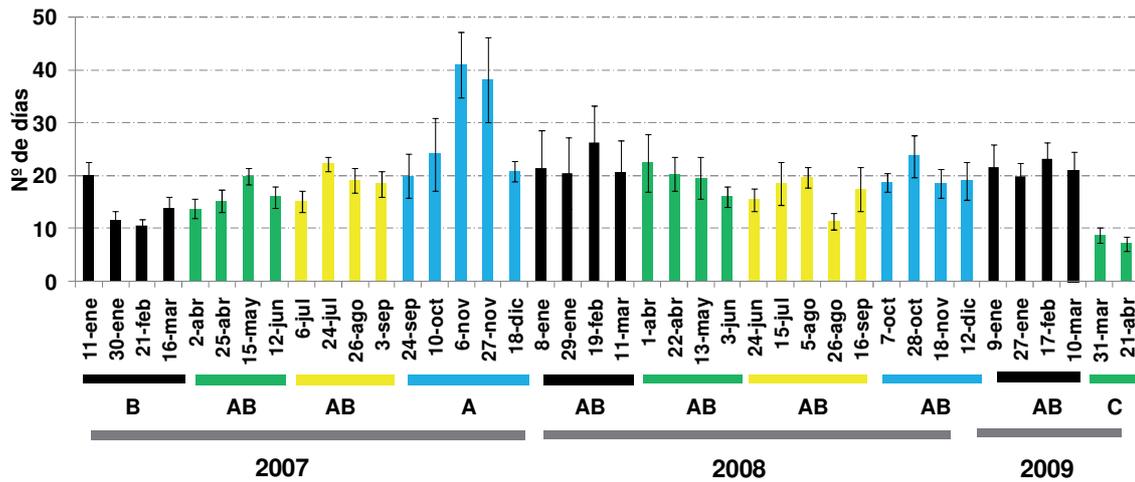


Figura 1.17. Número de días (media \pm error típico) en que las hembras de cada muestreo permanecieron vivas en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70 \pm 10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad). Los colores indican las estaciones del año. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño. Las estaciones con letras iguales no son significativamente distintas entre sí ($P < 0,0001$).

En el otoño del 2007, las hembras presentaron una supervivencia (28,84 \pm 2,81 días) significativamente mayor a las del invierno del 2007 (14,07 \pm 1,09 días) y a las de la primavera del 2009 (7,95 \pm 1,0 días). En las demás estaciones las hembras presentaron valores intermedios de supervivencia y sólo se diferenciaron estadísticamente de las de la primavera del 2009.

3.3.1.2. Fertilidad

Se recolectaron un total de 13733 ninfas de primer estadio procedentes de las puestas de las hembras recolectadas en los muestreos de Enero del 2007 hasta Abril del 2009. La fertilidad total media fue de 38,57 \pm 1,75 ninfas /hembra (rango entre 1 y 169). En la figura 1.18 se representa la media (\pm error típico) del número de ninfas producido por las hembras de cada muestreo en la cámara de condiciones controladas. La fertilidad total más alta se encontró en los muestreos del 6 y 27 de Noviembre del 2007 con valores medios de 75,3 \pm 14,1 y 103,6 \pm 19,2 ninfas/hembra. Le siguen los muestreos de la segunda quincena de Abril del 2008 con valores de 97 \pm 10,4 8 ninfas/hembra y la primera quincena de Marzo del 2009 con valores medios de 69,9 \pm 13,8 ninfas/hembra.

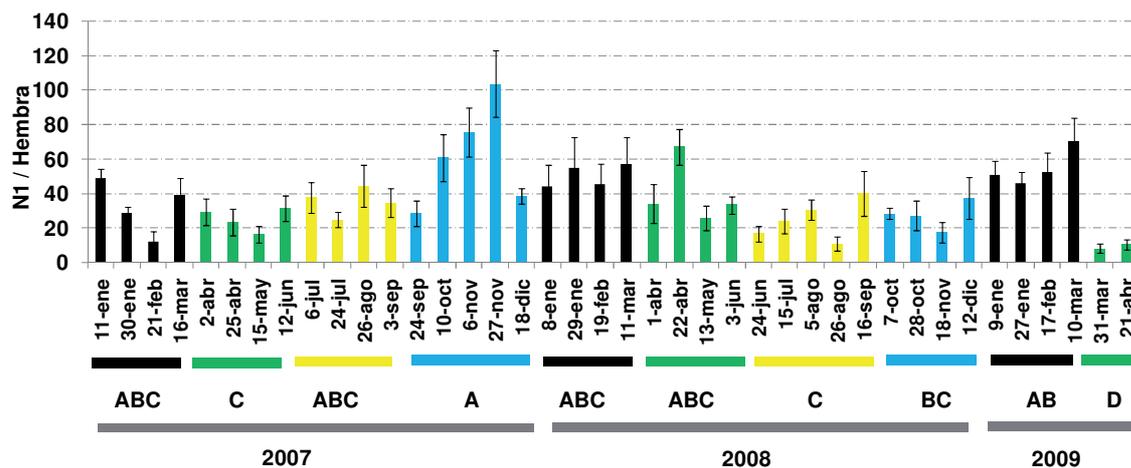


Figura 1.18. Número de ninfas (media \pm error típico) producidas en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70 \pm 10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad) por las hembras recolectadas sobre *P. officinalis* en cada fecha de muestreo entre Enero de 2007 y Abril de 2009. Los colores indican las fechas de muestreos que conforman las estaciones. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño. Las estaciones con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P < 0,0001$).

Al comparar el número de ninfas producidas por estación, igualmente se encontraron diferencias significativas ($F=6,92$; $gl= 9$; $P < 0,0001$). En el otoño del 2007, las hembras presentaron una fertilidad ($62,06 \pm 7,02$ ninfas/hembra) significativamente superior a las del otoño del 2008 ($28,31 \pm 4,40$ ninfas/hembra), al verano del 2008 ($27,70 \pm 3,84$ ninfas/hembra), a la primavera del 2007 ($25,02 \pm 3,43$ ninfas/hembra) y a la primavera del 2009 ($9,701 \pm 2,06$ ninfas/hembra). Las hembras en las demás estaciones presentaron valores intermedios de fertilidad y sólo se diferenciaron estadísticamente de las de la primavera del 2009.

La fertilidad media por hembra y por día fue de $1,75 \pm 0,05$ ninfas (rango entre 0,03 y 5,53). En la figura 1.19 podemos ver la producción de ninfas de primer estadio por hembra y por día de vida para cada fecha de muestreo. Las hembras con menor fertilidad diaria obtuvieron menos de una ninfa al día, el menor promedio se observó en el muestreo de Febrero del 2007 ($0,78 \pm 0,35$ ninfas/hembra/día), y la fertilidad más alta se encontró en la primera quincena de Marzo del 2009 ($3,3 \pm 0,45$ ninfas/hembra/día). Al comparar el número de ninfas por hembra y por día entre las estaciones, también se encontraron diferencias significativas ($F=4,39$; $gl= 9$; $P < 0,0001$).

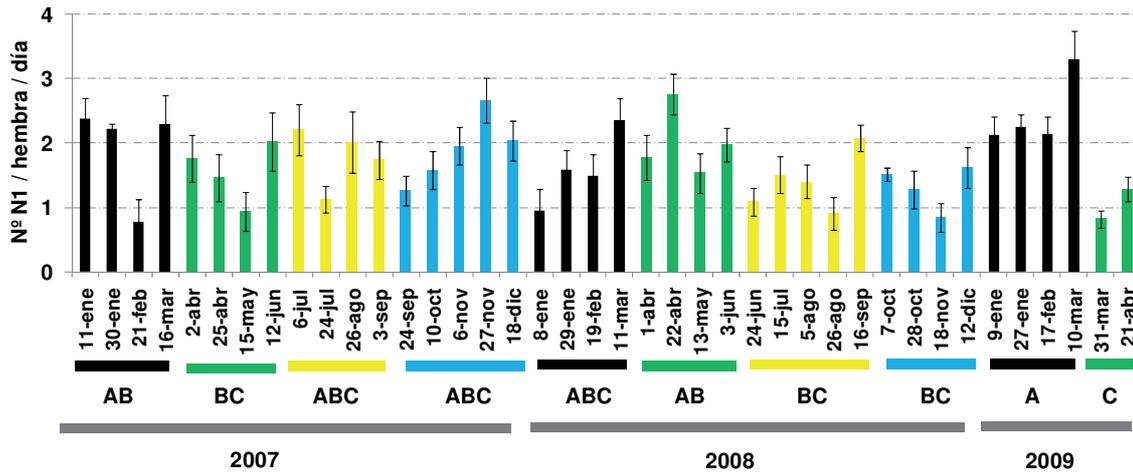


Figura 1.19. Número de ninfas (media ± error típico) producidas por hembra por día de vida en la cámara de condiciones controladas (25°C; 70±10% Humedad Relativa y 16:8h Luz:Oscuridad) por las hembras recolectadas sobre *P. officinalis* en cada fecha de muestreo entre Enero de 2007 y Abril de 2009. Los colores indican las fechas de muestreos que conforman las estaciones. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño. Las estaciones con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P < 0,0001$).

En el invierno del 2009, las hembras presentaron una fertilidad diaria ($2,45 \pm 0,16$ ninfas/hembra/día) significativamente superior a las del verano del 2008 ($1,40 \pm 0,12$ ninfas/hembra/día), a las de la primavera del 2007 ($1,54 \pm 0,19$ ninfas/hembra/día), a las del otoño del 2008 ($1,33 \pm 0,13$ ninfas/hembra/día) y a las de la primavera del 2009 ($1,04 \pm 0,13$ ninfas/hembra/día). Las hembras de esta última estación presentaron la menor fertilidad diaria y no fueron significativamente diferentes entre sí con el resto de las estaciones.

3.3.1.3. Correlación entre la supervivencia de las hembras y su fertilidad total

Los resultados del análisis de correlación de Pearson indican que las variables “fertilidad total” y “supervivencia” se asocian entre sí cuando se analizan los datos de todas las hembras muestreadas conjuntamente, obteniendo una relación positiva significativa ($r=0,707$; $P < 0,0001$).

Los resultados indican que tienen una mayor fertilidad aquellas hembras que han permanecido más tiempo vivas.

Tabla 1.5. Análisis de correlación entre las variables “fertilidad total” y “días de vida” de las hembras recolectadas en cada uno de los muestreos. NS= no significativo.

	FECHA	<i>r</i>	<i>P</i>
2007	11-Ene	0,420	0,226 NS
	30-Ene	0,978	<0,0001
	21-Eeb	0,753	0,011
	16-Mar	0,835	0,002
	2-Abr	0,856	0,001
	25-Abr	0,483	0,156 NS
	15-May	0,468	0,172 NS
	12-Jun	0,139	0,700 NS
	6-Jul	0,733	0,015
	24-Jul	0,097	0,787 NS
	26-Ago	0,741	0,014
	3-Sep	0,777	0,008
	24-Sep	0,737	0,014
	10-oOct	0,941	<0,0001
	6-Nov	0,455	0,185 NS
	27-Nov	0,764	0,009
18-Dic	0,381	0,276 NS	
2008	8-Ene	0,806	0,004
	29-Ene	0,990	<0,0001
	19-Feb	0,778	0,007
	11-Mar	0,820	0,003
	1-Abr	0,375	0,284 NS
	22-Abr	0,797	0,005
	13-May	0,453	0,188 NS
	3-Jun	0,751	0,012
	24-Jun	0,756	0,011
	15-Jul	0,560	0,091 NS
	5-Ago	0,654	0,040
	26-Ago	0,581	0,077 NS
	16-Sep	0,987	<0,0001
	7-Oct	0,746	0,013
28-Oct	0,180	0,618 NS	
18-Nov	0,562	0,090 NS	
12-Dic	0,883	0,0007	
2009	9-Ene	0,901	0,0003
	27-Ene	0,909	0,0002
	17-Feb	0,808	0,004
	10-Mar	0,870	0,001
	31-Mar	0,911	0,0002
	21-Abr	0,827	0,003

La tabla 1.5 muestra que igualmente se encontró una asociación positiva significativa de la “fertilidad total” y los “días de vida” para la mayoría de los 40 muestreos, exceptuando 13 fechas distribuidas entre los años 2007 y 2008: 11 de Enero, 25 de Abril, 15 de Mayo, 12 de Junio, 24 de Julio, 6 de Noviembre y 18 de Diciembre del 2007; 1 de Abril, 13 de Mayo, 15 de Julio, 26 de Agosto, 28 de Octubre y 18 de Noviembre del 2008.

Al igual que en los muestreos del 2006 sobre *D. viscosa* y *O. natrix* se tuvo en cuenta la asociación positiva que se observó entre estas variables para formular la hipótesis de que aquellas hembras que vivieron menos días a 25°C correspondían a hembras más viejas.

3.3.1.4. Fertilidad de las hembras según las categorías de edades establecidas

Teniendo en cuenta que 82 días fue el valor más alto de supervivencia encontrado en este ensayo, se establecieron las siguientes categorías de edades:

- a) hembras “viejas”: se mantuvieron vivas menos de 7 días;
- b) hembras “maduras”: se mantuvieron vivas entre 8 y 21 días;
- c) hembras “jóvenes”: permanecieron vivas entre 22 y 42;
- d) hembras “muy jóvenes”: se mantuvieron vivas entre 43 y 82;

Los tramos de 7 días por categoría se hicieron teniendo en cuenta los cambios de las hembras de cajas de ovoposición que se realizaron cada 3 y 4 días, y así fue más fácil agrupar las hembras por semanas de puesta. Si observamos los datos de fecundidad total de hembras de *M. pygmaeus* procedentes de una cría comercial a 23°C (**Fig. 1.20**, Vandekerkhove *et al.*, 2006) vemos que cuando se las alimenta con huevos de *E. kuehniella* tienen cinco semanas de máxima puesta entre la edad de 7 y 42 días. Por debajo y por encima de esta edad la fecundidad disminuye de forma pronunciada.

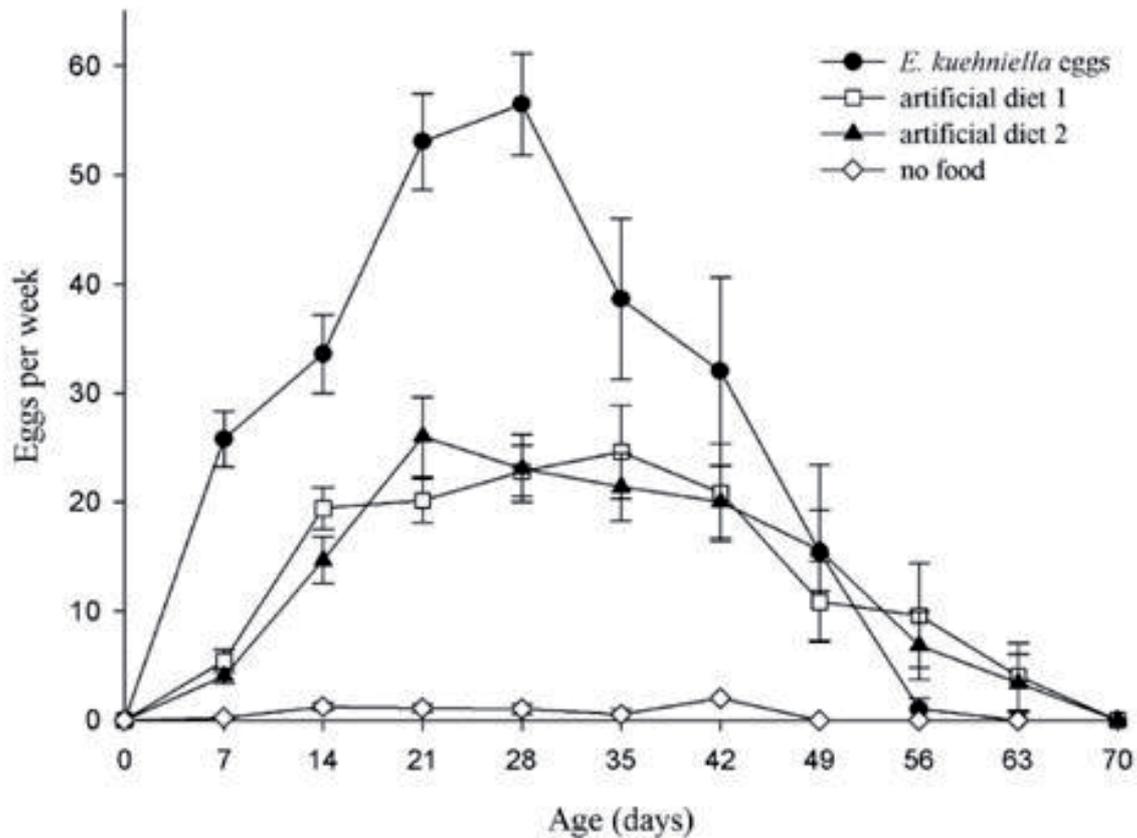


Figura 1.20. Número total de huevos puestos (media \pm error típico) por hembras de una cría comercial de *M. pygmaeus* alimentadas con diferentes dietas, a 23°C (Vandekerkhove *et al.*, 2006).

En la figura 1.21 se observa la distribución de las 400 hembras en las diferentes categorías de edad expresada como porcentaje. En el periodo de muestreo se encontró un porcentaje mayor (46%) de hembras de la categoría “maduras”, seguido de las hembras de la categoría “jóvenes” (35%). El menor número de hembras pertenecieron a la categoría “viejas” (15%) y a la categoría “muy jóvenes” (6%).

De las 400 hembras recolectadas, únicamente 44 hembras resultaron infértiles, que representa un 11%. La figura 1.22 muestra en qué categorías se encuentran las hembras infértiles. El mayor porcentaje de hembras infértiles pertenecían a la categoría “viejas” (84%), seguidas de las hembras “maduras” (16%). No hubo ninguna hembra infértil en las demás categorías, y el resto de hembras “jóvenes” y “muy jóvenes” resultaron ser todas fértiles.

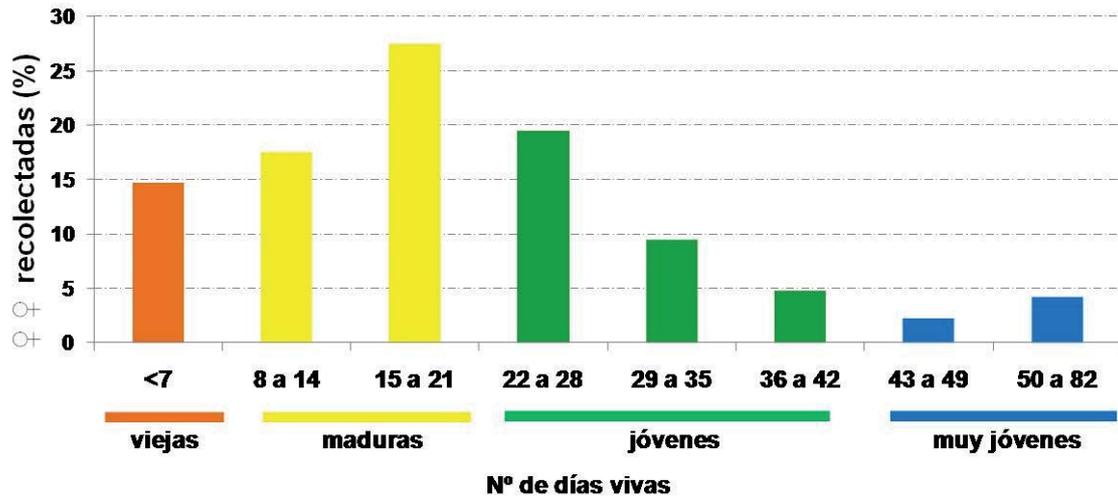


Figura 1.21. Distribución de todas las hembras recolectadas en los muestreos (n=400) por categorías de edad, según el número de días que sobrevivieron a 25°C. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 82 días).

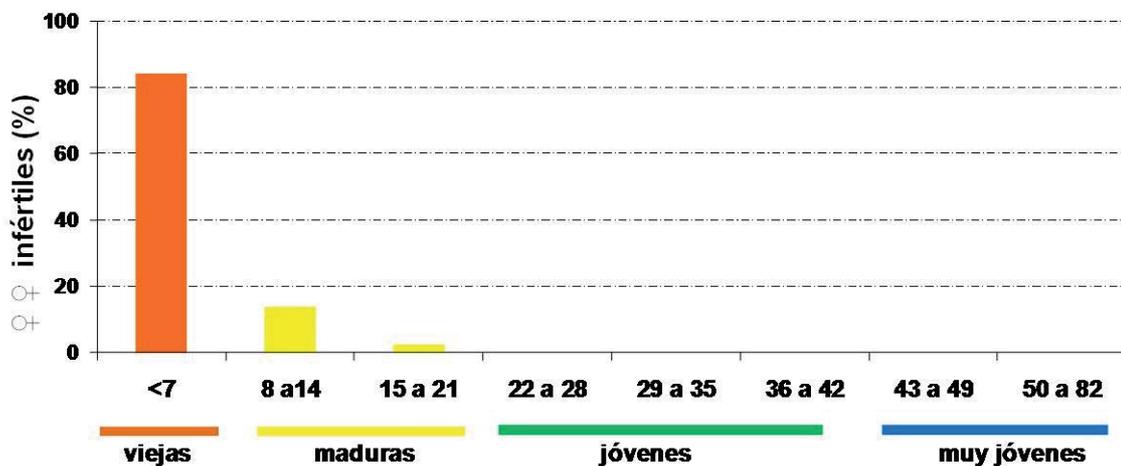


Figura 1.22. Distribución del total de las hembras infértiles según las categorías de edad establecidas. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 82 días).

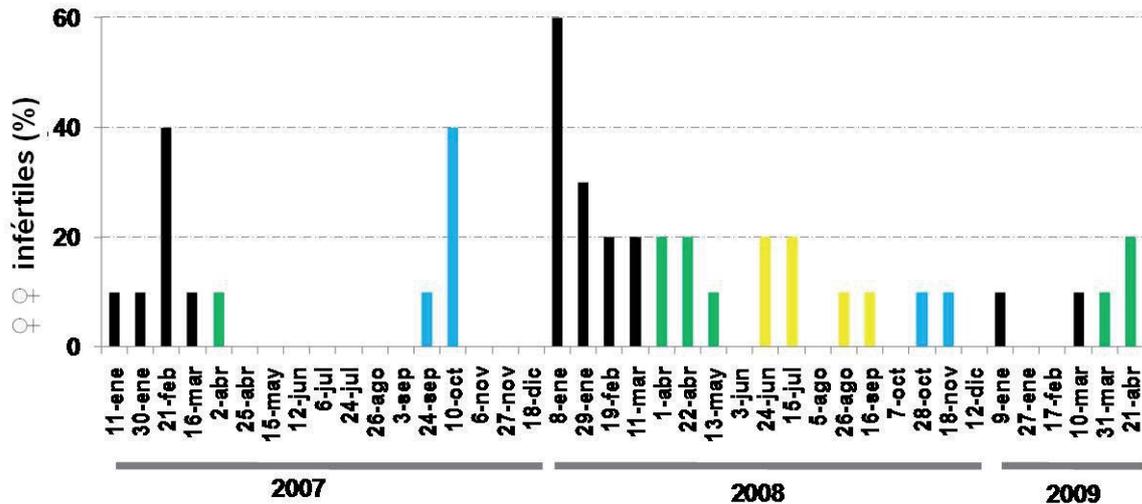


Figura 1.23. Distribución de las hembras infértiles según la fecha del muestreo. Los colores indican las fechas de muestreos que conforman las estaciones. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño.

La figura 1.23, representa el porcentaje de hembras infértiles en cada muestreo a lo largo de las diferentes fechas de muestreo. Las hembras infértiles no parecen localizarse en algún periodo estacional particular del año. El mayor porcentaje de hembras infértiles se encontró en el muestreo de la primera quincena de Enero de 2008 con un 60%, le siguieron los muestreos de Febrero y Octubre de 2007 con un 40%, seguido de un 30% en la segunda quincena de Enero de 2008 y 20 muestreos más presentaron entre el 10% y el 20% de hembras infértiles. Finalmente, en 16 fechas de muestreo no se encontraron hembras infértiles.

En la figura 1.24, se representa la distribución de las hembras recolectadas en cada fecha de muestreo según la categoría de edad asignada. Se observa un predominio de hembras de la categoría “maduras”, correspondiendo a un total de 180 hembras distribuidas en casi todas las fechas, excepto en la segunda quincena de Noviembre del 2007 y en la primera quincena de Enero del 2008. Le sigue la categoría “jóvenes”, con un total de 135 hembras, distribuidas en todas las fechas excepto en Febrero del 2007, segunda quincena de Agosto del 2008 y Abril del 2009. Se clasificaron 59 hembras en la categoría “viejas”, distribuidas a lo largo de 38 de las 40 fechas de muestreo. Finalmente, las hembras pertenecientes a la categoría “muy jóvenes” se encuentran en menor cantidad, siendo sólo 26 hembras distribuidas en 26 fechas. En esta distribución no se incluyeron las hembras infértiles.

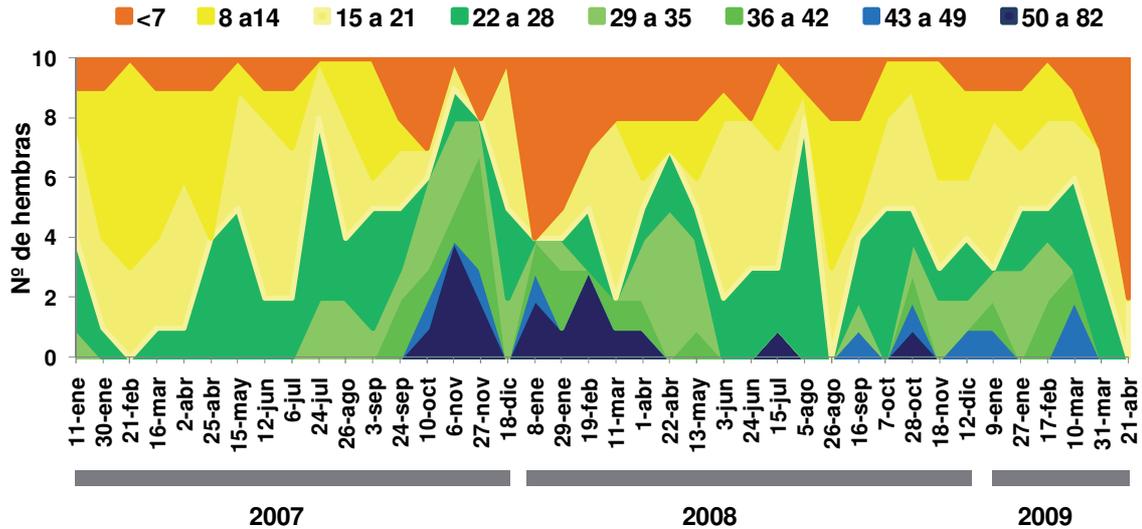


Figura 1.24. Número de hembras fértiles distribuidas según la categoría de edad asignada en cada fecha de muestreo. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 82 días).

La figura 1.25 muestra la fertilidad de las hembras recogidas en cada muestreo según su categoría de edad. La fertilidad más alta se da en las categorías de hembras “muy jóvenes” y “jóvenes”. La fertilidad de la categoría de hembras “maduras” se mantuvo más baja y constante durante todos los muestreos, siendo la fertilidad total de la categoría de hembras “viejas” la menor de todas, como era de esperar.

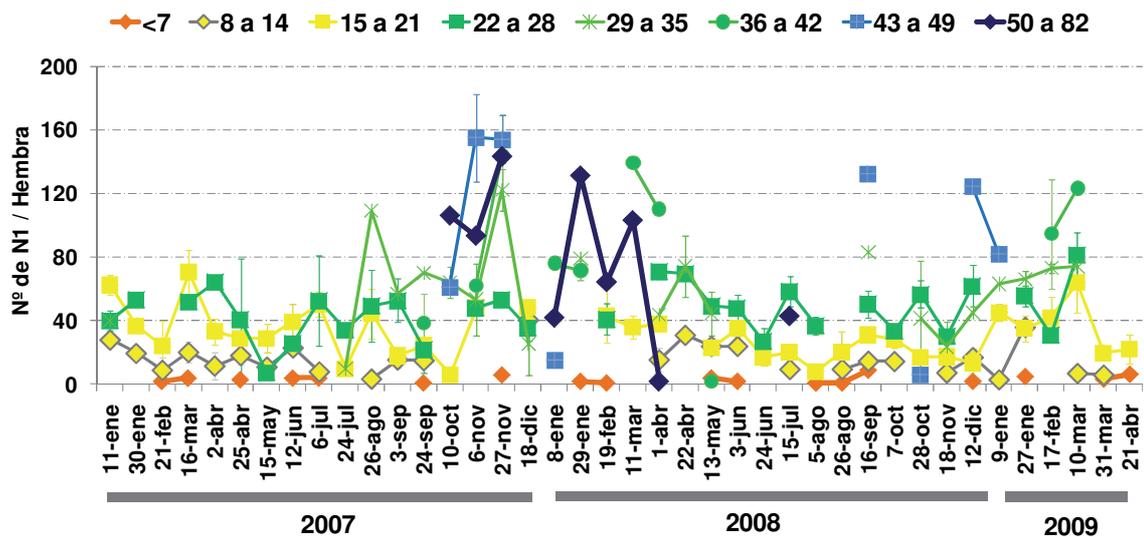


Figura 1.25. Número de ninfas (media \pm error típico) producidas por hembra según su categoría de edad y para cada uno de los muestreos realizados. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 82 días).

3.3.2. Parámetros biológicos en condiciones ambientales naturales

3.3.2.1. Supervivencia

Las hembras permanecieron vivas en el insectario un promedio de $50,27 \pm 41,42$ días (rango entre 3 y 148 días). Teniendo en cuenta el número medio de días en que permanecieron vivas las hembras y que cada hembra se cambió de cajita cada 3-4 días, se manipularon una media aproximada de 4160 cajas de ovoposición en los muestreos realizados entre Julio del 2007 y Abril del 2009.

En la figura 1.26 podemos ver el promedio de supervivencia de las hembras en el insectario en cada fecha de muestreo. El muestreo en que las hembras sobrevivieron más tiempo fue el de la primera quincena de Enero del 2009 con una media de $108,7 \pm 4,32$ días de vida. Le sigue con una media muy próxima con $104,2 \pm 14,2$ días la fecha de la segunda quincena de Octubre del 2008. El muestreo de la segunda quincena de Junio del 2008 es una de las fechas que denota menos días en que las hembras permanecieron vivas, con una media de $12,6 \pm 1,35$ días. Se compararon los días de vida según las estaciones, y del mismo modo, se encontraron diferencias significativas entre las estaciones ($F=15,08$; $gl= 7$; $P<0,0001$).

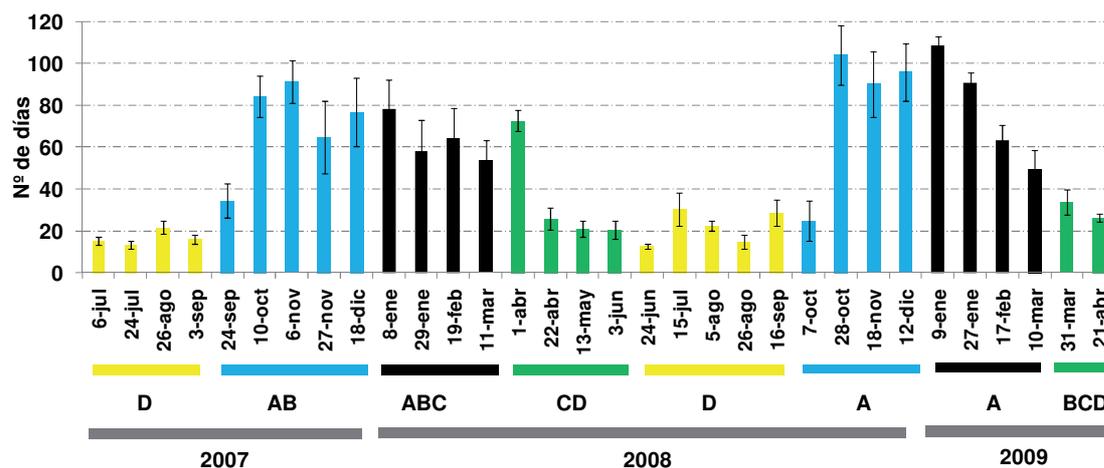


Figura 1.26. Número de días (media \pm error típico) en que las hembras de cada muestreo permanecieron vivas en el insectario. Los colores indican las estaciones del año. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño. Las estaciones con letras iguales no son significativamente distintas entre sí ($P<0,0001$).

Las hembras recolectadas en el otoño del 2008 y el invierno del 2009 tuvieron una supervivencia similar a las recolectadas en el otoño del 2007 y el invierno del 2008 pero significativamente mayor a las recolectadas en las demás estaciones. Las hembras de los veranos del 2007 y 2008 son las que vivieron menos aunque su supervivencia no fue significativamente distinta de las de las primaveras del 2008 y 2009.

Como era de esperar, existe una asociación positiva entre la supervivencia y la temperatura ($r=0,880$; $P<0,0001$). Las hembras sobreviven más días a menor temperatura y lo contrario, sobreviven menos días a medida que la temperatura aumenta.

3.3.2.2. Estado del desarrollo de los ovarios y del depósito seminal

De las 366 hembras diseccionadas 287 tenían oocitos corionados (tipo α) y/o vitelogénicos (tipo β), lo que represento un 78% de hembras grávidas. De estas, se registraron un total de 1461 oocitos con valores medios de $3,99 \pm 0,19$ oocitos/hembra (rango entre 1 y 18).

En la figura 1.27 se representa la media (\pm error típico) del número de oocitos totales (tipo α y β) registrados por hembra diseccionada. Se comparó el número de oocitos, registrándose las hembras según las estaciones las cuales presentaron diferencias significativas entre las estaciones ($F=7,66$; $gl= 9$; $P<0,0001$).

Las hembras con el menor número de oocitos se encontraron en los muestreos de Junio del 2008 ($1,33 \pm 0,33$ oocitos/hembra), mientras que las hembras con más oocitos se encontraron en los muestreos del 12 de Diciembre del 2008 ($8,87 \pm 1,32$), 01 de Abril del 2008 ($8,37 \pm 1,74$) y 21 de Febrero del 2007 ($8,1 \pm 1,23$). El invierno del 2008, fue la estación en que las hembras presentaron un número de oocitos ($6,55 \pm 0,59$ oocitos/hembra) significativamente mayor a las del verano del 2007 ($3,65 \pm 0,38$ oocitos/hembra) y a las del verano del 2008 ($1,96 \pm 0,21$ oocitos/hembra). En las demás estaciones las hembras presentaron valores similares de oocitos totales y sólo se diferenciaron estadísticamente de las del verano de 2008.

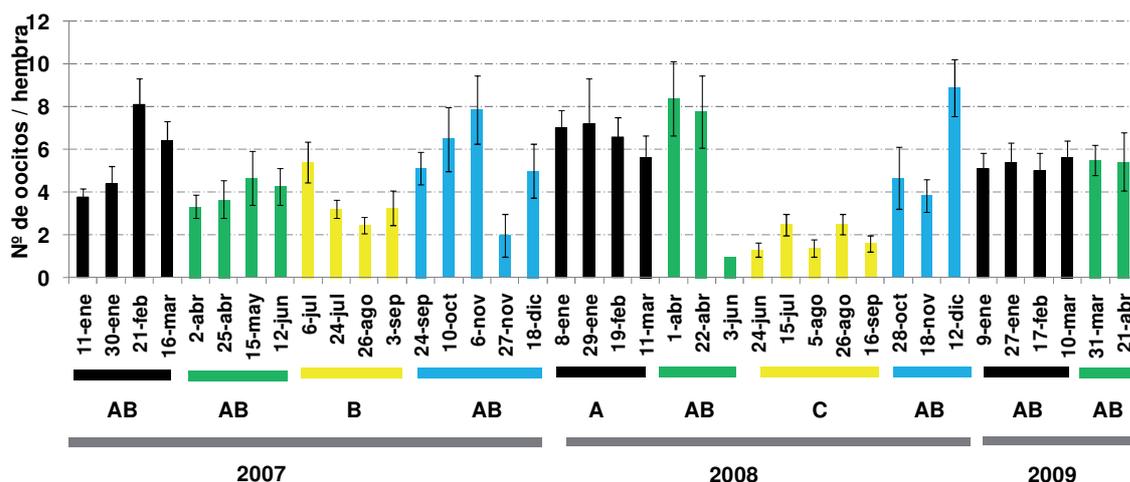


Figura 1.27. Número de oocitos totales ($\alpha + \beta$) (media \pm error típico) registrados en las hembras colectadas sobre *P. officinalis* en cada fecha de muestreo entre Enero de 2007 y Abril de 2009. Los colores indican las fechas de muestreos que conforman las estaciones. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño. Las estaciones con letras iguales no son significativamente distintos entre sí ($P < 0,0001$).

En la figura 1.28 se representa (media \pm error típico) el número de oocitos α y β registrados por cada hembra diseccionada. Se encontró un mayor número de oocitos α que de oocitos β (972 frente a 489). El valor medio fue de $3,38 \pm 0,15$ oocitos α /hembra, y de $1,70 \pm 0,09$ oocitos β /hembra. De las 287 hembras grávidas, 19 no presentaron oocitos α (6,6%), y 93 hembras no presentaron oocitos β (32,4%). El porcentaje de hembras sin oocitos β está distribuido en su mayoría entre los dos muestreos de Junio del 2008 y en los muestreos del 31 de Marzo y 21 de Abril del 2009.

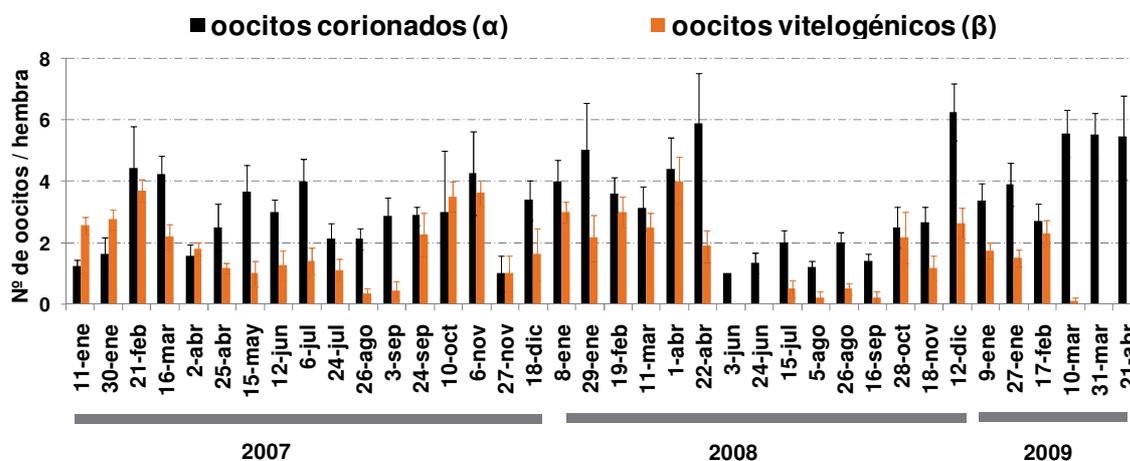


Figura 1.28. Número de oocitos corionados y vitelógenicos (media \pm error típico) registrados en las hembras recolectadas sobre *P. officinalis*.

Un total de 79 hembras no tenían oocitos α ni β , que correspondió al 22% del total. Estas hembras se distribuyeron en 24 fechas de muestreo como se registra en la figura 1.29. Los muestreos en que se registraron porcentajes de hembras sin oocitos superiores al 50% fueron los de Octubre del 2007 con un 78%, el de la segunda quincena de Noviembre del 2007 con un 67%, el de la primera quincena de Junio del 2008 con un 60% y el de la primera quincena de Noviembre del 2007 con un 56%. Los 20 muestreos restantes presentaron un porcentaje de hembras sin oocitos inferior al 50%.

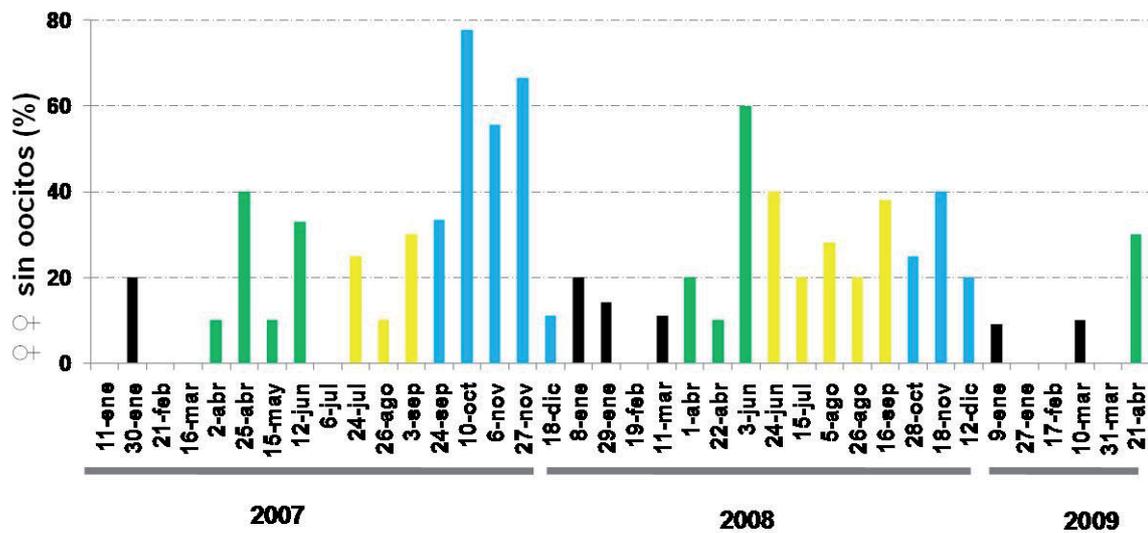


Figura 1.29. Porcentaje de hembras sin oocitos α o β en las diferentes fechas de muestreo. Los colores indican las fechas de muestreos que conforman las estaciones. Negro: invierno, Verde: primavera, Amarillo: verano, Azul: otoño.

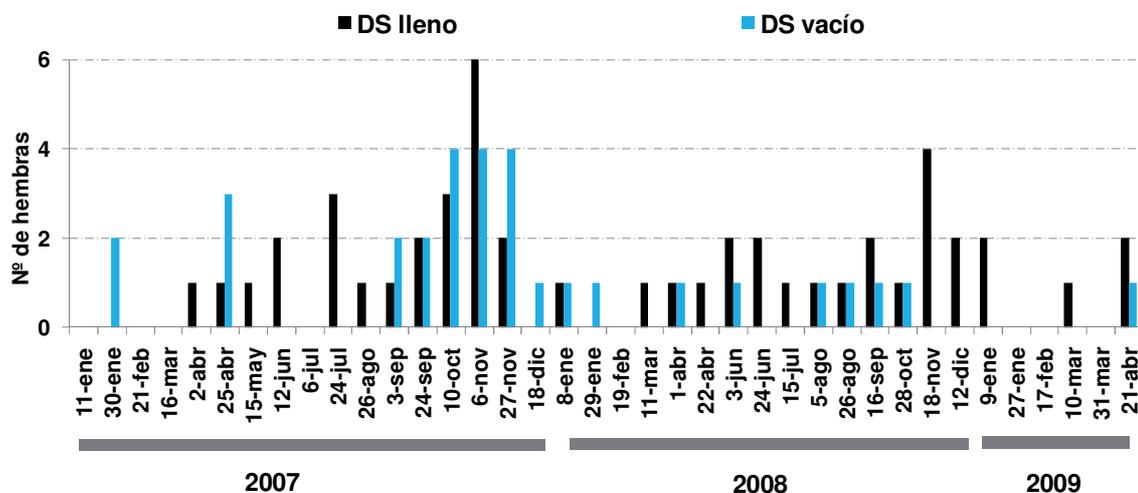


Figura 1.30. Estado el depósito seminal (DS) de hembras que no presentan oocitos corionados o vitelogénicos.

De las 79 hembras que no presentaron oocitos en sus ovarios, 48 tenían el depósito seminal lleno, correspondiendo al 61%. Estas hembras se distribuyeron en 27 muestreos, como se registra en la figura 1.30, de los cuales 13 (2 de Abril, 15 de Mayo, 12 de Junio, 24 de Julio, 26 de Agosto del 2007; 11 de Marzo, 22 de Abril, 24 de Junio, 15 de Julio, 18 de Noviembre, 12 de Diciembre del 2008; 9 de Enero y 10 de Marzo del 2009) presentaron todas las hembras con el depósito seminal lleno y los otros 14 muestreos presentaron hembras tanto con el depósito seminal lleno como vacío. Los muestreos del 30 de Enero, 18 de Diciembre del 2007 y 29 de Enero del 2008 solo presentaron hembras con el depósito seminal vacío.

3.3.2.3. Categoría de edades

Clasificamos las hembras de acuerdo a los días en que sobrevivieron en el insectario según las categorías utilizadas anteriormente con las hembras que se desarrollaron en la cámara de 25°C. Teniendo en cuenta que las hembras vivieron un rango de hasta 82 días a 25°C, mientras que en el insectario presentaron un rango de hasta 148 días, bastantes días más, en la última categoría se incluyeron a todas las hembras que vivieron más de 50 días.

En la figura 1.31, se observa la distribución de las 320 hembras mantenidas en condiciones ambientales naturales en diferentes categorías de edad y expresada como porcentaje. La mayoría eran hembras muy jóvenes que son el 45% que vivieron más de 43 días. El resto de las hembras se repartieron de forma muy parecida entre todas las categorías de edad consideradas.

En la figura 1.32, se observa la distribución de las hembras recolectadas en cada muestreo según las diferentes categorías definidas previamente por edad (días). Predominan las hembras “muy jóvenes” en todos los muestreos excepto para los de Julio, Agosto, la primera quincena de Septiembre del 2007, Mayo, Junio, Agosto del 2008 y Abril del 2009. Las hembras “jóvenes” y “maduras” predominan en los muestreos de primavera y verano de todos los años.

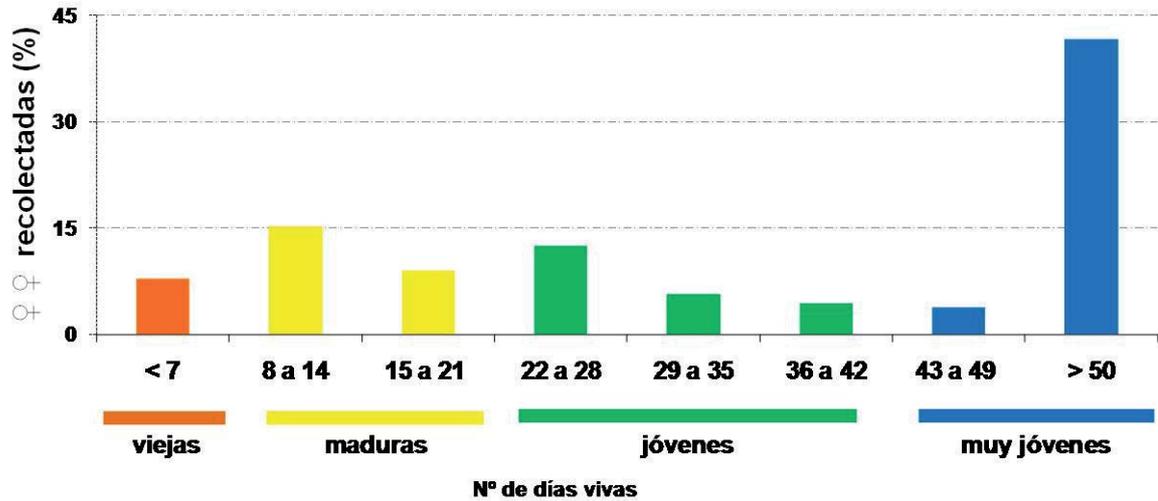


Figura 1.31. Distribución de todas las hembras recolectadas en los muestreos (n=320) por categorías según el número de días que sobrevivieron en el insectario en condiciones ambientales naturales. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 148 días).

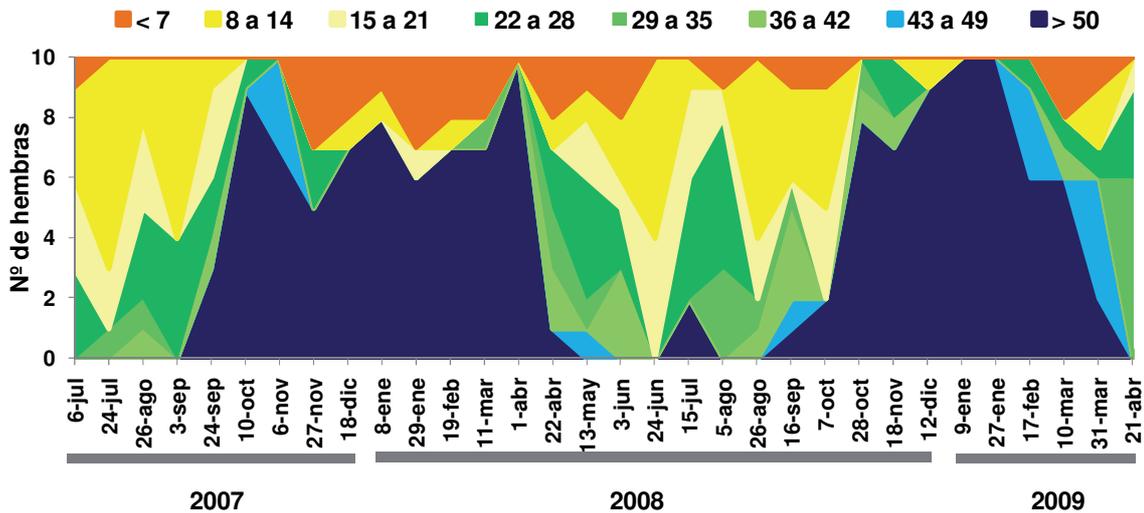


Figura 1.32. Número de hembras por categoría de días en que permanecieron vivas en el insectario en condiciones naturales ambientales. Naranja: viejas (sobreviven menos de 7 días), Amarillo: maduras (sobreviven entre 8 y 21 días), Verde: jóvenes (sobreviven entre 22 y 42 días), Azul: muy jóvenes (sobreviven entre 43 y 148 días).

3.3.2.4. Comparación entre las hembras expuestas en condiciones controladas y en condiciones ambientales naturales

Las hembras mantenidas en la cámara en condiciones controladas acumularon un promedio de $521,52 \pm 95,27$ grados día ($^{\circ}\text{D}$), (rango entre 98,8 y 2074 $^{\circ}\text{D}$) durante el tiempo que sobrevivieron. El valor más elevado se encontró en el muestreo de la primera quincena de Noviembre del 2007 con una media de $1024,7 \pm 161,62$ $^{\circ}\text{D}$ y el valor más bajo se encontró en el muestreo de Abril del 2009 con una media de $176,2 \pm 34,42$ $^{\circ}\text{D}$.

Las hembras expuestas a temperatura ambiente en el insectario acumularon un promedio de $705,72 \pm 114,31$ $^{\circ}\text{D}$ (rango entre 43 y 1983,5 $^{\circ}\text{D}$) durante el tiempo que sobrevivieron. El muestreo de la primera quincena de Abril del 2008 presentó el valor medio más alto con $1214,2 \pm 98,72$ $^{\circ}\text{D}$, y el muestreo de la segunda quincena de Junio del 2008 mostró el valor medio más bajo con $307,9 \pm 31,66$ $^{\circ}\text{D}$.

Para comparar los grados día acumulados por las hembras mantenidas en la cámara a 25°C con las del insectario, se agruparon los muestreos según la temperatura media del día de la recolección y se establecieron tres rangos de temperaturas:

- a) entre 20 y 25°C, característica de la estación estival;
- b) entre 15 y 20°C, característica de la primavera y el otoño;
- c) entre 9 y 15°C, característica de la estación invernal.

En la figura 1.33, se presentan los grados día acumulados por las hembras recolectadas en los distintos muestreos mantenidas a cámara a 25°C y en el insectario. Al comparar los $^{\circ}\text{D}$ acumulados por las hembras de la cámara y del insectario durante los muestreos correspondientes a la estación estival (Junio, Julio, Agosto y Septiembre), se esperaría que no se presentaran diferencias en los $^{\circ}\text{D}$ acumulados entre estas. Esto debido a que la temperatura de la cámara a 25°C sería la más parecida a la encontrada en el insectario durante el verano.

Los resultados confirman nuestra hipótesis, excepto para el muestreo del 24 de Julio de 2007, donde se presentó una mayor cantidad de °D acumulados en las hembras de la cámara que las del insectario ($t=4,51$; $gl=9$; $P=0,0015$).

Para los muestreos con temperaturas medias entre los 15 y los 20°C se hallaron diferencias significativas en dos muestreos (10 Octubre 2007 y 28 Octubre 2008) ($t=2,54$; $gl=9$; $P=0,0318$ y $t=3,55$; $gl=9$; $P=0,0062$ respectivamente), siendo mayor los °D acumulados por las hembras del insectario que las de la cámara. Al comparar las 17 fechas de muestreos que corresponden a temperaturas invernales, se encontraron diferencias significativas en seis fechas, (1 de Abril, 18 de Noviembre y 12 de Diciembre del 2008, 9 y 27 de Enero y 21 de Abril del 2009) ($t=5,33$; $gl=9$; $P=0,0005$; $t=2,84$; $gl=9$; $P=0,0195$; $t=2,29$; $gl=9$; $P=0,0479$; $t=2,88$; $gl=9$; $P=0,0183$; $t=5,10$; $gl=9$; $P=0,0006$; $t=6,98$; $gl=9$; $P<0,0001$) siendo siempre mayor la media de °D acumulados por las hembras del insectario que por las de la cámara.

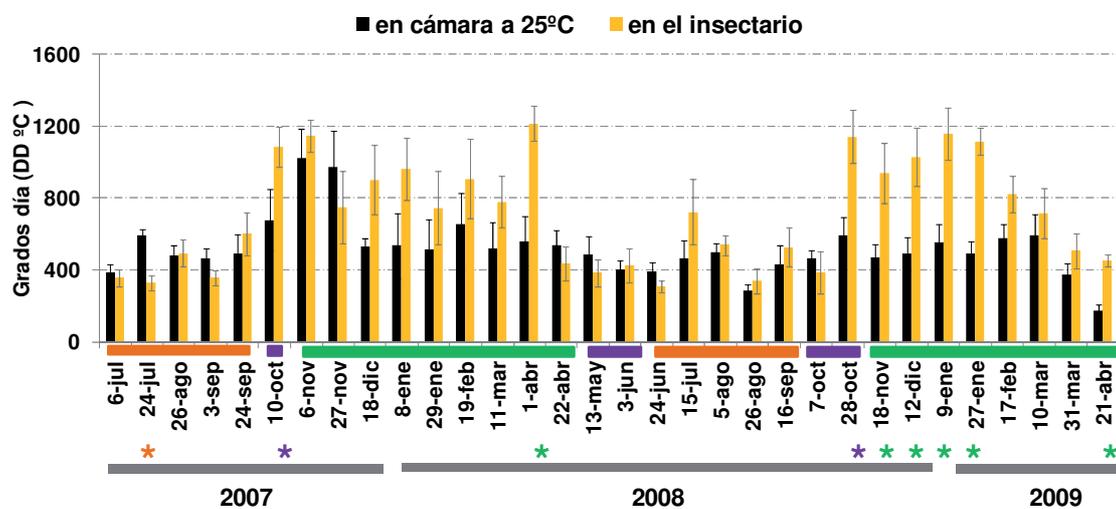


Figura 1.33. Grados día acumulados (media \pm error típico) por las hembras durante el tiempo que sobrevivieron en la cámara a 25°C y en el insectario en condiciones ambientales naturales en cada fecha de muestreo. Los muestreos con (*) indica que los grados día entre las hembras del laboratorio y las del insectario son significativamente diferentes. Las líneas de colores en el eje de las abscisas indica el rango de temperatura: Naranja: entre 20 y 25°C; Lila: entre 15 y 20°C; Verde: entre 9 y 15°C.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Parámetros biológicos de las hembras de *M. melanotoma* a 25°C

La supervivencia de las hembras en la cámara de 25°C permitió realizar una estimación de las edades de estas hembras en cada uno de los muestreos y esta edad estimada estaba asociada positivamente con la fertilidad de las hembras: aquellas hembras que sobrevivieron más días fueron las que produjeron más ninfas.

Al examinar la supervivencia media de las hembras en cada fecha de muestreo (**Fig. 1.8**) no se observaron diferencias muy marcadas entre las fechas examinadas, aunque sí parece que las hembras presentaron una fertilidad menor durante los meses más cálidos (**Figs. 1.9 y 1.10**). Las hembras recolectadas durante los meses más cálidos parecen ser de una edad más avanzada, ya que durante los meses de Junio y Julio del 2006 no se encontraron hembras de la categoría “muy jóvenes” (**Fig. 1.15**), que son las que presentan una mayor fertilidad. Además, la fertilidad media por hembra de las categorías “jóvenes” y “maduras” durante este periodo resultó menor que en otros periodos (**Fig. 1.16**). Las temperaturas registradas durante este periodo fueron más elevadas que en los veranos del 2007 y del 2008, y las plantas huésped presentaban un estado vegetativo deficiente ya que algunas hojas estaban cubiertas de polvo y comenzaban a secarse. En condiciones normales, las plantas de *D. viscosa* deberían estar verdes y frondosas antes de iniciar la floración, así como Vila (2004) las describió durante sus muestreos. El mal estado de la planta huésped probablemente influyó negativamente en su disponibilidad y calidad como alimento, refugio y substrato de puesta para *M. melanotoma*, afectando el normal desarrollo y reproducción. Una baja en la calidad y oferta de material verde (biomasa) de las plantas puede inducir a que los insectos se desplacen en busca de otras plantas refugio. En nuestro caso es probable que las hembras que se recolectaron durante los meses de Junio y Julio fueran hembras que no alcanzaron a “migrar” a otras plantas donde podrían haber encontrado unas mejores condiciones. Esto explicaría la dificultad que se presentó durante estos meses para encontrar hembras ya que la disponibilidad de individuos sobre las plantas de *O. natrix* y *D. viscosa* en este periodo fue mucho menor que en el resto de

los muestreos. Cuando las plantas estaban en buenas condiciones de desarrollo fue más fácil encontrar y recolectar individuos.

Es importante tener en cuenta que aunque las hembras se hayan evaluado en condiciones controladas, a una temperatura favorable y con alimento *ad libitum*, con discos de tabaco como sustrato de ovoposición, factor que pudo haber condicionado los resultados de supervivencia y de fertilidad ya que *M. melanotoma* parece no estar adaptado a desarrollarse sobre solanáceas, tales como el tomate y el tabaco. Las medias de supervivencia y fertilidad obtenidas en este trabajo fueron menores que las mostradas por Perdikis *et al.* (2007) sobre hojas de *D. viscosa* como sustrato de ovoposición donde obtuvieron longevidades de hasta 53 días para los machos y de 47 días para las hembras, y una fecundidad acumulada de $69,55 \pm 5,95$ huevos/hembra.

En conclusión, durante el periodo de muestreo de Marzo a Noviembre de 2006, se encontraron hembras de *M. melanotoma* de todas las categorías de edades estimadas que produjeron ninfas en la cámara de 25°C durante todos los muestreos y con un alto porcentaje de fertilidad (>90%).

4.2. Parámetros biológicos de las hembras de *M. pygmaeus*

Los resultados de supervivencia del presente trabajo en la cámara de 25°C permitieron realizar una estimación de las edades de estas hembras en cada uno de los muestreos, los cuales estaba asociada positivamente con la fertilidad de las hembras. Dado que la supervivencia fue mucho mayor que en el caso de *M. melanotoma* en la medida que las categorías de edades comprendían rangos más amplios de tiempo.

La supervivencia de las hembras de *M. pygmaeus* en la cámara a 25°C no fue muy variable durante los años de muestreos (**Fig. 1.17**), y no hubo un patrón que se pudiera relacionar con la época del año. Pero, las hembras recolectadas durante el otoño del 2007 presentaron una mayor supervivencia (**Fig. 1.17**) así como una mayor fertilidad media (**Fig. 1.18**) y la composición de edades estimada indicaba que había un porcentaje mayor de hembras “muy jóvenes” que en otras épocas (**Fig. 1.24**). La calidad de las plantas no explicaría en este caso este resultado ya que durante todo el 2007 las plantas presentaron

un peor estado vegetativo en comparación a las plantas muestreadas durante todo el 2008. El buen estado vegetativo de las plantas muestreadas en el 2008 pudo favorecerse por la alta pluviosidad registrada durante ese año. Tampoco parece que las temperaturas medias durante este período puedan explicar este resultado, ya que no fueron muy distintas de las del otoño del 2008 (**Fig. 1.7**).

Gran parte de la población muestreada se distribuyó entre las categorías “maduras” y “jóvenes” (**Fig. 1.21**) y estas categorías fueron las que presentaron una fertilidad media superior a la de las otras categorías (**Fig. 1.25**). Sin embargo, cada año fue diferente y se encontraron más hembras de las categorías “muy jóvenes” y “viejas” en el 2008 que en el 2007. Las hembras infértiles representan solo el 11% de las hembras muestreadas, pertenecían mayoritariamente a la categoría “viejas” (**Fig. 1.22**) y aparecieron durante todas las épocas del año (**Fig 1.23**). Esta distribución de hembras infértiles según la categoría de edad estimada, así como las de las hembras muestreadas sobre *O. natrix* y *D. viscosa* (**Fig. 1.13**), confirman la hipótesis de que muchas hembras de esta categoría posiblemente se encuentren en estado post-vitelogénico y por esta razón no produjeran ninfas.

Las hembras de *M. pygmaeus* mantenidas en condiciones naturales presentaron una supervivencia variable y relacionada con la época del año. Las hembras sobrevivieron muchos más días durante los meses de otoño y de invierno que durante los meses de verano y de primavera (**Fig. 1.32**). Esto probablemente se deba al efecto combinado de la temperatura y del fotoperiodo. Así, Perdikis y Lykouressis (2002) muestran que la longevidad, a pesar de ser muy variable, se acorta mucho a medida que aumenta la temperatura, registrando longevidades medias de 129, 49 y 38 días a temperaturas de 15°, 25° y 30°C respectivamente.

Al evaluar el desarrollo de los ovarios se encontró un porcentaje alto de hembras grávidas (78%). Se encontraron diferencias significativas en el estado del desarrollo de los ovarios según las épocas del año, y en el invierno de 2008 se hallaron las hembras con el mayor número de oocitos en relación al verano del 2007 y del 2008 en que las hembras tenían menos oocitos en sus ovarios (**Fig. 1.27**). En todas las fechas de muestreo, desde Enero del 2007 a abril del 2009, se hallaron hembras con oocitos corionados, y en casi todas las hembras también oocitos vitelogénicos. Lo que indica que las hembras están produciendo

huevos continuamente a lo largo de todo el año. Esto es de esperar en hembras de esta especie que presentan ovarios del tipo telotrófico, caracterizados por producir huevos de forma continua (Nation, 2002). El desarrollo asincrónico de los ovariolos hace que tengan oocitos de diferentes estados de maduración de forma simultánea, como se describe en otro hemíptero, *Rhodnius prolixus*, (Pratt y Davey, 1972).

A lo largo de todo el periodo de muestreo se hallaron hembras sin oocitos desarrollados y únicamente sobrepasaron el 50% en tres fechas del otoño del 2007 y el 3 de junio del 2008 (**Fig. 1.29**). Las hembras que no presentaron oocitos desarrollados seguramente eran “muy jóvenes” y estaban iniciando su actividad reproductora, o lo contrario, eran hembras “viejas” en estado de desarrollo post-vitelogénico. Tras evaluar el estado del depósito seminal, el 61% de las hembras sin oocitos presentaron el depósito seminal lleno, como por ejemplo se observó en las hembras recolectadas en el otoño del 2007 y en junio del 2008. Esto indica que las hembras estaban recién acopladas, es decir, que estaban reproductivamente activas. Esta afirmación se confirma con los resultados obtenidos en el capítulo 3, donde se expone que después de una cópula el depósito seminal de *M. pygmaeus* tarda aproximadamente una semana en vaciarse. Por lo tanto, una parte de estas hembras podrían entrar en la categoría de “muy jóvenes” que todavía no han desarrollado sus ovarios. Algunas de las hembras sin oocitos desarrollados recogidas durante los muestreos del otoño del 2007 tenían el depósito seminal vacío. Estas hembras probablemente eran hembras “viejas” ya que una proporción de las hembras de ese periodo sobrevivieron menos de 7 días (**Fig. 1.32**). Cabe destacar que ni en los inviernos del 2007, 2008 y 2009, ni en el otoño del 2008 se hallaron más del 50% de hembras sin oocitos. No parece pues, que las hembras de *M. pygmaeus* entren en diapausa reproductora en nuestra región, dado el alto porcentaje de hembras que presentaron oocitos en sus ovarios durante todo el año. Cuando la etapa de desarrollo del individuo que sufre la diapausa es el adulto, la inactividad se presenta en los ovarios (Beck, 1980), además, según Tauber *et al.* (1986) para que una especie sea considerada diapausante se debería encontrar 50% de hembras infértiles en un determinado periodo del año.

Al comparar los grados día acumulados por las hembras de la cámara a 25°C y las hembras del insectario se encontró que las hembras del insectario acumularon más °D durante la estación invernal. Esto puede deberse a que a mayor temperatura las hembras tienen un metabolismo más activo y viven menos días ya que acumulan más rápidamente

los grados necesarios para desarrollarse, para producir y para ovopositar huevos. En cambio, a temperaturas por debajo de su umbral de desarrollo las hembras paralizan su desarrollo para mantenerse vivas y por ello viven más días (Zalom *et al.*, 1983). Esto se observó en algunos meses de otoño, durante todo el invierno y en algunos meses de primavera en que la temperatura media osciló entre los 9 y los 15°C. Durante todo este periodo hubo horas en diversos días en que la temperatura estuvo por debajo de 7,2°C, umbral de desarrollo de *M. pygmaeus*. En los muestreos donde la temperatura media fue mayor a 15°C, es decir en los meses de verano, algunos meses de otoño y algunos meses de primavera, no se observaron diferencias entre los °D acumulados por las hembras de la cámara y las del insectario.

Para concluir, los resultados del presente trabajo nos indican que las poblaciones de *M. pygmaeus* que se encuentran sobre *P. officinalis* están reproductivamente activas a lo largo de todo el año sin mostrar ningún signo de diapausa. Por tanto, las poblaciones colonizadoras de los cultivos de primavera y verano están bien preparadas a nivel reproductivo para instalarse y dar lugar a nuevas generaciones, aunque hay que tener en cuenta que la dinámica poblacional está relacionada además con la temperatura, precipitación y humedad relativa, así como con el fotoperiodo y con la fenología de la planta. Una posible causa de los fallos en la eficacia de estos depredadores para controlar las plagas de los cultivos de otoño-invierno pueden ser las bajas temperaturas de los invernaderos sin calefacción, que limitan su desarrollo preimaginal y su ovoposición. Así, en condiciones invernales (16:11°C y fotoperiodo 9,5 luz: 14,5 oscuridad) Malo (2009) registra una fecundidad en este depredador de 0,5 huevos por hembra por día frente a 1,5 huevos por hembra por día en condiciones estivales (31:21°C y fotoperiodo 13,5 luz: 10,5 oscuridad) y una tasa de aumento de la población de 0,013 en invierno y de 0,080 en verano.

Capítulo 2

**Detección del huevo en las hembras del depredador polífago *Macrolophus pygmaeus*
(Heteroptera: Miridae) por medio de técnicas serológicas**

Ovarios de *M. pygmaeus* con huevos corionados en todos sus ovariolos. Los oviductos laterales presentan igualmente huevos corionados que se dirigen al tracto vaginal. En el medio de la cámara vaginal se observa el oviscapto, estructura por la cual son depositados los huevos en el tejido vegetal.

Este trabajo ha sido publicado en el Journal of Pest Science.

Índice de impacto: 0,818; Entomología 41/74.

Franco, K., Aramburu, J., Agustí, N., Castañé, C. 2010. Egg detection in females of the polyphagous predator *Macrolophus pygmaeus* (Heteroptera: Miridae) by serological techniques. Doi 10.1007/s10340-010-0318-1.

1. INTRODUCCIÓN

Macrolophus pygmaeus es un insecto nativo del área mediterránea, y es usado como agente de control biológico en el tomate y otros cultivos hortícolas. Hasta hace poco, *M. pygmaeus* se ha identificado de forma errónea sobre el cultivo de tomate como *M. melanotoma* Costa (= *caliginosus* Wagner) y actualmente se sigue nombrando como *M. caliginosus* por las empresas que comercializan fauna útil (Martinez-Cascales *et al.* 2006). Las poblaciones naturales son abundantes y los programas de conservación han sido desarrollados para los cultivos hortícolas al aire libre (Alomar *et al.*, 2002; Castañé *et al.*, 2004). En invernaderos, el método de control biológico consiste en inocular estos depredadores en las etapas tempranas de desarrollo del cultivo (Gabarra y Besri, 1999; Castañé, 2002; Alomar *et al.*, 2006). Los individuos introducidos así como los colonizadores potenciales de los cultivos deberían ser capaces de establecer rápidamente una población en el cultivo y poder controlar las poblaciones de plagas. Por lo tanto, es importante poder predecir la fecundidad de las hembras de *M. pygmaeus* de las poblaciones introducidas o de las poblaciones colonizadoras para determinar el éxito de su establecimiento en el cultivo.

La fecundidad (tanto diaria como acumulada) es la medida más común para evaluar el buen estado reproductivo en colonias de insectos. Sin embargo, la evaluación de la fecundidad en los míridos es un procedimiento tedioso y que lleva mucho tiempo. Los huevos son puestos dentro de las venas de la planta y los tallos, y no se ven fácilmente porque están completamente insertados en los tejidos de planta. Por esta razón, la fertilidad, el número de ninfas de primer estadio producidas, es el parámetro que se evalúa con frecuencia. Sin embargo, el tiempo prolongado de embriogénesis de *M. pygmaeus*, ($11 \pm 0,05$ días en 25°C; Castañé y Zapata, 2005), lo hace un procedimiento largo. Una posibilidad de acortar este proceso es el de evaluar el desarrollo ovárico por medio de la disección de las hembras y anotando el número de huevos desarrollados y subdesarrollados (Vandekerkhove *et al.*, 2006), pero esto es un procedimiento tedioso.

Cuando los ovarios maduran, los oocitos en desarrollo absorben la vitelogenina, un precursor producido en los cuerpos grasos y transportado por la hemolinfa que se transforma en vitelina (la proteína principal del huevo) como parte de un proceso llamado vitelogénesis. *M. pygmaeus* tienen ovarios telotróficos que producen huevos continuamente durante toda su vida (Fauvel *et al.*, 1987). Los ovariolos presentan un desarrollo asincrónico, lo que determina que estén presentes simultáneamente oocitos en diferentes estados de maduración, como ya se ha observado en otros insectos hemípteros; por ejemplo, *Rhodnius prolixus* (Pratt y Davey, 1972). Tal y como sucede en otros insectos míridos, se pueden observar tres tipos distintos de oocitos: previtelogénico, cuando los oocitos comienzan a crecer; vitelogénico, cuando los oocitos comienzan a acumular vitelina; y corionados, cuando los oocitos están llenos de vitelina y desarrollan el corion (Ma y Ramaswamy, 1987). Los oocitos vitelogénicos sólo están presentes en *M. pygmaeus* 3-4 días después de la muda a adultos y los huevos corionados después de 5 días (Castañé *et al.*, 2007). La cantidad de vitelina y vitelogenina puede ser una medida del buen estado reproductivo y un parámetro para estimar la fecundidad potencial. Algunos estudios han utilizado la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) para determinar el contenido de vitelina y vitelogenina en hembras, como por ejemplo para el parasitoide *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Dong *et al.*, 2007), el insecto hematófago *Dipetalogaster máxima* (Heteroptera: Reduviidae) (Aguirre *et al.*, 2008), y los heterópteros *Podisus maculiventris* y *Orius insidiosus* (Shapiro *et al.*, 2000; Shapiro y Ferkovich, 2002).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica serológica para evaluar el contenido de proteína del huevo de las hembras de *M. pygmaeus*. Por esta razón, fueron desarrollados un antisuero policlonal y un protocolo ELISA apropiado, y fueron probados sobre hembras de una colonia de laboratorio así como sobre hembras recolectadas durante dos años sobre la planta ruderal *Parietaria officinalis* (L). Esta planta ha sido citada por ser refugio para este depredador (Gabarra *et al.*, 2004).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Insectos

La cría de *M. pygmaeus* fue mantenida en una cámara de 25 ± 2 ° C, 70 el 10 % \pm HR y con un fotoperíodo de 16h Luz : 8h Oscuridad. Los insectos fueron criados sobre plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), y alimentadas con huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) como presa (Agustí y Gabarra, 2009). La colonia era renovada periódicamente con insectos traídos de campos de tomate locales cerca de Barcelona, España.

A cada hembra se le corto y se retiro el abdomen bajo un estéreo-microscopio. El abdomen fue diseccionado transversalmente por el lado izquierdo sobre una la solución de salina (115 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂ y 2 mM de tampón de fosfato de sodio; pH 7,2) de forma que cubriera totalmente el abdomen. Se anotó el número de oocitos corionados y vitelogénicos presentes en todos los ovariolos de los dos ovarios. Finalmente cada abdomen completo fue almacenado a -20°C hasta ser analizado por ELISA.

Según Constante *et al.* (1994), hay una relación entre la longitud y el peso de los huevos de *M. pygmaeus*, así; un huevo corionado recién depositado mide 0,84 mm de largo y pesa alrededor de 15 µg. Para tener una valoración de la cantidad total presente de proteína de huevo en una hembra de *M. pygmaeus*, se tomaron medidas de la longitud de 10 oocitos corionados y de 10 oocitos vitelogénicos bajo un estéreo- microscopio (50X) usando el programa de Imagen NIH ([http:// rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html](http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html)). Después de anotar el número de oocitos corionados y vitelogénicos por hembra y con el valor de peso medio calculado según Constante *et al.* (1994), estimamos la cantidad total de proteína de huevo para cada categoría de huevos considerada. *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) fue criado sobre plantas de col en el IRTA, y los huevos de *E. kuehniella* fueron comprados en BIOTOP, Valbonne, Francia.

2.2. SDS-PAGE

Para caracterizar las subunidades de la proteína los extractos de huevo se sometieron a un proceso de electroforesis a través de geles de poliacrilamida (7,5%) con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en tampón de Tris-glicina (0,025 M Tris, pH 8,3; 0,192 M glicina, el 1% SDS) utilizando una cubeta de electroforesis Minivariante (BioRad) a 10 mA durante 3 h a 4°C. Dos extractos de proteína de 20 y 10 huevos corionados, una hembra inmadura de 1-día de edad, un macho maduro y una hembra maduros de 15-días con huevos corionados fueron analizados mediante el gel de SDS-PAGE. Las muestras preparadas en tampón (0,0125 M Tris-HCL, pH 6,8; el 1% SDS, el 20% glicerol, el 5% β -mercaptoetanol, el 0,001 % azul de bromofenol) se hirvieron durante 5 min antes de cargar el gel (Laemmli, 1970). El gel se tiñó durante 30 min en azul de Coomassie -R250 al 0,25% (50% de metanol, 10% de ácido acético) y se desteñido con baños sucesivos en una mezcla de metanol al 10% y ácido acético al 10%. Como marcador de pesos moleculares se utilizó una serie de proteínas estándar (Sigma St. Louis MO, EE.UU.). La movilidad electroforética de las distintas proteínas estándar se representó en una escala logarítmica para obtener una relación lineal respecto de los correspondientes pesos moleculares. El peso molecular de cada una de los componentes (bandas) se determinó por extrapolación en esta misma gráfica.

2.3. Producción de un antisuero policlonal frente a las proteínas del huevo de *Macrolophus pygmaeus*

Un extracto de huevos de *M. pygmaeus* se utilizó como antígeno para desencadenar la respuesta inmune. Los huevos fueron obtenidos mediante la disección de hembras grávidas (7 a 14 días de edad). Los ovarios se separaron con cuidado desde el abdomen, fueron sumergidos en una solución salina y los huevos corionados se retiraron y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. El extracto de huevo se obtuvo triturando 1000 huevos en 5 ml de PBS (0,15M NaCl en 0,1M tampón fosfato, pH 7,4), seguido de una centrifugación a 10000 xg durante 15 min. El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se determinó por el método de azul de Coomassie. Un conejo Californiano x Nueva Zelanda fue inmunizado con 6 inyecciones semanales de 500 mg/ml de la solución del antígeno en el Servicio de Producción de la CID-CSIC

(Barcelona, España). La primera inyección fue intramuscular para minimizar el riesgo de shock anafiláctico y se utilizaron 0,5 ml de la solución de antígeno mezclado con adyuvante de Freund incompleto (1v:1v). Para permitir la inducción de una inmunización más rápida. Las inyecciones posteriores se realizaron por vía intravenosa para inducir una inmunización más rápida. En cada una de ellas se utilizó 1 ml de la solución de antígeno. El sangrado comenzó una semana después de la última inyección. El antisuero se obtuvo por centrifugación a 2000 xg durante 15 min de la sangre previamente coagulada a temperatura ambiente durante 2 h y luego se almacenó a -20°C para su uso posterior.

2.4. Pruebas de detección mediante la técnica ELISA Indirecto

El antisuero se utilizó aplicando la técnica ELISA (Clark y Adams, 1977) en placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) siguiendo el método indirecto descrito por Galipienso *et al.*, (2005). Como muestra se utilizó el abdomen de una hembra triturando con un micromortero en 100 µl de tampón carbonato (35 mM de bicarbonato sódico y 15 mM de carbonato sódico a pH 9,6) (CB). Las placas fueron tapizadas con 100 µl por pocillo del extracto de la muestra diluido 1/10 en CB mediante incubación a 4°C durante 16 h. Una vez fijado el antígeno, los posibles espacios libres del pocillo se bloquearon con leche descremada en polvo al 2% en PBS mediante incubación a 37°C durante 30 min. Después se añadieron 100 µl por pocillo del antisuero policlonal a la dilución adecuada en PBS para que se uniese específicamente al antígeno mediante incubación durante 3 h a 37°C. A continuación se añadieron inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma) a la dilución recomendada en PBS y se incubaron a 37°C durante 3 h. Después de cada etapa, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (dilución media de PBS con 0,05% de Tween-20). Por último, se añadieron 150 µl por pocillo de la solución de sustrato (1 mg x ml⁻¹ de P-nitrofenil fosfato en tampón dietanolamina 10%, pH 9,8) y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h hasta la formación del color. Los valores de absorbancia se midieron a 405 nm en un lector Multiskan (Labsystem Barcelona, España). El título o máxima dilución del antisuero a cual es posible detectar el antígeno homólogo y la dilución óptima de uso se determinaron probando sucesivas diluciones medias a partir de una dilución inicial de 1/1000 del antisuero bruto. El extracto de 1 huevo por pocillo de *M. pygmaeus* en CB se utilizó como antígeno homólogo y 100 mg por pocillo de BSA

(albúmina sérica bovina) como control negativo. La sensibilidad del antisuero se determinó probando diluciones medias sucesivas del antígeno homólogo en CB a partir de extractos de 1 huevo por pocillo y el control negativo utilizando el antisuero a la dilución óptima de uso previamente determinada.

Una vez evaluado el antisuero se utilizó para evaluar la presencia de la proteína del huevo en hembras de *M. pygmaeus* aplicando el mismo método ELISA indirecto. En total se analizaron 57 hembras de diferentes edades (1 a 7 semanas de edad) procedentes de la cría en laboratorio. Las hembras con menos de 24 h después de mudar a adultos, no han comenzado el proceso de ovogénesis y se utilizaron como control negativo. Una muestra se consideró positiva para la presencia de proteína de huevo cuando los valores de absorbancia obtenidos fueron superiores al valor promedio + 3 veces la desviación estándar obtenida con los controles negativos, así pues se estableció el “punto de corte” (Sutula *et al.*, 1986).

Con el fin de reducir las reacciones inespecíficas, el antisuero policlonal bruto fue agotado con extracto de una hembra de menos de 24 h de edad. El abdomen de la hembra se homogeneizó en 0,5 ml de una dilución 1/200 en PBS del antisuero. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C y se clarificó por centrifugación a baja velocidad a 7000 xg durante 20 min y se descartó el precipitado. Las pruebas de ELISA indirecto se realizaron como se describe arriba, usando una dilución adicional 1/200 del antisuero agotado proporcionando una dilución final de 1/40.000. Este antisuero agotado se probó analizando 70 hembras de diferentes edades (1 a 7 semanas de edad) procedentes de la cría de laboratorio.

Con el propósito de relacionar la carga de huevos de diferentes hembras de *M. pygmaeus* de laboratorio y los valores de absorbancia se probaron tanto el antisuero bruto como el antisuero agotado mediante la técnica ELISA. Para ello se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de contraste de Wilcoxon para muestras pareadas. La prueba de Bonferroni se ha aplicado para la corrección del error tipo I.

Para evaluar la detección de precursores de la proteína del huevo (principalmente vitelogenina) con el antisuero agotado se analizaron por ELISA 21 hembras grávidas (7-14 días de edad) a las que previamente se les habían extirpado los ovarios junto con 10 hembras control (que habían mudado antes de 24 h). Se compararon los valores de absorbancia obtenidos con los dos grupos de muestras mediante un análisis de varianza de un factor.

Finalmente, 318 hembras recolectadas en campo fueron analizadas por ELISA con el antisuero agotado. Estas hembras fueron recolectados mensualmente durante el 2007 al 2009 sobre plantas de *P. officinalis* situadas junto a un cultivo de tomate en invernadero. Para comparar los valores de absorbancia obtenidos de las hembras con diferente carga de huevos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis no paramétrico y una prueba de Wilcoxon de dos muestras. Todos los análisis se realizaron con el paquete de software SAS (SAS Institute 1999-2001). Las hembras traídas de campo fueron privadas de alimento durante 24 horas antes de ser analizadas a fin de garantizar que las proteínas del huevo de las presas potenciales ingeridas no interfirieran con la detección de la vitelina de *M. pygmaeus*.

De forma complementaria, se ensayo la detección en 4 hembras que fueron mantenidas a 25°C y en ayunas durante 24 h para seguidamente permitirles la ingestión de 2-3 huevos de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) El propósito fue confirmar si este tiempo era suficiente para la digestión completa de alimento en esta especie depredadora. Estas hembras fueron analizadas junto con huevos de *H. armigera*, que se utilizaron como control positivo y hembras de *M. pygmaeus* mantenidas en ayunas durante 24h que se utilizaron como control negativo. La detección en este caso se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para vitelina de *H. armigera*, previamente elaborado por Greenstone y Trowell (1994) utilizando el protocolo de ELISA indirecto descrito por Agustí *et al.* (1999).

2.5. Identificación de las proteínas del huevo mediante Western blotting

Con el propósito de demostrar que la detección de las proteínas del extracto de huevos mediante el antisuero policlonal se correspondía con la detección en hembras grávidas, se realizó el procedimiento de Western blot. Las proteínas separadas en gel mediante SDS-PAGE fueron sumergidas en un tampón de transferencia (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; glicina 0,196 M, 20% de metanol) durante 30 min. El gel se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa Protran BA 85 (Schleicher y Schuell Dassel, Alemania) y la transferencia de proteínas se realizó en una cámara semi-seca de transferencia MilliBlot-SDE (Millipore Bedford MA, EE.UU.) mediante la aplicación de corriente con una intensidad equivalente a $2,5 \text{ mA/cm}^2$ con el voltaje variable durante 40 min. La detección serológica de las proteínas transferidas mediante Western blot a la membrana con el antisuero policlonal agotado se realizó según la metodología descrita por Agustí *et al.* (1999).

Inicialmente la membrana fue bloqueada con leche descremada en polvo 2% en TBST (0,05 M Tris-clorhídrico, 0,2 M NaCl, pH 7,4 (TBS), que contiene 0,5% (v: v) de Tween 20) durante 30 min a 37°C. A continuación se incubó primero con el antisuero a una dilución de 1/200 en TBS durante 90 min, y después con las inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma) a la dilución recomendada en TBS durante otros 90 minutos. Después de cada paso de incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS. La coloración del complejo antígeno-anticuerpo se realizó mediante la adición de una solución de sustrato específico para la acción de la fosfatasa alcalina (1 mg/ml 4-nitroblue de tetrazolio, 5 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Powell, 1987) en tampón 0,1 M Tris, pH 9,6.

El peso molecular de las diferentes componentes proteicos del huevo se determinó tal y como se describe en el apartado de SDS-PAGE, pero en este caso utilizando una serie de proteínas estándar coloreadas (Fermentas, York, Reino Unido) que permitían su identificación después de la transferencia a membrana y a su vez servían como control de la transferencia.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización molecular de las proteínas del huevo

El análisis mediante SDS-PAGE permitió la detección de 5 bandas fuertes de 196, 184, 171, 61 y 47 kDa y 3 bandas más débiles de 145, 133, 124 kDa (**Fig. 2.1A**). El análisis del Western blot mostró que el antisuero reaccionó de idéntica manera tanto con el extracto de huevos, como con el extracto de una hembra grávida. Por otra parte, no se observó ninguna detección en extractos de las hembras de <24 h de edad ni en el extracto de machos (**Fig. 2.1B**), lo que demostró que el antisuero reconoció exclusivamente las proteínas del huevo.

3.2. Desarrollo de los ovarios según la edad

Las hembras fueron agrupadas de acuerdo a su edad en siete semanas. Dentro de cada semana, las hembras también fueron clasificadas de acuerdo a su carga de huevos en cuatro categorías: sin huevos corionados, con 1 a 5, con 6 a 10 y con más de 10 (**Fig. 2.2**). Las hembras sin huevos corionados (H0) se encuentran sobre todo en la primera semana y representan más del 90% de las hembras de esta edad, sin embargo, en casi todos los grupos de edad se produjo un pequeño porcentaje (aproximadamente 10%) de H0, que muy probablemente corresponden a las hembras que ya habían ovopositado todos sus huevos. Las hembras con 1 a 5 huevos corionados fueron las más abundantes en la mayoría de los grupos por edad: así, representaron el 47% de las hembras de dos semanas de edad, el 50% de las hembras de tres semanas de edad, el 78% de las de cuatro, cinco y seis semanas, y 67% de las hembras de siete semanas de edad; por el contrario, sólo representaron el 10% de las hembras de una semana de edad.

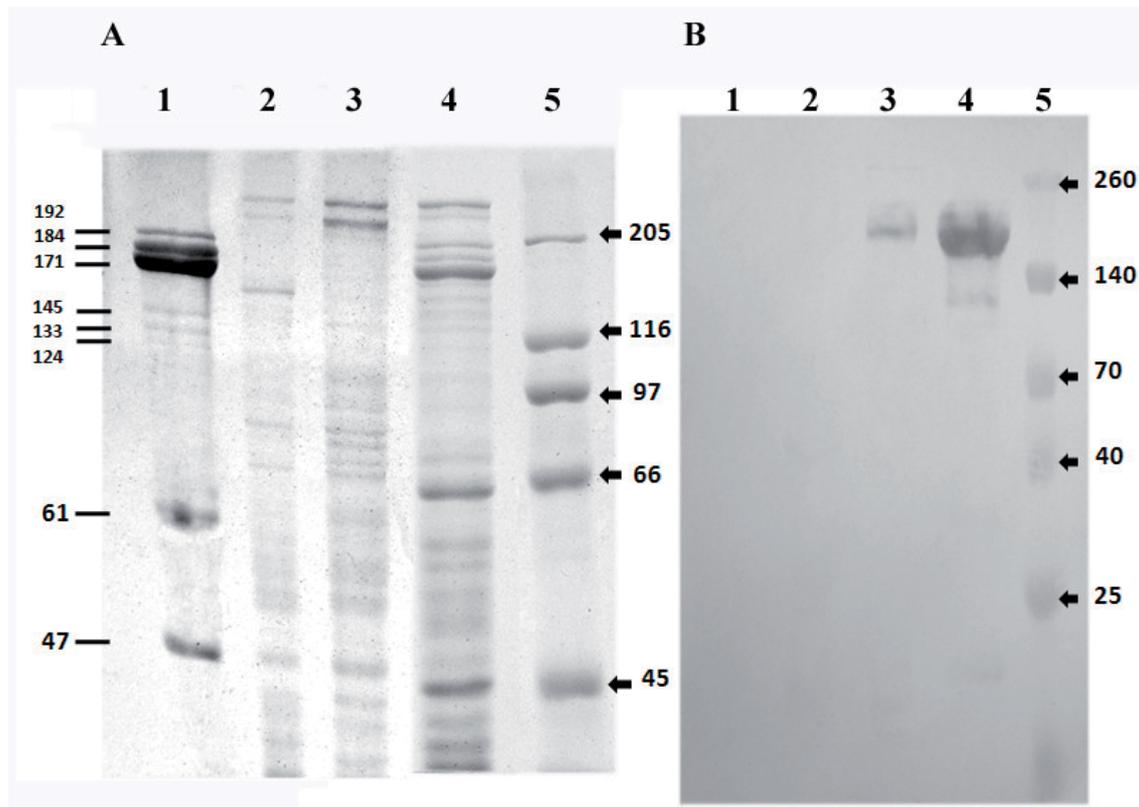


Figura 2.1. A) Análisis del SDS-PAGE (7,5%), extracto crudo de 20 huevos corionados (*carril 1*), extracto de una hembra de <24 h de vida (*carril 2*), extracto de un macho maduro (*carril 3*), extracto de una hembra grávida de 14-días de edad (*carril 4*), marcador de peso molecular (*carril 5*); **B)** Análisis del Western-blot, extracto de un macho maduro (*carril 1*), extracto de una hembra de <24 horas de vida (*carril 2*), extracto de una hembra grávida (*carril 3*), extracto crudo de 10 huevos corionados (*carril 4*), marcador de peso molecular (*carril 5*). Los pesos moleculares se indican con flechas y la determinación de pesos moleculares de las proteínas de huevo se indica con líneas continuas.

La estimación del contenido de proteínas de huevo de las hembras de laboratorio clasificados de acuerdo a las categorías de cargas de huevos, se muestra en la figura 2.3. Se encontraron diferencias significativas entre las cuatro categorías consideradas ($\chi^2 = 104,6$; $gl = 3$; $P < 0,0001$). Las H0 presentan el contenido más bajo de proteína del huevo, pero no fue nulo debido a la presencia de oocitos vitelogénicos en los ovarios.

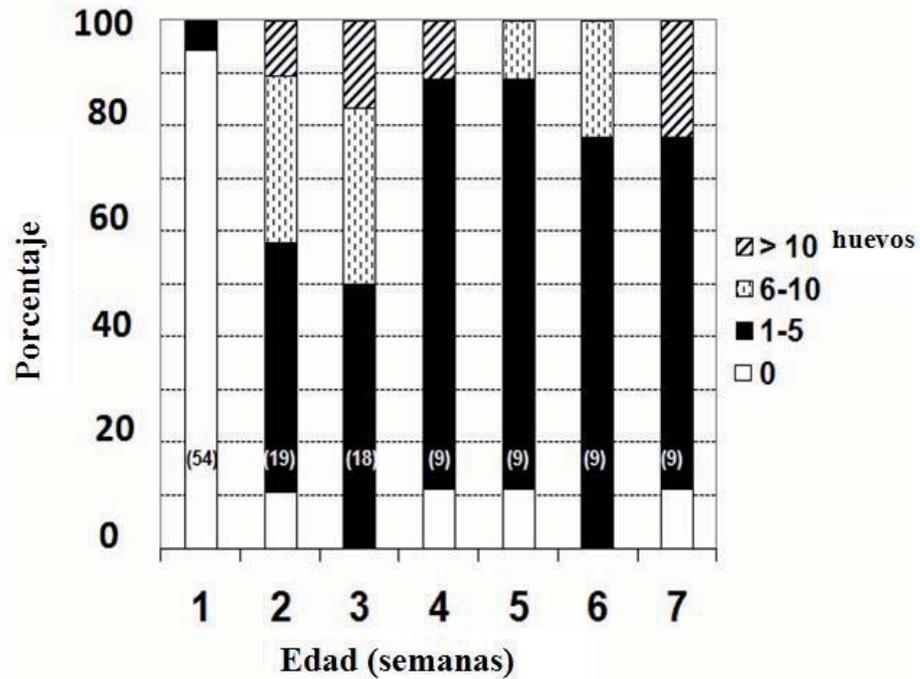


Figura 2.2 Porcentaje de hembras de laboratorio de *M. pygmaeus* con diferentes cargas de huevos por cada edad (semanas) considerada. Dependiendo del número de huevos se establecieron cuatro categorías: 0, 1-5, 6-10, y más de 10 huevos. El número de hembras analizadas de cada edad se indica entre *paréntesis*.

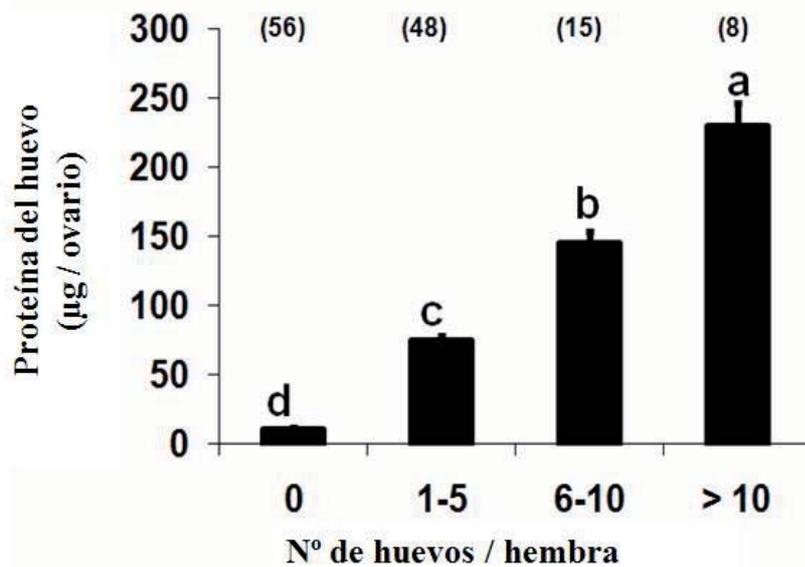


Figura 2.3. Estimación de la media (\pm ET) del contenido de las proteínas del huevo en los ovarios de hembras de laboratorio, de acuerdo con las mediciones de los huevos. Las categorías de carga de huevos con diferencias significativas ($P < 0,05$) se indican con letras diferentes. El número de hembras medidas por categoría de carga de huevos están entre *paréntesis*.

3.3. ELISA con el antisuero bruto y el agotado

El título del antisuero fue de 1/8.192.000 y la dilución óptima para su uso de 1/50.000. Con esta dilución del antisuero, la cantidad mínima de antígeno detectado fue de 0,004 huevos por pocillo. Los valores de la absorbancia obtenidos por ELISA a partir de los extractos de hembras de diferentes edades utilizando el antisuero policlonal bruto y agotado se muestran en la figura 2.4. Los resultados del ELISA con el antisuero bruto y agotado presentaron unos valores de absorbancia media significativamente menores para las H0 que para las hembras con huevos coronados (HC) ($\chi^2 = 30,5$; gl = 3; $P < 0,0001$ y $\chi^2 = 51,1$; gl = 3; $P < 0,0001$, respectivamente) (Fig. 2.4, barras blancas y negras). Aunque los dos protocolos de ELISA presentaron diferencias estadísticas similares entre las H0 y las HC, el antisuero agotado proporciona las mayores diferencias.

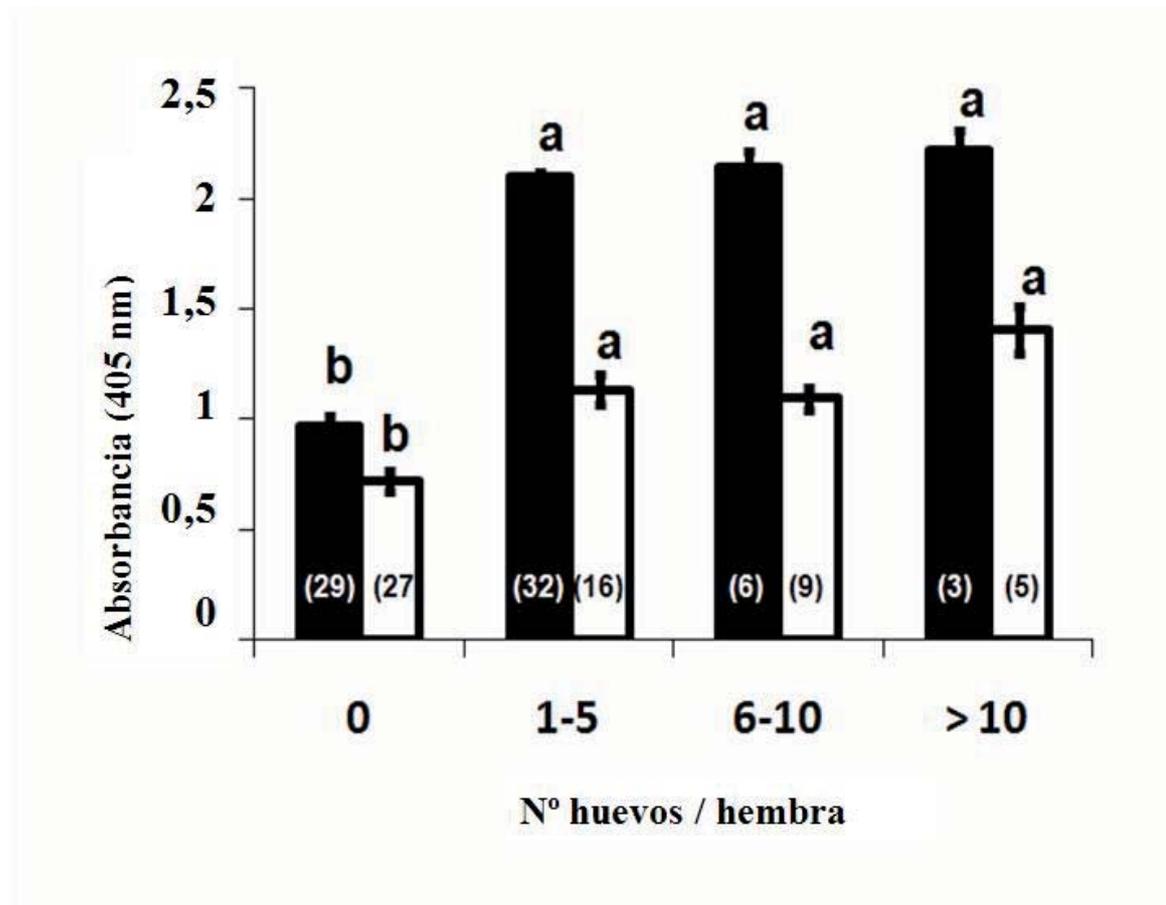


Figura 2.4. Valores de absorbancia obtenidos con los extractos de hembras de laboratorio por medio del ELISA indirecto utilizando el antisuero policlonal bruto (barras blancas) y el antisuero agotado (barras negras). Las categorías de carga de huevos dentro de cada prueba ELISA con diferencias significativas ($P < 0,05$) se indican con letras diferentes. El número de hembras analizadas por categoría de huevos de carga están entre *paréntesis*.

Los valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA utilizando el antisuero bruto proporcionaron resultados que discrepan un 44% en relación con los resultados obtenidos por observación de las hembras diseccionadas. Esto se debió a que una H0 presentó un valor de absorbancia superior y 24 HC presentaron valores de absorbancia inferiores al “punto de corte”. Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos con el antisuero agotado sólo presentaron discrepancia en el 4,3% de los resultados, que corresponden a tres H0 con valores de absorbancia superior al “punto de corte”.

Los valores de absorbancia obtenidos con las hembras recién mudadas (<24 h de edad) fueron significativamente menores que los obtenidos con las hembras grávidas de 7-14 días de edad a las que previamente se habían extirpado los ovarios ($0,90 \pm 0,04$ vs $2,33 \pm 0,04$) ($F = 488,7$; $gl = 1$, $P < 0,0001$). Esto indica que este el antisuero policlonal agotado detecta también los precursores de la proteína del huevo (principalmente vitelogenina), que están presentes en los cuerpos grasos y en la hemolinfa de las hembras maduras y que por el contrario están ausente en las hembras recién mudadas.

3.4. Detección de huevos en hembras de *M. pygmaeus* recolectadas en campo

Ninguna de las hembras de *M. pygmaeus* que habían ingerido 2-3 huevos de *H. armigera* después de un periodo de 24h en ayuno, dio resultado positivo por ELISA (promedio de absorbancia 0,059) en relación con los valores obtenidos con los controles negativos (promedio de absorbancia 0,071). Los huevos de *H. armigera* proporcionaron valores positivos (promedio de absorbancia 0,221). La carga de huevos de las hembras recolectadas en campo y los valores de absorbancia obtenidos por ELISA con el antisuero agotado se muestran en la figura 2.5. La mayoría de estas hembras (59%) tenían entre 1 a 5 huevos corionados. Las hembras con mayor carga de huevos se encontraron en menor proporción: sólo el 16% tenían 6-10 huevos y sólo el 1% tenía más de 10 huevos. Por último, el 24% de las hembras no tenían huevos corionados. Las hembras sin huevos corionados (H0) presentaron un promedio de absorbancia significativamente menor que las hembras con huevos corionados ($\chi^2 = 116,5$; $gl = 3$; $P < 0,0001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las tres categorías de carga de huevos (**Fig. 2.5**,

puntos). Al comparar el número de hembras que obtuvieron valores de absorbancia superior al “punto de corte” con el número de HC, se observó que: de un total de 318 hembras estudiadas, 42 (13,2%) presentaron discrepancias en las determinaciones; 40 de las cuales (12,6%) eran H0 que proporcionaron valores de absorbancia superior al “punto de corte” y sólo 2 (0,6%) fueron las determinaciones erróneas de HC con valores de absorbancia inferiores al “punto de corte”.

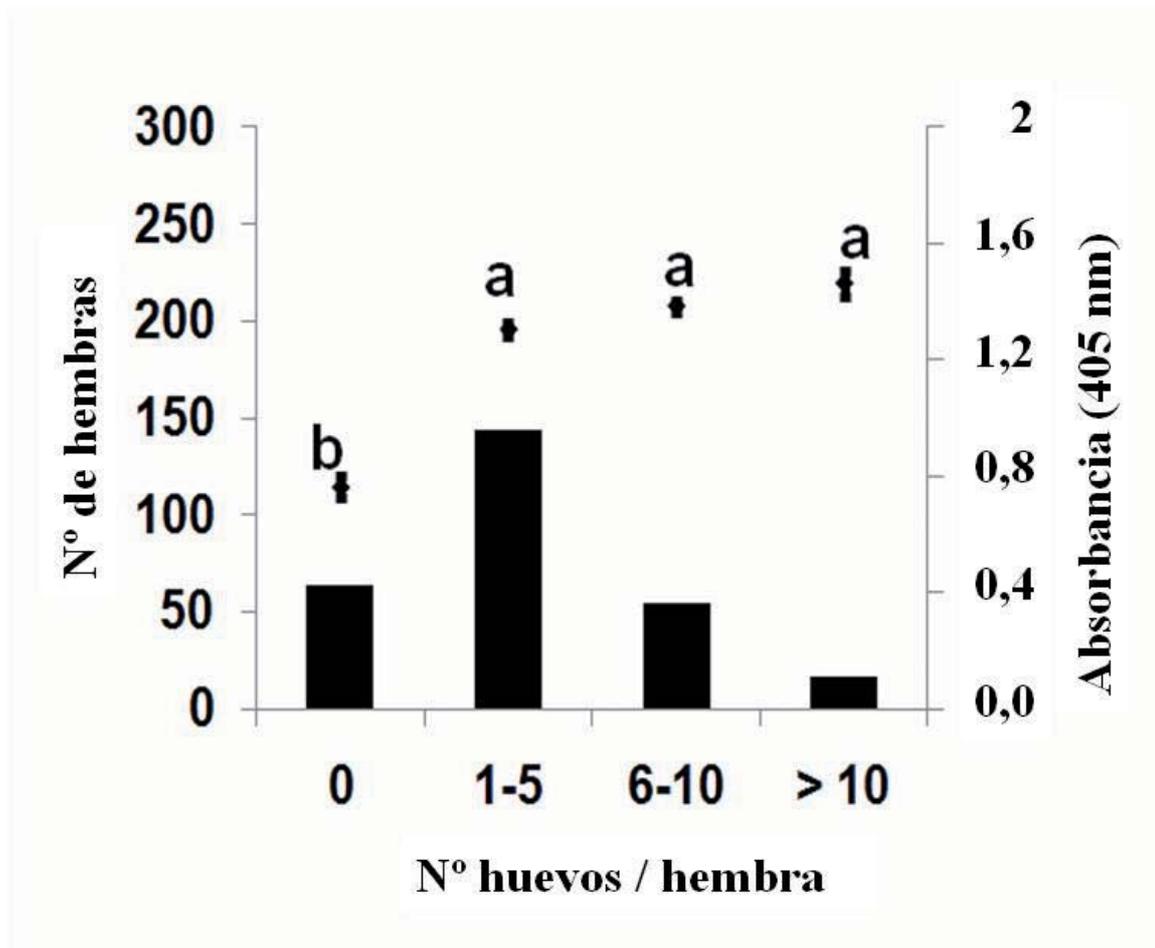


Figura 2.5. Número de hembras recogidas en campo y agrupadas por categorías de carga de huevos (barras) y sus correspondientes valores de absorbancia obtenidos con ELISA indirecto utilizando el antisuero policlonal agotado (puntos). Los valores de absorbancia entre las categorías de carga de huevos con diferencias significativas ($P < 0,05$) se indican con letras diferentes.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio presenta un protocolo sencillo y rápido para detectar la presencia de huevos en las hembras *M. pygmaeus*. El antisuero policlonal desarrollado tuvo un título elevado y una sensibilidad que permitió detectar no sólo un huevo corionado, u oocitos vitelogénicos, sino también los precursores de la proteína del huevo. El hecho de que algunas hembras sin huevos corionados obtuvieran valores altos de absorbancia podría explicarse tanto por la presencia de oocitos vitelogénicos en sus ovarios y / o la presencia de precursores de la proteína del huevo presentes en su cuerpo. Estos valores de absorbancia superiores al “punto de corte” que se obtuvieron las hembras grávidas, a las que se les extirparon los ovarios, en relación a las hembras recién mudadas, indica que se detectan los precursores de la proteína del huevo. Estas y sus precursores comparten propiedades inmunológicas y son similares en la caracterización física y química. Sólo se han observado diferencias en el contenido de lípidos y en el grado de fosforilación entre la vitelina y la vitelogenina, las proteínas más importante del huevo en los insectos (Raikhel y Dhadialla, 1992).

El análisis por SDS-PAGE de los huevos y las hembras grávidas mostraron cinco bandas fuertes, tres con un alto peso molecular y dos con un menor peso molecular. Estas bandas, probablemente corresponden a la vitelina ya que es la principal proteína de huevo en los insectos (Raikhel y Dhadialla, 1992). Estos dos grupos se encuentran también en otros heterópteros, como en el mirido *Lygus hesperus* Knight (150, 140, 123, 64 kDa) (Hagler *et al.*, 1991), y los redúvidos *Rhodnius prolixus* Stal (180, 158, 50, 46 kDa) (Oliveira *et al.*, 1995) y *Dipetalogaster maxima* Uhler (174, 170, 50, 44 kDa) (Aguirre *et al.*, 2008). El análisis por inmunotransferencia demuestra que el antisuero policlonal producido es específico para las proteínas del huevo o sus precursores de *M. pygmaeus*, ya que no reaccionó con machos o hembras inmaduras (**Fig. 2.1B**). Por otra parte, se podría haber producido un anticuerpo monoclonal en ratones, que probablemente habría proporcionado una detección más específica, pero su obtención es más compleja, lo que se traduce en un mayor coste y lentitud del proceso.

El protocolo de ELISA con el antisuero agotado es más preciso a la hora de evaluar el porcentaje de hembras con huevos corionados, hembras sin huevo corionados pero con oocitos vitelogénicos o con un alto nivel de los precursores de las proteínas del huevo. El antisuero agotado disminuyó la reacción inespecífica obtenida con el control negativo (hembras <24 horas). Además, mediante la reducción del ruido de fondo la detección de las proteínas del huevo fue más evidente, aumentando así el número de muestras positivas. De hecho, solamente un 4,3% de las detecciones serológicas discreparon en relación con las observaciones realizadas mediante la disección de las hembras. Dado que también era posible detectar la presencia de precursores de la proteína del huevo en su cuerpo, es probable que correspondieran a hembras con un alto nivel de precursores de la vitelina (hembras jóvenes que inician el proceso de vitelogénesis) o con hembras que se habían depositado recientemente toda su carga de huevos. El elevado porcentaje (42%) de las determinaciones erróneas obtenido antes del proceso de agotado del antisuero fue probablemente debido a la reacción inespecífica con otras proteínas de la hembra.

Con el fin de prevenir cualquier posible reacción cruzada con la presa ingerida, todas las hembras recolectadas en campo utilizadas en este estudio fueron mantenidas en ayunas durante 24 horas para luego ser evaluadas por ELISA. Como se muestra en el presente estudio, en las hembras de *M. pygmaeus* que había ingerido 2-3 huevos de *H. armigera* y que fueron evaluadas después de 24 h no se detectaron restos de vitelina. Esto también ha sido demostrado con otro insecto mírido con el cual está estrechamente relacionado, como es *Dicyphus tamaninii* Wagner (Agustí *et al.*, 1999). Así, un huevo de *H. armigera* ingerido por este depredador no fue detectado en extractos del insecto preparados solo 8 h después de la ingestión.

Las hembras recolectadas en condiciones naturales de campo durante dos años y medio representan una muestra muy amplia de los distintos estados fisiológicos en que se pueden encontrar. Al analizar estas hembras, el 13,2% de las detecciones serológicas no coincidieron respecto del conteo de huevos realizado mediante la disección de las hembras. De los cuales, 12,6% correspondió a H0 con valores de absorbancia superiores al “punto de corte”. Es probable que estas muestras correspondieran a hembras jóvenes que inician el proceso de vitelogénesis, o bien, a hembras que habían depositado

recientemente toda su carga de huevos. Sólo se encontró un porcentaje muy bajo de las determinaciones erróneas (0,6%) correspondientes a hembras grávidas que proporcionaron valores de absorbancia menores que el “punto de corte”. De todas las hembras recolectadas en campo, el 24% no tienen huevos corionados. Dentro de ellas, el 10,5% dieron valores de absorbancia menores que el “punto de corte”, lo que indica estas hembras no presentan proteínas del huevo, ni sus precursores. Este porcentaje probablemente corresponde a hembras recién mudadas, aunque algunas de ellas podrían haber sido hembras viejas que no produjeran proteínas del huevo y / o sus precursores.

La infertilidad, medida como el porcentaje de hembras que no producen ninfas, puede presentarse en esta especie ya que ha sido citada en una cría de *M. pygmaeus* donde se encontró que el 10,5% de las hembras eran infértiles (Castañé *et al.*, 2007). Otras causas de infertilidad en las hembras *M. pygmaeus*, aparte de la falta de vitelogenina o la producción de vitelina, puede deberse a la falta de una cópula, o la mortalidad de los embriones. En el caso de *Orius insidiosus*, Richards y Schmidt (1996) reportaron que el 30% de las hembras recolectadas en campo no efectuaron la puesta de huevos, y acuerdo a la ubicación y el periodo del año se encontró una infertilidad entre 0% y el 53% para las hembras de *O. laevigatus* (Tommasini y Lenteren van, 2003).

En conclusión, el antisuero policlonal desarrollado después de un proceso de agotado para eliminar reacciones inespecíficas, permitió la evaluación de la presencia de la proteína del huevo en hembras de *M. pygmaeus* mediante ELISA indirecto. Este antisuero permitió distinguir, con un margen de error aceptable, la presencia o ausencia de las proteínas del huevo o sus precursores en cada hembra. Dado que el protocolo también permite la detección de sus precursores, es más preciso que la técnica de la eclosión del huevo.

Este trabajo demuestra la utilidad de este tipo de antisueros para determinar la presencia de la proteína del huevo en las hembras de una forma rápida mediante la técnica ELISA, ya que, en un solo día permite analizar un elevado número de individuos, mientras que el método basado en la observación visual necesita el tiempo necesario para que las hembras puedan poner sus huevos, el posterior desarrollo embrionario y la emergencia de las ninfas de primer estadio, lo que significa varias semanas más.

Este procedimiento permite estimar la fecundidad potencial y puede ser usado para el control de calidad en la producción masiva de insectos, así como para evaluar las hembras existentes en la flora ruderal que potencialmente pueden colonizar los cultivos. El hecho de poder conocer el porcentaje de hembras grávidas puede ayudar a predecir el grado de colonización y el establecimiento de las poblaciones en los cultivos.

Capítulo 3

La monogamia y la poligamia en dos especies de míridos, un enfoque funcional



Pareja de *Nesidiocoris tenuis* en cópula. En la imagen la hembra está situada a la derecha.

Este trabajo fue enviado a la revista *Journal of Insect Physiology*.

Índice de impacto: 2,235; *Entomología* 7/74. Está evaluado positivamente con “Minor Revisions”.

Los autores son: **Katherine Franco**, Ana María Jauset y Cristina Castañé.

Título: Monogamy and polygamy in two species of mirid bugs, a functional-based approach.

1. INTRODUCCIÓN

El conflicto sexual se da porque las parejas sexuales nunca son genéticamente idénticas y es por lo tanto raro que coincidan sus intereses reproductores. Esto significa que los individuos de ambos sexos en general podrían tener un éxito reproductivo mayor si su pareja sexual estuviera dispuesta a invertir más esfuerzos en la reproducción en curso, a expensas de posibles oportunidades futuras reproductoras. Este conflicto de intereses conlleva otros conflictos potenciales con respecto a todas las actividades comunes implicadas en la reproducción. Hay una amplia variedad de adaptaciones del comportamiento, fisiológicas y anatómicas que pueden ser atribuidas al conflicto sexual (Arnqvist y Rowe, 2005). El apareamiento es un ejemplo de actividad compartida, y se puede esperar el conflicto sobre si acoplarse o no cuando el éxito reproductor masculino aumenta con el número de hembras inseminadas, pero el éxito reproductor femenino se maximiza con sólo una o unas pocas cópulas (Hosken *et al.*, 2009). El apareamiento múltiple de machos y hembras está muy extendido en insectos, a pesar de los costes y riesgos asociados, tales como el tiempo y la energía empleada, el riesgo de lesiones físicas, de ser depredados, y de contraer enfermedades de transmisión sexual (Arnqvist y Rowe, 2005). Pero el apareamiento múltiple tiene también ventajas. En el caso de las hembras, el copular con varios machos reduce el riesgo que representa aparearse con machos genéticamente incompatibles, inferiores o infértiles, y aumenta la diversidad genética de la siguiente generación (Fedorka y Mousseau, 2002). Hay además una proporción considerable de machos impotentes ya que en muchos acoplamientos no hay transferencia de esperma. El aumento de la tasa de apareamiento incrementa la fecundidad y la producción de descendientes; esto se debe tanto a los efectos estimulantes del acto del apareamiento en sí como al efecto nutricional de las sustancias de la eyaculación de los machos (Arnqvist y Nilsson, 2000). Mientras que teóricamente sólo uno o pocos apareamientos son suficientes para fecundar todos los óvulos de las hembras, en muchas especies poliándrias las hembras puede quedarse sin esperma si no se les permite reacoplarse (Ridley, 1988).

La competencia espermática es una consecuencia común de la poliándria femenina y es la competencia entre los espermatozoides de dos o más machos dentro de la hembra para fertilizar sus óvulos (Simmons, 2001a). Cuando el riesgo de competencia espermática es

alto, la teoría existente sugiere que la selección favorecerá una mayor inversión en la espermatogénesis; al aumentar el número medio de cruzamientos realizados por las hembras, también aumentará la inversión del macho en la eyaculación. Esta inversión debe reflejarse en un aumento de los órganos espermatogénicos, como son los testículos y las glándulas accesorias que producen el líquido seminal (Simmons, 2001b). Los testículos grandes suelen producir eyaculaciones con más número de espermatozoides o bien espermatozoides de mayor tamaño (Hosken y Ward, 2001; Gomendio y Roldan, 2008). La teoría de la competencia espermática predice que cuando la competencia es análoga a una rifa, el número relativo de espermatozoides será el principal factor determinante de éxito. (Parker, 1970)

Macrolophus pygmaeus Rambur y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Heteroptera, Miridae) son dos depredadores polífagos nativos de la región Mediterránea que actualmente se utilizan en el control biológico de moscas blancas y otras plagas de los cultivos de hortalizas (Jacas *et al.*, 2008). Los adultos son similares en tamaño y apariencia, y colonizan los mismos cultivos, siendo *N. tenuis* más abundante que *M. pygmaeus* en las estaciones y las zonas más cálidas. Aunque su biología ha sido estudiada principalmente en relación a su capacidad depredadora (i.e. Urbaneja *et al.*, 2005b; Alomar *et al.*, 2006; Castañé *et al.*, 2006) su biología reproductora, así como la de otros míridos, sigue siendo en gran parte desconocida (Wheeler, 2001). Estudios recientes sobre *M. pygmaeus* indican que las hembras son reacias a acoplarse más de una vez (Gemeno *et al.*, 2007) mientras que las hembras de *N. tenuis* parecen aceptar a los machos para aparearse más de una vez en su vida (Torreno y Magallona, 1994). Estas dos especies por lo tanto ofrecen una buena oportunidad para estudiar las adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento asociadas con un tipo de apareamiento monándrio o poliándrio.

La morfología y fisiología de la reproducción de los míridos han sido descritas por Carayon (1954), Davis (1955), y Strong *et al.* (1970). A diferencia de otros grupos de heterópteros, las hembras de los míridos no tienen una espermateca funcional sino un depósito seminal que actúa como un receptáculo del esperma durante la cópula. Pero los espermatozoides no se quedan allí por mucho tiempo, sino que emigran a los pedicelos, en la base de la ovariolos, donde se almacenan (Hinton, 1962). El esperma que no migra del depósito seminal a los conductos genitales se destruye y se reabsorbe (Kullenberg,

1947; Carayon, 1984). Aunque, se ha demostrado la formación de espermátóforos en algunas especies de míridos como en *Lygocoris pabulinus* (Groot y Smid, 2000), no se han encontrado ni en *M. pygmaeus* ni en *N. tenuis*. Los machos tienen dos pares de glándulas accesorias reproductivas que proporcionan complejos productos bioquímicos a los espermatozoides cuando pasan a través de los conductos eferentes. Estos productos son transferidos a la hembra durante la cópula y son responsables de la activación de los espermatozoides en la hembra (Happ, 1992). La maduración de las glándulas accesorias reproductivas en *M. pygmaeus* se ha relacionado con la tendencia de los machos a aparearse (Castañé *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue examinar las características morfológicas, fisiológicas y del comportamiento de estas dos especies relacionadas con sus estrategias de apareamiento (monoandria frente a poliandria). En concreto, proponemos las siguientes preguntas:

A) ¿Hay alguna diferencia entre estas dos especies en cuanto al comportamiento en el apareamiento de las hembras (hembras reacias a acoplarse o no y la duración de la cópula)? ¿Cuáles son los beneficios (tales como reposición de esperma en sus almacenes, regalos materiales) que las hembras de las especies poliándrias puede obtener del apareamiento múltiple?

B) ¿Hay alguna diferencia en cuanto a la inversión en los órganos espermatogénicos (tamaño de los testículos, tamaño y/o número de espermatozoides y la viabilidad de los mismos) y el volumen de la eyaculación (tamaño de las glándulas accesorias reproductivas) entre estas especies que podrían estar relacionados con la competencia espermática?

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Las colonias de *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis* se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de humedad relativa con un fotoperiodo de 16:8 h (Luz: Oscuridad). Ambas especies se criaron en plantas de tabaco con huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) como presa y las colonias se renovaron periódicamente con insectos recogidos en campos de tomate locales.

Todos los parámetros morfológicos medidos se calcularon en relación al tamaño del cuerpo con el objeto de facilitar la comparación entre estas especies. Para estimar el tamaño del cuerpo se midió la longitud total desde la parte superior de la cabeza hasta la punta del abdomen, y se evaluó en machos y hembras de ambas especies. Para ello, cada individuo se colocó en posición dorsal bajo una lupa binocular a 20 aumentos, se hicieron fotografías utilizando el programa NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nihimage>) y sobre ellas se tomaron las medidas en diez individuos de cada sexo y especie.

2.1. Comportamiento sexual

Los ensayos se realizaron en una cámara de condiciones controladas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16L:8O. Las observaciones se realizaron sobre una planta de tabaco, con sólo dos hojas (con una superficie total de aproximadamente 30 cm^2). La planta se mantuvo en un cilindro de plexiglás para evitar que los insectos escaparan. Seis hembras vírgenes de 3-5 días de edad (edad sexualmente receptiva) fueron liberadas en la planta un día antes de añadir los machos, con el fin de darles tiempo para acostumbrarse a las condiciones del ensayo. Se soltaron doce machos vírgenes de 3-5 días de edad en esas mismas hojas de tabaco. Una vez que se formaba una pareja, se colocaba en una placa de Petri hasta que dejaban de aparearse, registrándose la duración de la cópula. Los individuos que no copularon se descartaron. Aunque utilizamos las mismas condiciones de apareamiento para ambas especies, las observaciones sobre *M. pygmaeus* se llevaron a cabo temprano en la mañana ya que esta especie tiene hábitos crepusculares, mientras que las de *N. tenuis* se realizaron durante cualquier momento del día.

2.1.1. Número de cópulas sucesivas de hembras y machos en un periodo de 24-48 h

Después de la primera cópula se aislaron las hembras y los machos durante 24 h. A continuación, a cada individuo se le ofrecieron cuatro individuos vírgenes del sexo opuesto. A los individuos que no se acoplaron se les volvieron a ofrecer otros cuatro individuos vírgenes al cabo de 48 h. Se siguió el mismo procedimiento en los sucesivos apareamientos. Al mismo macho se le ofrecieron nuevas hembras vírgenes durante tres días consecutivos y a la misma hembra se le ofrecieron nuevos machos vírgenes durante cinco días consecutivos. Se registró la duración de la cópula de todos los apareamientos, y el experimento se repitió 10 veces para *M. pygmaeus* y 15 veces para *N. tenuis*.

2.1.2. Eficacia de una única cópula para la fecundación de todos los óvulos de la hembra

Las hembras que sólo se habían apareado una vez se aislaron y se diseccionaron al cabo de 1, 7, 14 o 21 días. Bajo la lupa binocular, se seccionó el abdomen, se sumergió en una solución salina (ClNa 115 mM; ClK 2 mM, Cl₂Ca 1,8 mM y tampón fosfato de sodio 2 mM, pH 7,2) y se cortó a lo largo del lado izquierdo. Una vez abierto, se quitaron los ovarios y se sumergieron en una nueva gota de solución salina sobre un portaobjetos que se tapó con un cubreobjetos. Para detectar la presencia de espermatozoides vivos se examinaron las preparaciones al microscopio (100X) y se observaron los oviductos laterales y los ovariolos de cinco hembras de cada especie a los intervalos de tiempo considerados.

2.2. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas de las hembras y los machos

2.2.1. Estructuras reproductoras femeninas

Se evaluaron los órganos receptores del espermatozoide y de su almacenamiento ya que pueden mostrar adaptaciones específicas al tipo de apareamiento.

2.2.1.1. Estado de los espermatozoides en el depósito seminal y en los órganos de almacenamiento

Se utilizó el kit de viabilidad espermática LIVE / DEAD (Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A) para determinar el estado de los espermatozoides en el interior del depósito seminal, de los oviductos, y de los ovarios de las hembras después del primer apareamiento. Este kit contiene SYBR-14, que tiñe el ADN de las células vivas de verde fluorescente, y yoduro de propidio (PI), que tiñe las células muertas de color rojo fluorescente. Se diseccionaron hembras recién apareadas de *N. tenuis* (menos de una hora después de la cópula) y de *M. pygmaeus* (10-12 h después de la cópula) y se colocaron los ovarios y el depósito seminal en 5 μ l de solución salina Beadle (ClNa 128,3 mM, ClK 4,7 mM, y Cl₂Ca 23 mM). Después de la incorporación de 0,5 μ l de SYBR-14 1mM diluida 1:50, la muestra se agitó suavemente y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 10 min. A continuación se añadieron 2 μ l de PI 2,4 mM, de acuerdo con el protocolo de García-González y Simmons (2005). Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia, con un filtro azul de $\lambda = 490\text{nm}$. Se procesaron 13 individuos de *N. tenuis* y 7 de *M. pygmaeus*.

2.2.1.2. Vaciado del contenido del depósito seminal

Para estudiar el tiempo que tardaba en vaciarse el depósito seminal, se diseccionaron hembras recién apareadas de *M. pygmaeus* y de *N. tenuis* a diferentes intervalos de tiempo hasta que el depósito estuvo completamente vacío: 1 -, 6 -, 12 -, 24 -, 48 -, 72 -, 96 -, 120 -, 144 - y 168 h después de la cópula en *M. pygmaeus* y 1 -, 6 -, 12 - y 24 h después de la cópula en *N. tenuis*. Para cada uno de los intervalos de tiempo considerados se procesaron cinco hembras de las cuales se midió el tamaño del depósito seminal (longitud y anchura máximas) tomando imágenes a 50X. Con el fin de poder comparar el tamaño de este órgano entre las dos especies, también se calcularon las medidas como una proporción de la longitud del total cuerpo.

2.2.2. Estructuras reproductoras de los machos

Los órganos relacionados con la eyaculación son los que pueden mostrar adaptaciones específicas a la competencia espermática.

2.2.2.1. Tamaño de los órganos reproductores masculinos

El objetivo de este experimento fue evaluar la maduración de las glándulas accesorias reproductoras en los machos recién mudados de *N. tenuis*. Se estudiaron cohortes de menos de 3 horas y de 1, 3 y 5 días de adultos. Se diseccionaron sus abdómenes y se midió la longitud y el ancho máximo de cada glándula. Se evaluaron diez machos de cada edad considerada. Con el fin de comparar el tamaño de sus órganos reproductivos internos se diseccionaron machos vírgenes de 5 días de edad cada especie, y se evaluó el tamaño de los testículos (largo x ancho), las glándulas accesorias reproductoras y las vesículas seminales como una medida absoluta y como una proporción relativa a la longitud total del cuerpo.

2.2.2.2. Características del esperma

Para evaluar la viabilidad espermática (la proporción de espermatozoides vivos) en los machos, se diseccionaron 5 individuos por especie colocando las vesículas seminales en 20 μ l de solución salina Beadle y rompiéndolas para liberar los espermatozoides. A continuación se mezclaron 5 μ l de esta solución con el mismo volumen de SYBR-14 1mM diluido a 1:50 y se dejó en la oscuridad durante 10 min antes de añadir los 2 μ l de PI 2,4 mM, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para el kit LIVE/DEAD. Para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos se observaron un total 500 espermatozoides por individuo.

Para caracterizar la morfología de los espermatozoides se diseccionaron 10 individuos de cada especie, se colocaron las vesículas seminales en 20 μ l de solución salina Beadle y se rompieron para liberar los espermatozoides. A continuación, se esparció una gota de la solución sobre un portaobjetos y se dejó secar. Se midieron doce espermatozoides por individuo (longitud de la cabeza, del flagelo y longitud total) a 400 X en campo oscuro

utilizando el paquete de software Qwin 6,0 (Leicamicrosystems, Alemania). Cada componente se midió cinco veces en cada espermatozoide.

Para determinar si existían diferencias entre especies en cuanto al número de espermatozoides almacenados en las vesículas seminales se diseccionaron 15 machos vírgenes de 8 días de edad, se colocaron las vesículas seminales en 20 μ l de solución salina Beadle y se rompieron para liberar los espermatozoides. La masa de esperma se mezcló con 50 μ l de agua destilada, se esparció sobre un portaobjetos y se dejó secar. Las preparaciones se observaron en campo oscuro a 100X y se contaron todos los espermatozoides.

2.3. Análisis estadísticos

Se realizó un ANOVA no-paramétrico de un factor (prueba de Kruskal-Wallis) para comparar la duración de la cópula en los sucesivos apareamientos de cada sexo y especie, y para comparar el tamaño de los depósitos seminales de las hembras a diferentes tiempos después de cópula. Todos los demás parámetros se analizaron mediante un ANOVA de una vía después de transformar los datos en $\log(x + 1)$ (números) o en arco seno (porcentajes). La prueba de separación de medias de rango múltiple Tukey se realizó únicamente cuando el análisis de varianza mostró diferencias significativas.

3. RESULTADOS

3.1. Comportamiento sexual

Bajo nuestras condiciones experimentales *M. pygmaeus* tuvo dificultades de acoplamiento porque la mayoría de las hembras huían de los machos y sólo aceptaron aparearse después de varios contactos. Después de encontrarse con la hembra los machos empezaban a caminar rápido y a perseguirla hasta que, finalmente, uno de los machos la montaba. La cópula fue corta, con una media de $4,08 \pm 0,199$ minutos ($n = 62$), y en ella el macho y la hembra se mantenían unidos a lo largo del mismo eje, pero mirando en direcciones opuestas. Después de separarse las hembras eran muy reacias a aparearse de nuevo, huyendo de los machos o rechazándolos con el abdomen. Esta especie se aparea preferentemente durante la noche y en las primeras horas del día (Gemeno *et al.* 2007).

Por el contrario, las hembras de *N. tenuis* eran fácilmente accesibles para los machos y estos eran capaces de copular con las hembras sin ningún contacto previo. Los encuentros de los machos con las hembras eran aparentemente al azar y tan pronto como se encontraban se iniciaba la cópula. La forma en la que el macho montaba a la hembra era similar a la descrita para *M. pygmaeus*, con la pareja unida a lo largo del mismo eje, pero mirando en direcciones opuestas. Una vez iniciada la cópula, las hembras se quedaban quietas o a veces empezaban a caminar arrastrando a los machos. La cópula fue larga: $187,28 \pm 6,14$ minutos ($n = 133$). Esta especie no parece tener una hora especial del día para el apareamiento, y los ensayos de acoplamiento se realizaron en diferentes momentos del día con un éxito similar.

3.1.1. Número de veces que copularon las hembras y los machos

Ninguna de las 10 hembras de *M. pygmaeus* que se habían apareado previamente lo hizo de nuevo cuando se les ofrecieron cuatro machos vírgenes 24 h después. Este fuerte rechazo de las hembras apareadas se mantuvo durante el período de 5 días en que se indujo el apareamiento en varias ocasiones.

Tabla 3.1. Duración de las copulas sucesivas (media \pm SE) (con un intervalo de 24 horas) en las hembras y en los machos de *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. A cada individuo evaluado se le ofreció 4 individuos vírgenes del sexo opuesto en cada apareamiento. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas estadísticamente ($P < 0,05$).

	Nº de copulas	<i>M. pygmaeus</i>		<i>N. tenuis</i>	
		n	minutos	n	minutos
Hembras	1 ^{ra}	10	4,3 \pm 0,3	15	120,6 \pm 13,4 a
	2 ^{da}	-	-	11	181,5 \pm 17,12 a
	3 ^{ra}	-	-	7	162,2 \pm 13,2 a
	4 ^{ta}	-	-	5	167,6 \pm 21,7 a
	5 ^{ta}	-	-	3	151,0 \pm 11,8 a
Machos	1 ^{ra}	10	4,2 \pm 0,2 a	15	132,6 \pm 10,2 b
	2 ^{da}	6	4,4 \pm 0,2 a	11	157,2 \pm 7,7 ab
	3 ^{ra}	2	4,3 \pm 0,3 a	7	178 \pm 9,4 a

Las hembras de *M. pygmaeus* abandonaban la planta y volaban a las paredes de la jaula o caminaban por el tallo a fin de evitar los intentos de copular de los machos. Sin embargo, el 73% de las hembras apareadas de *N. tenuis* aceptó una segunda cópula después de un período refractario (tiempo entre cópulas) de 24 h. Las 4 hembras que no aceptaron al macho después de 24 h, aceptaron sin embargo una segunda cópula a las 48 h. Además, el 20% de las hembras fueron capaces de aparearse cinco veces consecutivas con un período refractario de 24 horas. Aunque la primera cópula fue más corta que las otras, la duración de la cópula no fue significativamente distinta entre la primera y las sucesivas cópulas ($X^2 = 8,507$; $gl = 7$, $P = 0,074$). Esto se debió a la gran variación en la duración de la cópula en todos los sucesivos apareamientos (**Tabla 3.1**).

Los machos de *M. pygmaeus* copularon más de una vez y el 60% de los machos que se habían acoplado una vez tuvieron una segunda cópula después de un período refractario de 24 h. El 20% de los machos, se aparearon incluso tres veces consecutivas después del mismo período refractario de 24 h. No hubo diferencias significativas en la duración de la cópula entre el primer y los dos demás apareamientos ($X^2 = 0,401$; $gl = 2$, $P = 0,818$) y la duración de todos los apareamientos fue muy similar (**Tabla 3.1**).

Los machos de *N. tenuis* también copularon más de una vez, pero la duración de cada cópula se incrementó significativamente con cada apareamiento sucesivo ($X^2 = 7,062$; $gl = 2$, $P = 0,029$). El setenta y tres por ciento de los machos que se habían apareado una vez tuvieron una segunda cópula después de un período refractario de 24 h y los restantes 4 machos la tuvieron después de 48 h. Además, el 47% de los machos se aparearon tres veces consecutivas con un período refractario de 24 h (**Tabla 3.1**).

3.1.2. Eficacia de una única cópula para la fecundación de todos los óvulos de la hembra

Todas las hembras de *M. pygmaeus* tenían espermatozoides en los ovariolos en todos los intervalos de tiempo considerados después de su único apareamiento (**Tabla 3.2**). Sin embargo, el porcentaje de hembras de *N. tenuis* que tenían espermatozoides en los ovariolos disminuyó con el tiempo. Mientras el 100% de las hembras tenían espermatozoides en su ovariolos un día después de su cópula, sólo el 20% de las hembras tenían espermatozoides en los ovariolos a los 21 días del apareamiento. Para las hembras de *M. pygmaeus* una sola cópula parece suficiente para abastecerlas de esperma durante al menos 21 días, mientras que en el caso de *N. tenuis*, el 60% de las hembras se quedaron sin espermatozoides sólo una semana después del apareamiento.

Tabla 3.2. Porcentaje de hembras que tenían espermatozoides en sus ovariolos a diferentes intervalos de tiempo después de haber tenido una única cópula (n = 5).

Días después de la copula	<i>M. pygmaeus</i>	<i>N. tenuis</i>
1	100	100
7	100	40
15	100	40
21	100	20

3.2. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas de las hembras y los machos

3.2.1. Tamaño de los individuos de las dos especies

Aunque los adultos de las dos especies parecen tener un tamaño similar a simple vista, los adultos de *M. pygmaeus* eran significativamente más cortos que los de *N. tenuis*: para los machos, la longitud media del cuerpo fue de $3,21 \pm 0,05$ mm en *M. pygmaeus* y de $3,47 \pm 0,05$ mm en *N. tenuis* ($F = 12,84$; $gl = 1$, $P = 0,002$) y para las hembras, la longitud media del cuerpo fue de $3,77 \pm 0,03$ mm en *M. pygmaeus* y de $3,95 \pm 0,02$ mm en *N. tenuis* ($F = 16,66$; $gl = 1$, $P = 0,0006$). Como era de esperar, las hembras fueron significativamente más grandes que los machos en ambas especies, ($F = 74,46$; $gl = 1$, $P < 0,0001$ para *M. pygmaeus* y $F = 67,26$; $gl = 1$, $P < 0,0001$ para *N. tenuis*).

3.2.2. Estructuras reproductoras de las hembras

3.2.2.1. Estado de los espermatozoides en el depósito seminal y en los órganos de almacenamiento

El depósito seminal se encuentra situado dorsalmente por encima de la unión de los dos oviductos laterales que conectan los ovarios. Este era transparente en las hembras vírgenes y las que no se habían apareado recientemente, pero justo después de la cópula esta estructura era grande y llena de una secreción blanquecina opaca, como se muestra para *M. pygmaeus* (**Fig. 3.1B**).

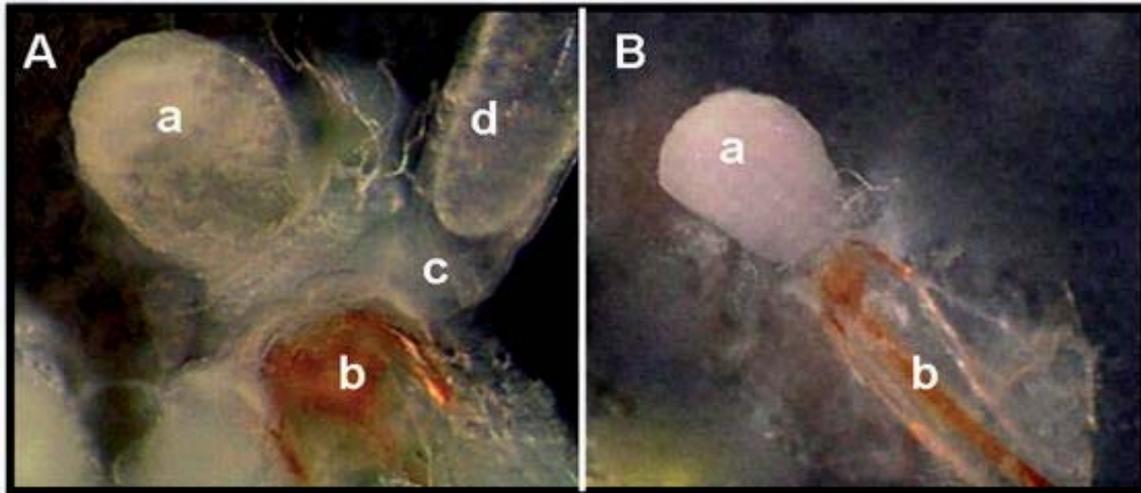


Figura 3.1. Aspecto del depósito seminal en las hembras de *M. pygmaeus*: **A)** parcialmente vacío en una hembra apareada 2 días antes (40X) y **B)** completamente lleno en una hembra recién acoplada (50X). **a)** depósito seminal, **b)** ovipositor, **c)** oviducto lateral, y **d)** huevo corionado.

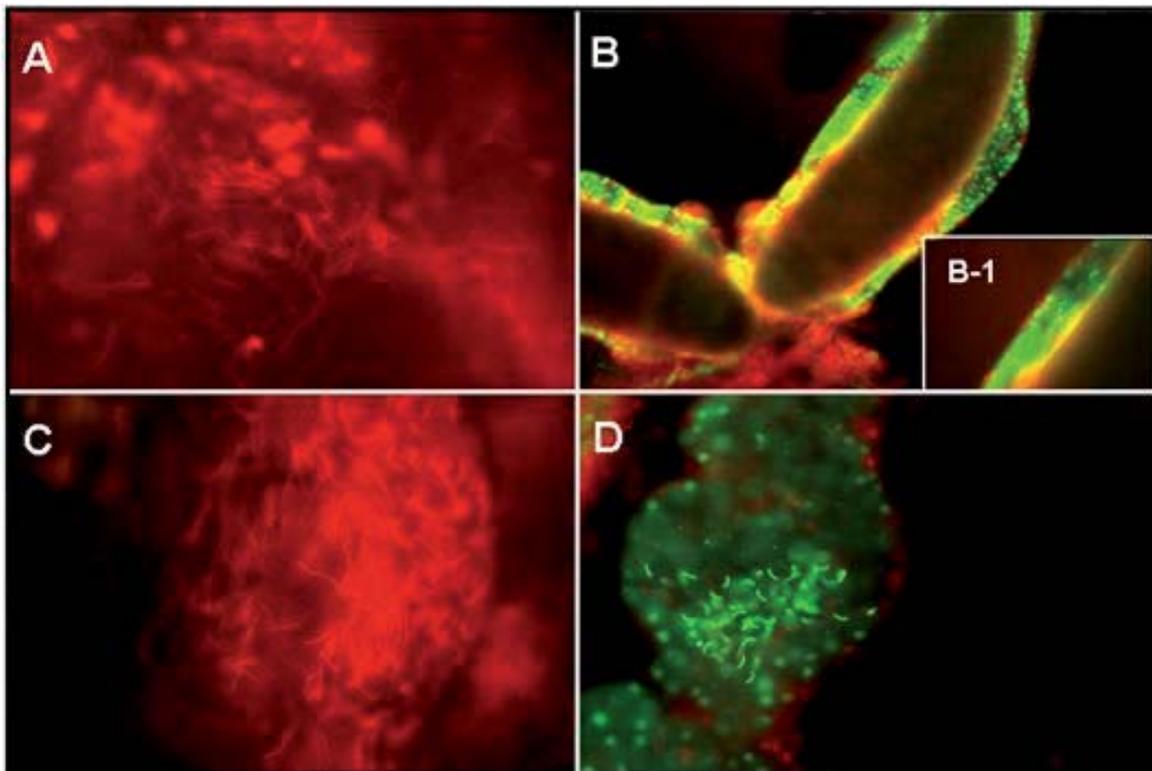


Figura 3.2. Espermatozoides teñidos con el kit LIVE / DEAD (SYBR-14 y yoduro de propidio) dentro de las estructuras reproductoras de la hembra. **A)** el contenido del depósito seminal teñido de rojo indica que las cabezas de los espermatozoides están muertas (630X) en *M. pygmaeus*. **B)** huevos dentro de los ovariolos rodeados de espermatozoides con las cabezas teñidas de color verde, indicando que están vivos. (100X). **B-1)** detalles de las cabezas de los espermatozoides vivos (400X). **C)** el contenido de depósito seminal muestra las cabezas de los espermatozoides teñidas de color rojo (muertos) (630X) en *N. tenuis*. **D)** dentro de los ovariolos se muestran las cabezas de los espermatozoides teñidas de color verde (vivos) (400X) en *N. tenuis*.

Después de tratar las hembras con SYBR-14 y PI se detectaron espermatozoides muertos (con las cabezas teñidas de rojo) en el depósito seminal (**Fig. 3.2A** en *M. pygmaeus*, y **3.2C** en *N. tenuis*) y espermatozoides vivos (cabezas teñidas de verde) en los oviductos y ovariolos (**Fig. 3.2B** en *M. pygmaeus*, y **3.2D** en *N. tenuis*). En el momento de la disección (10-12 h después del apareamiento en *M. pygmaeus* y una hora en *N. tenuis*) el depósito seminal sólo contenía espermatozoides muertos, mientras que los espermatozoides vivos se encontraban en los ovariolos y los oviductos.

3.2.2.2. Vaciado del contenido del depósito seminal

El tamaño del depósito seminal después de apareamiento fue significativamente menor en las hembras de *M. pygmaeus* que en las de *N. tenuis*, pero el tiempo necesario para completar el vaciado fue mayor para los primeros que para los segundos (**Figura 3.3**). Una hora después del apareamiento el tamaño del depósito seminal en *M. pygmaeus* fue de $0,056 \pm 0,006 \text{ mm}^2$. En ese momento, el 60% de las hembras ya tenían espermatozoides en su ovariolos. Seis horas después el porcentaje de hembras con los espermatozoides en su ovariolos había aumentado al 70% y 12 hs después del apareamiento el 100% de las hembras tenían espermatozoides en los ovariolos. Sólo siete días después del apareamiento, el depósito seminal volvió a su tamaño mínimo y sin señales de material seminal ($\chi^2 = 36,77$; $gl = 8$, $P < 0,0001$) (**Fig. 3.3A**). En el caso de *N. tenuis*, una hora después del apareamiento el tamaño del depósito seminal era de $0,111 \pm 0,001 \text{ mm}^2$ y en este momento el 100% de las hembras ya tenían espermatozoides en los ovariolos. Veinticuatro horas después del apareamiento, el depósito seminal se había reducido a su tamaño mínimo y no contenía material seminal ($\chi^2 = 10,22$; $gl = 2$, $P = 0,006$) (**Fig. 3.3B**).

Al comparar el tamaño relativo de los depósitos seminales una hora después del apareamiento con la longitud total del cuerpo, se observaron diferencias significativas entre las dos especies ($F = 23,62$; $gl = 1$, $P = 0,0013$): el depósito seminal de *N. tenuis* era relativamente mayor que el de *M. pygmaeus*. Su longitud media correspondía al $5,44 \pm 0,45\%$ de la longitud del cuerpo en *M. pygmaeus* mientras que en *N. tenuis* correspondía al $8,34 \pm 0,39\%$.

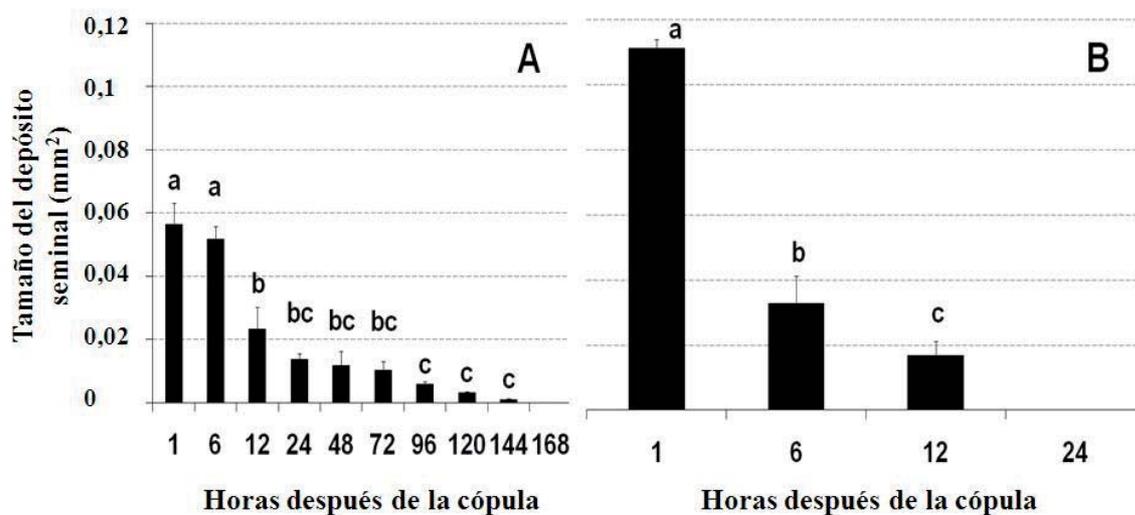


Figura 3.3. Tamaño del depósito seminal de las hembras (media \pm ET) a intervalos de tiempo específicos después del apareamiento. **A)** *M. pygmaeus*, y **B)** *N. tenuis*. (n = 50 para *M. pygmaeus* y n = 20 para *N. tenuis*).

3.2.3. Estructuras reproductoras de los machos

3.2.3.1. Tamaño de los órganos reproductores masculinos

M. pygmaeus y *N. tenuis* tenían cuatro glándulas accesorias reproductoras: un par blanco opaco y más grande que el otro, que era gris en *M. pygmaeus* y verde en *N. tenuis* (**Fig. 3.4**). La maduración de las glándulas accesorias reproductoras en *M. pygmaeus* ha sido descrito por Castañé *et al.* (2007), quienes mostraron que estas glándulas se volvían blanquecinas (un par blanco opaco y el otro casi transparente grisáceo) cuando los machos alcanzaban los 3 días de edad.

La maduración de las glándulas accesorias reproductoras en *N. tenuis* se apreciaron por los cambios de tamaño con la edad (**Tabla 3.3**). Ambos tipos de glándulas eran pequeñas y casi transparentes en los machos que tenían menos de 3 horas de adultos y progresivamente se hicieron más grandes y más opacas en los machos de edad avanzada. Hubo diferencias significativas de tamaño entre individuos de diferentes edades, tanto para las glándulas blancas ($F = 41,88$; $gl = 3$; $P < 0,0001$) como para las verdes ($F = 20,33$; $gl = 3$; $P < 0,0001$).

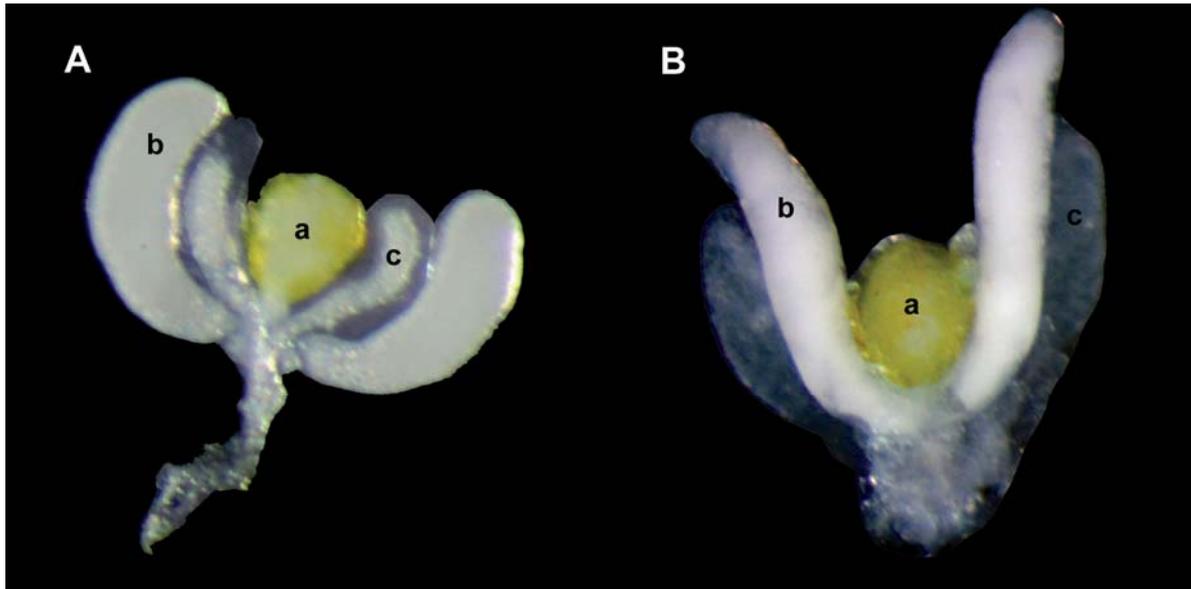


Figura 3.4. Glándulas accesorias reproductoras y vesícula seminal de machos de 5 días de edad de: **A)** *M. pygmaeus* (50X), y **B)** *N. tenuis* (20X); **a)** vesícula seminal, **b)** Glándulas accesorias reproductoras de color blanco **c)** Glándulas accesorias reproductoras de color verde / gris.

Tabla 3.3. Tamaño de las Glándulas accesorias reproductoras (media \pm ET) de color blanco y verde de machos de *N. tenuis* a diferentes intervalos de tiempo después de la mudar a adultos: de menos de 3 horas a 5 días de edad. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas estadísticamente ($P < 0,05$).

Edad de los machos	Glándulas Accesorias (mm ²)	
	Blancas	Verdes
< 3 h	0,031 \pm 0,002 c	0,024 \pm 0,002 c
1 día	0,053 \pm 0,003 b	0,036 \pm 0,003 c
3 días	0,048 \pm 0,006 b	0,055 \pm 0,009 b
5 días	0,105 \pm 0,006 a	0,077 \pm 0,003 a

Los tamaños de todos los órganos reproductores evaluados (calculados en relación a la longitud total del cuerpo) fueron significativamente mayores para los machos de *N. tenuis* que para los de *M. pygmaeus*. Así, los machos de *M. pygmaeus* tenían más pequeños los testículos ($F = 106,24$; $gl = 1$, $p < 0,0001$), las glándulas accesorias blancas ($F = 101,62$; $gl = 1$; $P < 0,0001$), las glándulas accesorias grises / verdes ($F = 287,19$; $gl = 1$; $P < 0,0001$) y la vesícula seminal ($F = 13,27$; $gl = 1$; $P = 0,0011$) que los de *N. tenuis* (**Tabla 3.4**).

Capítulo 3. Resultados

Tabla 3.4. Tamaño (absoluto y relativo a la longitud total del cuerpo, media \pm ET) de los testículos, glándulas accesorias y vesícula seminal de *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas estadísticamente ($P < 0,05$). n = número de individuos diseccionados.

	<i>M. pygmaeus</i>			<i>N. tenuis</i>		
	n	Tamaño (mm ²)	% del tamaño del cuerpo	Tamaño (mm ²)	% del tamaño del cuerpo	
Testículos	10	0,122 \pm 0,008	16,25 \pm 0,61 b	0,185 \pm 0,009	24,52 \pm 0,51	a
Acc Gl Blancas	10	0,044 \pm 0,001	11,81 \pm 0,22 b	0,105 \pm 0,006	19,41 \pm 0,72	a
Acc Gl Grices/Verdes	10	0,026 \pm 0,001	8,65 \pm 0,29 b	0,077 \pm 0,003	15,16 \pm 0,24	a
Vesícula Seminal	15	0,027 \pm 0,001	5,94 \pm 0,15 b	0,051 \pm 0,003	6,95 \pm 0,23	a

Tabla 3.5. Características de los espermatozoides y su abundancia en las vesículas seminales de los machos de *M. pygmaeus* y de *N. tenuis*. n = número de individuos diseccionados. Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas estadísticamente ($P < 0,05$).

Características del esperma	n	N° células del esperma	<i>M. pygmaeus</i>		<i>N. tenuis</i>	
			Promedio \pm ET		Promedio \pm ET	
Longitud total (μm)	10	120	215,20 \pm 0,15 b		294,19 \pm 15,88	a
Longitud de la cabeza (μm)	10	120	50,59 \pm 4,72 a		39,32 \pm 3,15	b
Longitud de la cola (μm)	10	120	164,60 \pm 13,59 b		254,87 \pm 15,44	a
N° células en la vesícula seminal	15		1503,27 \pm 178,63 a		1903,73 \pm 197,53	a

3.2.3.2. Características del esperma

El número de espermatozoides almacenados en la vesícula seminal fue altamente variable y estadísticamente similar en *M. pygmaeus* y en *N. tenuis* ($F = 2,26$; $gl = 1$; $P = 0,14$) (Tabla 3.5).

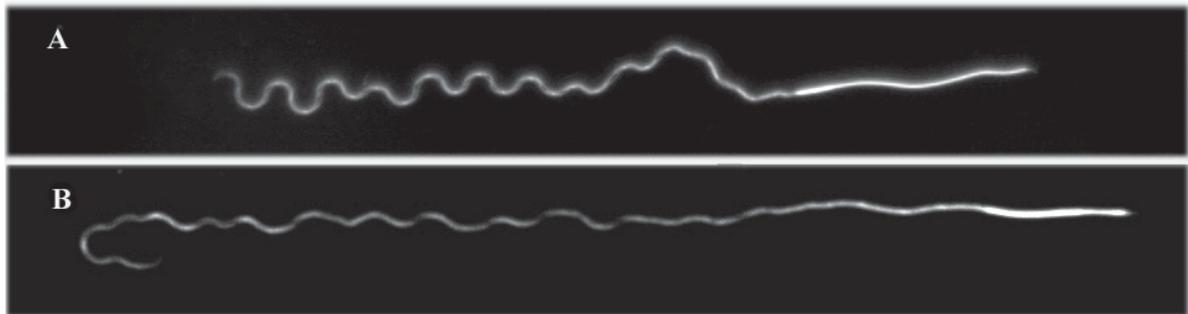


Figura 3.5. Morfología de los espermatozoides de **A**, *M. pygmaeus* y **B**, *N. tenuis*, en campo oscuro (400X).

Las muestras de espermatozoides de las dos especies se tiñeron de color rojo y verde, lo que indica que contenían espermatozoides vivos y muertos. No hubo diferencias significativas entre las especies en cuanto a los porcentajes de espermatozoides vivos ($F = 0,49$; $gl = 1$; $P = 0,505$), con valores del 64% para *M. pygmaeus* y 66% para *N. tenuis*. *M. pygmaeus* tenía espermatozoides significativamente más pequeños ($F = 1512,8$; $gl = 1$; $P < 0,0001$), con una cabeza más larga ($F = 519,75$; $gl = 1$; $P < 0,0001$) y con una cola más corta ($F = 2308,7$; $gl = 1$; $p < 0,0001$) que *N. tenuis* (Fig. 3.5, Tabla 3.5).

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

¿Hay alguna diferencia entre estas dos especies en cuanto al comportamiento en el apareamiento de las hembras (hembras reacias a acoplarse o no y la duración de la cópula)?

La mayor parte del comportamiento en el apareamiento de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* presenta similitudes que son comunes a la familia Miridae, tales como el cortejo descrito anteriormente para *Macrolophus tenuicornis* (Wheeler *et al.*, 1979) y la misma posición en la cópula que se ha descrito en *Lygus hesperus* Knight entre otros (Strong *et al.*, 1970). Como ha señalado Thornhill y Alcock (1983), el cortejo puede ser irrelevante para la identificación de la especie entre la pareja, gracias a la capacidad de las hembras para detectar señales sutiles, pero fiables, asociadas a los machos de su misma especie. Se sabe que los hidrocarburos cuticulares desempeñan un papel importante en el reconocimiento del compañero sexual en varias especies y que pueden ser utilizados para la identificación de especies en el caso de *M. pygmaeus* (Gemeno *et al.* en preparación).

Las diferencias en la receptividad sexual de las hembras de las dos especies podrían estar relacionadas con su comportamiento de monandria o poliandria. El cortejo antes de la cópula probablemente proporcione a la hembra la información para separar a los machos aceptables de los inaceptables. Las hembras de *M. pygmaeus* tienen que ser precisas en la selección del compañero más adecuado ya que sólo se acoplan una vez (o muy pocas veces) en su vida y la viabilidad de su progenie dependerá de esta decisión. Por el contrario, el riesgo de una selección errónea en las hembras de *N. tenuis* no tendría consecuencias tan dramáticas porque estas tendrán más oportunidades de aparearse con diferentes machos.

En míridos, la duración de la cópula puede variar desde unos pocos minutos hasta varias horas (Wheeler, 2001) y esto ha sido confirmado por nuestros datos. Tiempos cortos de apareamiento se han reportado para *Lygocoris pabulinus* L. (2 minutos; Groot *et al.*, 1998), y cópulas largas (\approx 3 horas) se han descrito para *Nesidiocoris césar* Ballard (Chatterjee, 1984); este último valor es similar al registrado en el presente trabajo para *N.*

tenuis. Aunque algunas especies poliandrias tienen cópulas cortas, el prolongado apareamiento descrito en muchas especies poliandrias se ha asociado generalmente con mecanismos de competencia espermática. Cuando una hembra puede aparearse con más de un macho, los machos pueden reducir su competencia intrasexual prolongando el apareamiento (Thornhill y Alcock, 1983). Se han propuesto dos hipótesis para explicar la ventaja del apareamiento prolongado. La hipótesis de ‘preservar al compañero’ propone que al prolongar el tiempo del apareamiento la hembra es menos probable que sea inseminada por otro macho. La hipótesis del ‘traspaso del eyaculado’ propone que cuanto más tiempo dure el apareamiento más espermatozoides recibe la hembra. Ambas hipótesis se podrían aplicar para explicar el comportamiento de apareamiento de *N. tenuis*. Al igual que en muchas especies de insectos, el edeago en *N. tenuis* no tiene acceso directo a las estructuras de almacenamiento del espermatozoide y la eyaculación se deposita en el depósito seminal, un recipiente temporal. A partir de ahí, el espermatozoide se transfiere a los pedicelos de los ovarios por el movimiento de los espermatozoides y/o por contracciones musculares. El largo período de apareamiento en *N. tenuis* se podría interpretar como una forma de vigilancia del compañero sexual después de la inseminación, que permitiría disponer de tiempo suficiente para que los espermatozoides llegaran a la base de los ovarios, reduciendo así el riesgo de desplazamiento de los espermatozoides por otros machos. McLain (1980) demostró que el tiempo prolongado de cópula en *Nezara viridula* reduce el éxito de los machos rivales que copulan posteriormente para fertilizar los huevos. Además, el volumen de la eyaculación fue mayor en *N. tenuis* que en *M. pygmaeus* y esto también está relacionado con la duración de la cópula.

En nuestras condiciones experimentales, las hembras de *M. pygmaeus* rechazaron enérgicamente una nueva cópula en el plazo de cinco días consecutivos. Gemeno *et al.* (2007) mostraron el mismo rechazo de las hembras de *M. pygmaeus* para aparearse una segunda vez en el lapso de 3 semanas después de la primera cópula. Tal negativa prolongada a un segundo apareamiento sugiere que las hembras sólo aceptan uno o muy pocos machos durante su vida, siendo este comportamiento sexual muy poco común en esta familia (Wheeler, 2001). Sin embargo, los machos de *M. pygmaeus* fueron capaces de aparearse varias veces durante tres días consecutivos, con tiempos de cópula similares en todos sus apareamientos. La escasa variación en la duración de la cópula sugiere que el primer acoplamiento no afectó a su capacidad de volver a aparearse en tan poco tiempo. Las hembras y los machos de *N. tenuis* fueron capaces de tener múltiples apareamientos.

La duración de la primera cópula del macho fue más corta que la tercera, lo que podría estar relacionado con una posible reducción en el tamaño de las sucesivas eyaculaciones debido al alto costo que representa cada eyaculado para el macho. Esto se ha demostrado en *Jalmenus evagoras* (Lepidoptera) (Hughes *et al.*, 2000).

¿Cuáles son los beneficios (tales como reposición de espermatozoides en sus almacenes, regalos materiales) que las hembras de las especies poliandrias pueden obtener del apareamiento múltiple?

Las hembras de *M. pygmaeus* tenían espermatozoides en los oviductos después de 21 días de haberse apareado una sola vez. Por lo tanto, es probable que un solo apareamiento sea suficiente para fertilizar todos los huevos ya que, a 25°C, las hembras ponen huevos durante tres semanas aproximadamente (Hansen *et al.*, 1999). Por el contrario, sólo el 20% de las hembras de *N. tenuis* tenían espermatozoides en los oviductos después de tres semanas de haberse apareado una sola vez. Por tanto, las hembras de *N. tenuis* necesitan más de un apareamiento para reponer el reservorio de espermatozoides con el que fertilizan sus huevos. Así, mientras las hembras de algunas especies sólo necesitan acoplarse una vez para obtener suficiente espermatozoides para fecundar todos los huevos que producen durante su vida, las hembras de otras especies se quedan sin espermatozoides si no se aparean con más de un macho. Ridley (1988) encontró que de 48 especies examinadas, el 58% de las hembras se quedaron sin espermatozoides después de una sola cópula.

Aunque las hembras de *M. pygmaeus* tenían un depósito seminal menor que el de las hembras de *N. tenuis*, les tomó mucho más tiempo vaciarlo por completo del eyaculado almacenado. Esta presencia prolongada del eyaculado en el depósito seminal de las hembras de *M. pygmaeus* no se puede relacionar con la migración de los espermatozoides a los órganos de almacenamiento, ya que después de 10-12 h del apareamiento sólo se encontraron espermatozoides muertos dentro del depósito seminal. Es posible que las sustancias seminales transferidas por los machos puedan inducir un comportamiento refractario en las hembras que les impida reacoplarse, como se ha demostrado ampliamente en otros insectos (Harmer *et al.*, 2006; South y Arnqvist, 2008; Hosken *et al.*, 2009). Sin embargo, la receptividad sexual de las hembras de *M. pygmaeus* no cambió después de la digestión completa de estas secreciones, probablemente porque las hembras de esta especie sólo acepten una única cópula en toda su vida. Esto explicaría la presencia

de espermatozoides vivos durante la mayor parte de la vida de la hembra ya que un sólo macho proporcionaría el esperma necesario con el que fertilizar todos los huevos. Por el contrario, las hembras de *N. tenuis* recibieron un eyaculado mayor que fue digerido en menos de un día. Probablemente la rapidez en digerir el eyaculado del depósito seminal hace que las hembras sean capaces de aparearse varias veces. Uno de los beneficios de las cópulas múltiples es que los sucesivos eyaculados pueden ser usados como alimento por la hembra.

¿Hay alguna diferencia en cuanto a la inversión en los órganos espermátogénicos (tamaño de los testículos, tamaño y/o número de espermatozoides y la viabilidad de los mismos) y en el volumen de la eyaculación (tamaño de las glándulas accesorias reproductivas) entre estas especies que podría tener relación con la competencia espermática?

Una consecuencia de los apareamientos múltiples es que los espermatozoides de machos rivales se solapan en el tracto reproductivo de una hembra y compitan entre sí para fertilizar los huevos (Parker, 1970). La competencia espermática se reconoce como una fuerza evolutiva de los caracteres reproductores masculinos (Simmons, 2001b) y los machos han desarrollado una serie de adaptaciones que implican una inversión importante en la espermátogénesis, que incluye un aumento del tamaño testicular y de la producción de espermatozoides (Harcourt *et al.* 1981; Gage, 1994; Hosken, 1997).

Obligar a la monogamia a los machos polígamos durante varias generaciones causa una reducción en el tamaño de los testículos en relación a los machos control en varias especies de insectos (i.e, moscas amarillas (Hosken y Ward, 2000, 2001), escarabajos del estiércol (Simmons y García-González, 2008) y es una desventaja para la fertilización. Así, los testículos más grandes están asociados a un mayor éxito reproductor. Los testículos grandes producen mayor cantidad de esperma en aves y en mamíferos (Moller, 1988; 1989) y en lepidópteros, producen eyaculados mayores con espermatozoides más largos (Gage, 1994).

En *N. tenuis* es probable que haya competencia espermática debido a que las hembras se aparean con más de un compañero y el esperma de más de un macho puede coexistir en los órganos de almacenamiento de las hembras. Por tanto, es de esperar que haya una

inversión importante en los órganos espermátogénicos de esta especie. Por el contrario, no se espera competencia espermática en *M. pygmaeus* y la inversión en los órganos espermátogénicos sería la mínima necesaria para abastecer a una sola fertilización. Así, las glándulas accesorias reproductoras, los testículos y las vesículas seminales de los machos de *N. tenuis* eran más grandes que los de *M. pygmaeus* proporcionalmente a la longitud del cuerpo. Las glándulas accesorias reproductoras de los machos de *M. pygmaeus* tardaron 3 días en desarrollarse (Gemeno *et al.*, 2007), mientras que en *N. tenuis* tardaron 5 días. Esto podía deberse a que estas glándulas son mayores en *N. tenuis* y necesitarían más tiempo para llenarse. El mayor tamaño de estas glándulas también se relacionó con el mayor volumen de eyaculado en *N. tenuis*. Los tamaños de los testículos y de las vesículas seminales se relacionan con el número y / o el tamaño de los espermatozoides que producen y almacenan. En *N. tenuis*, el mayor volumen de ambas estructuras estaba relacionado con el tamaño de los espermatozoides, que fueron significativamente mayores que los de *M. pygmaeus*, pero no con su número ya que se registró un número similar de espermatozoides en las vesículas seminales de ambas especies.

La viabilidad de los espermatozoides proporciona una estima de la calidad, la funcionalidad y la longevidad de la eyaculación (Holman, 2009). Se ha encontrado una mayor viabilidad de los espermatozoides en las especies promiscuas que en las especies monógamas, por lo que la viabilidad parece desempeñar un papel importante en la competencia espermática (Hunter y Birkhead, 2002). Sin embargo, en el presente estudio no hubo diferencias notables el porcentaje de espermatozoides viables entre *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Ambas especies mostraron una elevada viabilidad en relación a otras especies, con porcentajes de entre el 30-56% (Damiens *et al.*, 2002, 2003; Demary, 2005).

Las adaptaciones morfológicas de los espermatozoides pueden ser un elemento importante en la fertilización (Evans y Simmons, 2008). Por ejemplo, la cola larga les permite una mayor velocidad en el desplazamiento para fecundar los huevos, pueden sobrevivir más tiempo dentro de los órganos reproductivos de las hembras o pueden ser más resistentes ante la presencia del espermatozoide de otros machos (Simmons, 2001b; Gomendio y Roldán, 2008). En nuestro trabajo, *N. tenuis* es la especie en que se da la competencia espermática y tiene el espermatozoide más largo que *M. pygmaeus*. Sin embargo, la

teoría de que la selección impuesta por la competencia espermática favorece un aumento de la longitud de espermatozoides debe interpretarse con cierta precaución. La producción de espermatozoides está relacionada con el tamaño de la eyaculación, la cantidad y calidad del espermatozoides y presenta una considerable variación intra e interespecíficas (Evans y Simmons, 2008).

En conclusión, existen diferencias en el comportamiento de apareamiento entre estas dos especies, siendo las hembras de *M. pygmaeus* monandrias y las de *N. tenuis* poliandrias, mientras que los machos en ambos casos son polígamos. Las adaptaciones asociadas con el régimen monándrio incluyeron: el comportamiento de cortejo, donde las hembras fueron reacias a acoplarse, la pequeña eyaculación de los machos relacionada con la falta de competencia espermática dentro de los órganos femeninos, y la lentitud con que se digirió el eyaculado del depósito seminal en las hembras.

Las adaptaciones asociados con el régimen poliándrio fueron: las hembras aceptaban fácilmente a los machos para la cópula, la mayor eyaculación de los machos relacionada con la competencia espermática en los órganos de las hembras, la rápida digestión del eyaculado en el depósito seminal de las hembras lo que permitía aceptar enseguida una segunda cópula. Además hay una inversión mayor en el tamaño de los órganos implicados en la espermatogénesis en especies con hembras promiscuas, tales como las glándulas accesorias reproductoras, las vesículas seminales, los testículos y los espermatozoides.

DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios realizados en el presente trabajo han permitido profundizar en el conocimiento de la biología reproductora de *M. pygmaeus* y de *N. tenuis*, incluyendo aspectos que pueden incidir en una mejora de su utilización como agentes de control biológico de plagas en cultivos hortícolas.

Como ya se ha mencionado en la introducción, estas especies son muy abundantes en toda la región mediterránea y además ambas se producen comercialmente para liberarlas principalmente en cultivos protegidos. Las poblaciones naturales de estas especies tienen un papel fundamental en los programas de control biológico, tanto por conservación como por inoculación, que se aplican en esta región, ya que colonizan los cultivos que han sido poco tratados con plaguicidas. Esto incluye los cultivos al aire libre cuyo control se basa exclusivamente en las migraciones de estos depredadores. Pero también los cultivos de invernadero en los que se realizan inoculaciones al inicio del cultivo, ya que en una fase más avanzada son colonizados muy a menudo por poblaciones naturales de estos depredadores que contribuyen en gran medida a la eficacia del control biológico. Esta dinámica está favorecida por la estructura semi-abierta de los invernaderos. Así, los resultados de estos estudios tienen un interés aplicado, tanto en lo referente a la producción masiva de estos depredadores para su inoculación en los cultivos (capítulo 2 y algunos aspectos del capítulo 3), como para conocer mejor la dinámica de las poblaciones naturales y potenciar el control biológico por conservación (capítulo 1). Pero estos resultados tienen también un interés más general en cuanto a la biología evolutiva de estas especies (capítulo 3).

Los estudios realizados en el capítulo 1, permitieron conocer el estado reproductor de las poblaciones naturales de *M. pygmaeus* recolectadas sobre plantas de *P. officinalis* entre Enero del 2007 y Abril del 2009. Dado que no se conocía la edad real de las hembras, la evaluación de la supervivencia permitió realizar una estimación de las edades de estas hembras en cada uno de los muestreos. En la mayor parte de los muestreos realizados se

encontraron hembras de todas las categorías de edades establecidas lo que indica que las generaciones están muy solapadas. Gran parte de las hembras muestreadas se distribuyeron entre las categorías “maduras” y “jóvenes”, siendo estas categorías las que presentaron una mayor fertilidad. Por tanto, hay hembras reproductivamente activas a lo largo de todos los meses del año. Sin embargo, hubo algunas diferencias entre los dos años de muestreo y se encontraron más hembras de las categorías “muy jóvenes” y “viejas” en el 2008 que en el 2007.

Las hembras que no produjeron ninfas a 25°C, representaron sólo el 11% de todas las hembras muestreadas. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en una colonia de laboratorio de esta misma especie donde se encontró que el 10,5% de las hembras eran infértiles (Castañé *et al.*, 2007). Este porcentaje de infertilidad en *M. pygmaeus* podría considerarse bajo en relación a otras especies, ya que en el caso de *O. insidiosus* Richards y Schmidt (1996) reportaron un 30% de infertilidad en hembras recolectadas en campo. Para *O. laevigatus* se ha registrado una infertilidad de hasta el 53% en hembras recolectadas en distintas zonas de Italia y a lo largo de diversos periodos del año (Tommasini y van Lenteren, 2003). En este estudio, las hembras infértiles pertenecieron mayoritariamente a la categoría “viejas”. Esta categoría estuvo presente en la mayoría de muestreos a lo largo del año, pero fue diferente para cada año, siendo el 2008 el año con el mayor número de hembras infértiles. El hecho de que casi todas las hembras infértiles se encontraran en la categoría “viejas” posiblemente indica que estaban en un estado post-vitelogénico de su desarrollo y por esta razón no produjeran ninfas. Por tanto, la infertilidad en las poblaciones de campo de este depredador no parece ser un factor limitante que afecte a su utilización como agente biológico, ya que las hembras de las otras categorías de edad se encuentran en mayor proporción en prácticamente todas las épocas del año y esas serán las potenciales colonizadoras de los cultivos.

La recolección de hembras de *M. pygmaeus* sobre *P. officinalis* durante dos años y medio representan una muestra muy amplia de los posibles estados fisiológicos en que se encuentran las poblaciones naturales. Al evaluar el estado del desarrollo de los ovarios se encontró un 78% de hembras grávidas, es decir tenían los dos tipos de oocitos, los corionados y los vitelogénicos. Se encontró un mayor número de oocitos en invierno que

en verano, y se hallaron hembras con oocitos corionados en todas las fechas muestreadas y hembras con oocitos vitelogénicos en casi todas, indicando que las hembras produjeron huevos continuamente a lo largo del año. Aunque también se observaron hembras sin oocitos, sólo se presentó un porcentaje mayor del 50% en 3 fechas del otoño del 2007 y eso no se repitió en el otoño del 2008. Además, durante los inviernos el porcentaje de hembras sin oocitos en ningún caso fue superior al 20%.

Una vez identificadas las hembras que no presentaron oocitos desarrollados en sus ovarios se les evaluó el estado del depósito seminal. Así, los resultados del capítulo 3 sobre el vaciado del depósito seminal y sobre la monandria de las hembras de *M. pygmaeus* nos permitieron interpretar mejor los resultados de las disecciones de las hembras recolectadas en el campo. Así, las hembras sin oocitos desarrollados pero con el depósito seminal lleno indicaban que se habían acoplado en el plazo máximo de una semana. Como las hembras de esta especie sólo aceptan una única cópula, se debía tratar de hembras jóvenes ya que se acoplan a edad temprana (Castañé *et al.*, 2007) para poder fertilizar el mayor número de huevos posibles durante toda su vida. Las hembras sin oocitos y con el depósito seminal vacío, deberían ser hembras en un estado de desarrollo post-vitelogénico, es decir hembras viejas que ya habrían agotado las secreciones del eyaculado y posiblemente también el reservorio de esperma. Esta suposición coincide con los resultados obtenidos con hembras del mismo origen pero mantenidas en la cámara de 25°C. En ese caso, prácticamente todas las hembras infértiles pertenecían a la categoría “viejas”.

Por tanto, las hembras recolectadas sobre *P. officinalis* estaban reproductivamente activas durante todo el año y no mostraban signos de diapausa. Los fallos en la instalación de las poblaciones en los cultivos de invierno no se deberían atribuir a que las hembras estén en un estado diapausante. Lo más probable es que tenga que ver con que se ralentiza el desarrollo y la reproducción debido a las bajas temperaturas que se dan en los cultivos, como se muestra en Malo (2009).

El antisuero policlonal desarrollado después de un proceso de agotado para eliminar reacciones inespecíficas, permitió la evaluación de la presencia de la proteína del huevo en hembras de *M. pygmaeus* mediante ELISA indirecto. La alta sensibilidad del antisuero policlonal permitió detectar no sólo un huevo corionado, u oocitos vitelogénicos, sino también los precursores de la proteína del huevo. Las proteínas del huevo y sus precursores comparten propiedades inmunológicas y son similares en su caracterización física y química.

Gran parte de la población recolectada en campo, perteneciente a los muestreos del capítulo 1, se analizó mediante el conteo de oocitos corionados tras la disección de las hembras y luego mediante la técnica ELISA indirecto. De todas las hembras recolectadas en campo, aproximadamente el 24% no presentaron oocitos corionados. Dentro de ellas, el 10,5% dieron valores de absorbancia menores que el “punto de corte”, lo que indica que estas hembras no presentan proteínas del huevo, ni sus precursores. Este porcentaje podría corresponder por una parte a algunas hembras recién mudadas que todavía no hubieran iniciado la producción de vitelogenina, pero lo más probable es que fueran hembras viejas que no produjeran proteínas del huevo y / o sus precursores, como se ha argumentado en la discusión del capítulo anterior. El 12,6% correspondió a hembras sin oocitos pero con valores de absorbancia superiores al “punto de corte”. Es probable que estas muestras correspondieran a hembras jóvenes que inician el proceso de vitelogénesis, o bien, a hembras que habían depositado recientemente toda su carga de huevos. Sólo se encontró un porcentaje muy bajo de las determinaciones erróneas correspondientes a hembras grávidas que proporcionaron valores de absorbancia menores que el “punto de corte”.

Este trabajo demuestra la importante utilidad de este tipo de antisueros para determinar la presencia de la proteína del huevo en las hembras de una forma rápida mediante la técnica ELISA, y así evaluar de forma inmediata el porcentaje de hembras reproductoras en una población. Esta técnica permite en un solo día analizar un elevado número de individuos. Sin embargo, el método tradicional basado en la observación visual necesita el tiempo necesario para que las hembras puedan poner sus huevos, seguido del posterior desarrollo embrionario y la emergencia de las ninfas de primer estadio, lo que implica varias

semanas. Esto es así, porque los huevos son muy difíciles de ver en el interior de los tejidos de la planta y debe evaluarse la aparición de ninfas de primer estadio.

El hecho de poder conocer el porcentaje de hembras grávidas o el porcentaje de aquellas que están iniciando su estado vitelagénico, puede ayudar a predecir el grado de colonización y el establecimiento de las poblaciones en los cultivos. De acuerdo a los resultados del capítulo 1, la mayoría de las hembras de las poblaciones naturales presentaron oocitos corionados a lo largo de todas las estaciones del año. Sin embargo, aquellas hembras que no tenían oocitos desarrollados precisaron de la evaluación del estado del depósito seminal para descartar si estaban o no reproductivamente activas. En cambio, por medio de los métodos serológicos se pueden detectar las proteínas del huevo y sus precursores, lo que hace que este procedimiento sea más preciso y más rápido que el conteo de oocitos en desarrollo y la evaluación del depósito seminal para determinar si una hembra de *M. pygmaeus* está reproductivamente activa.

Asimismo, esta técnica permite estimar la fecundidad potencial y puede ser usado para el control de calidad en la producción masiva de insectos. La evaluación de estas colonias permitirá establecer si estas poblaciones se encuentran en buen estado y si están reproductivamente activas o bien hay algún problema que ocasiona infertilidad en la colonia.

Los estudios realizados en el capítulo 3, evalúan las adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento relacionadas con las estrategias reproductoras que presentan *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Dado que en una de ellas se da la competencia espermática entre el esperma de diferentes machos en el interior de la hembra y en la otra especie no se da este fenómeno, esto determina diferencias en la receptividad sexual y el número de acoplamientos de las hembras, la velocidad de digestión del eyaculado en la hembra relacionado con la receptividad sexual, el tamaño de la eyaculación que recibe la hembra y el tamaño de las estructuras reproductoras de los machos que producen ese eyaculado, como son las glándulas accesorias reproductoras, los testículos, la vesícula seminal y los espermatozoides. Como se ha descrito, la competencia espermática es una

fuerza evolutiva de primer orden que determina toda una serie de adaptaciones a distintos niveles de la biología de las especies y que en este trabajo se dan dos ejemplos bien contrastados.

Más allá del interés evolutivo, debemos mencionar la posible aplicación práctica que la información generada en este trabajo pueda tener. En el campo de las crías comerciales de *M. pygmaeus* después de la primera semana de adultos en que se producirán las cópulas, no vale la pena mantener a los machos en la colonia ya que las hembras difícilmente se volverán a acoplar. Esto representa un ahorro considerable ya que se puede prescindir de la mitad de la población y reducir uno de los costes más importantes que es la alimentación. Generalmente estas crías se mantienen con huevos de *E. kuenhiella* los cuales son muy caros. Otro gasto importante es el mantenimiento de las plantas de tabaco sobre las que viven los insectos y que se mantienen dentro de cámaras de condiciones controladas. Si se reduce la población se puede reducir el número de plantas y ahorrar a su vez espacio en la cámara. Así, se simplificarían la cría y se disminuirían los costes en cuanto al consumo de alimento y plantas. En el caso de las crías de *N. tenuis* esta simplificación no sería posible ya que las hembras necesitan acoplarse de forma periódica para reabastecerse de esperma. Por tanto, en este caso será necesario mantener a los machos en la colonia.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las hembras de *M. melanotoma* recolectadas entre Marzo y Noviembre del 2006 se reprodujeron bajo condiciones controladas a 25°C y presentaron un porcentaje alto de hembras fértiles.
2. Las hembras de *M. pygmaeus* recolectadas sobre *P. officinalis* y mantenidas bajo condiciones controladas a 25°C presentaron una supervivencia variable, siendo particularmente mayor durante el otoño y el invierno. Esta supervivencia variable permitió establecer diferentes categorías de edades.
3. Las hembras de *M. pygmaeus* recolectadas sobre *P. officinalis* y mantenidas en condiciones naturales presentaron también una supervivencia variable, con un rango mucho más amplio de variación, y siendo particularmente prolongada durante el otoño y el invierno. Se establecieron más categorías de edades y de rangos más amplios de días.
4. Tanto en condiciones controladas como en condiciones naturales predominaron las hembras jóvenes seguidas de las maduras con respecto a las demás categorías de edad.
5. Las hembras de las categorías de edades establecidas presentaban diferentes grados de fertilidad que estaban inversamente relacionadas con su supervivencia en condiciones controladas.
6. La mayor parte (>80%) de las hembras infértiles de *M. pygmaeus* bajo condiciones controladas pertenecían a la categoría ‘viejas’, las cuales podrían encontrarse en un estado post-vitelogénico.
7. En todos los muestreos realizados se encontraron hembras con oocitos corionados y en todos menos en cuatro fechas hembras con oocitos vitelogénicos, indicando que las hembras estaban reproductivamente activas a lo largo de todo el periodo de muestreo.
8. No se apreciaron signos fisiológicos de la diapausa, tales como un incremento de los cuerpos grasos que rodean los ovarios, en las hembras.
9. Las poblaciones de *M. pygmaeus* que se encontraron sobre *P. officinalis* están bien preparadas a nivel reproductivo para instalarse en los cultivos ya que pueden iniciar la puesta enseguida por estar produciendo huevos continuamente a lo largo del año.

10. El antisuero policlonal desarrollado en este trabajo, junto con el protocolo del agotado, permiten la detección de las proteínas del huevo en hembras de *M. pygmaeus* por medio del uso de la técnica inmunológica ELISA.

11. El antisuero también es capaz de detectar la presencia de los precursores de estas proteínas. Por ello es más sensible en evaluar el estado reproductor de la hembra que la evaluación de la fertilidad por medio del conteo de ninfas recién eclosionadas.

12. Esta técnica permite procesar en un solo día un gran número de individuos, mientras que por las técnicas tradicionales se requiere n por lo menos dos semanas, debido al tiempo necesario para el desarrollo del embrión y la eclosión de las ninfas.

13. Este protocolo se podría utilizar para el control de calidad de la producción a gran escala de estos insectos, así como para evaluar el estado reproductor de las hembras presentes en las infraestructuras ecológicas que podrían colonizar los cultivos.

14. El comportamiento sexual de las hembras de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* fue diferente, siendo las primeras monándrias y las segundas poliándrias. En ambos casos los machos fueron poligínicos.

15. Las adaptaciones asociadas al comportamiento monándrio en las hembras de *M. pygmaeus* incluyeron la resistencia de las hembras hacia la copula, el pequeño tamaño del eyaculado del macho y al ritmo lento en que se digirió el eyaculado en el depósito seminal.

16. Las adaptaciones asociadas al comportamiento poliándrio en *N. tenuis* incluyeron la facilidad con que las hembras aceptaron las sucesivas cópulas, el gran tamaño del eyaculado del macho, debido la competencia espermática que sufrirá dentro de los órganos genitales de la hembra; y la rapidez con que se digirió el eyaculado en el depósito seminal de la hembra

17. Las adaptaciones asociadas a la competencia espermática en los machos de *N. tenuis* estuvieron relacionados con el incremento del tamaño de la eyaculación en relación a la de *M. pygmaeus*. Incluyeron el mayor tamaño de las glándulas accesorias reproductoras, la vesícula seminal, los testículos y los espermatozoides, que en el caso de *M. pygmaeus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, S.A., Frede, S., Rubiolo, E.R., Canavoso, L.E. 2008.** Vitellogenesis in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas' disease. *Journal of Insect Physiology* 54, 393-402.
- Agustí, N., Aramburu, J., Gabarra, R. 1999.** Immunological detection of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ingested by Heteropteran predators: time-related decay and effect of meal size on detection period. *Annals of Entomological Society of America* 92, 56-62.
- Agustí, N., Gabarra, R. 2009.** Puesta a punto de una cría masiva del depredador polífago *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae). *Boletín Sanidad Vegetal: Plagas* 35, 205-218.
- Albajes, R., Alomar, O. 1999.** Current and potential use of polyphagous predators. En: Albajes, R., van Lenteren, J.C., Gullino, M.L., Elad, Y. *Integrated pest and diseases management in greenhouse crops*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp 265-275.
- Alomar, O., Castañé, C., Gabarra, R., Arnó, J., Ariño, J., Albajes, R. 1991.** Conservation of native bugs for biological control in protected and outdoor tomato crops. *IOBC/WPRS Bulletin* 14(5), 33-42.
- Alomar, O. 1994.** Els mírids depredadors (Heteroptera: Miridae) en el control integrat en cultius de tomaquet. *Tesi Doctoral*. Universitat de Barcelona. 151p.
- Alomar, O., Goula, M., Albajes, R. 1994.** Mirid bugs for biological control: identification, survey in non-cultivated winter plants, and colonization of tomato fields. *IOBC/WPRS Bulletin*. 17: 217-223.

- Alomar, O., Albajes, R. 1996.** Greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) predation and tomato fruit injury by the zoo-phytophagous predator *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae), pp. 155-177. En: Alomar O., Wiedenmann, R. (eds), Zoophytophagous Heteroptera: Implications for Life History and IPM. Thomas Say Special Publications in Entomology, Entomological Society of America.
- Alomar, O., Goula, M., Albajes, R. 2002.** Colonisation of tomato fields by predatory mirid bugs (Hemiptera: Heteroptera) in northern Spain. Agriculture, Ecosystems and Environment, 89, 105-115.
- Alomar, O., Albajes, R. 2003.** Habitat management for conservation of the native predator *Macrolophus caliginosus*. IOBC/WPRS Bulletin 26(4), 7-12.
- Alomar, O., Riudavets, J., Castañé, C. 2006.** *Macrolophus caliginosus* in the biological control of *Bemisia tabaci* on greenhouse melons. Biological Control 36 (2), 154-162.
- Altieri, M.A., Nicholls. C.I. 2004.** Biodiversity and pest management in agroecosystems. Food Products Press, Binghamton USA.
- Alvarado, P., Baltà, O., Alomar, O. 1997.** Efficiency of four heteroptera as predators of *Aphis gossypii* Glover and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hom.: Aphididae). Entomophaga 42 (1/2), 215-226.
- Arnó, J., Ariño, J., Español, R., Martí, M., Alomar, O. 2000.** Conservation of *Macrolophus caliginosus* Wagner (Het: Miridae) in commercial greenhouses during tomato crop-free periods. IOBC/WPRS Bulletin 23(1), 241-246.
- Arnó, J., Matas, M., Martí, M., Ariño, J., Roig, J., Gabarra, R. 2005.** Coexistence between *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* and impact of natural enemies in tomato crops under Mediterranean conditions. IOBC/WPRS Bulletin 28(1), 1-4.

- Arnó J., Castañé C., Riudavets J., Gabarra R. 2006a.** Characterization of damage to tomato plants produced by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. IOBC/WPRS Bulletin 29(4), 229-234.
- Arnó, J., Castañé, C., Riudavets, J., Roig, J. Gabarra, R. 2006b.** Characterization of damage to tomato plants produced by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. IOBC/WPRS Bulletin 29(4), 239-244.
- Arnó, J., Castañé, C., Riudavets, J. 2010.** Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). Bulletin of Entomological Research 100, 105-115.
- Arnqvist, G., Nilsson, T. 2000.** The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. Animal Behaviour 60, 145-164.
- Arnqvist, G., Rowe, L. 2005.** Sexual conflict. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Barbosa, P. 1998.** Agroecosystems and conservation biological control. En: Barbosa, P. 1998. Conservation Biological Control. Academic Press EE UU Pp39-54.
- Barnadas, I., R., Gabarra., R. Albajes. 1998.** Predatory capacity of two mirid bugs preying on *Bemisia tabaci*. Entomologia Experimentalis et Applicata 86, 215-219.
- Bas, C., González, O., Arnó, J., Alomar, O. 2001.** Conservación y aumentación de *Macrolophus caliginosus* en invernadero de tomate temprano. Comunicación oral en el II Congreso Nacional de Entomología Aplicada. VIII Jornadas Científicas de la SEE. Pamplona, 12-16 de noviembre de 2001.
- Beck, S.D. 1980.** Insect photoperiodism. pp 387. Academic Press, New York.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. 1990.** Ecology. Individuals Populations and Communities. 2nd ed. Blackwell Science, Taunton, U.S.A.

- Boller, E.F., Avilla, J., Joerg, E., Malavolta, C., Wijnands, F.J., Esbjerg, P. 2004.** Guidelines for integrated production. Principals and technical guidelines. 3rd ed. IOBC/WPRS Bulletin 27.
- Calvo, J., Urbaneja, A. 2003.** *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae) en tomate: ¿amigo o enemigo? Almería Verde 4, 21–23.
- Calvo, J., Belda, J.E. 2008.** Cucurbitáceas bajo abrigo. En: Jacas, J.A., Urbaneja, A. Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma (Eds). España. Pp 423-434.
- Calvo, J., Bolckmans, K., Stansly, P.A., Urbaneja, A. 2008.** Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato. BioControl 54(2), 237-246.
- Carayon, J. 1954.** Organes assumant les fonctions de la spermathèque chez divers Héétéroptères. Bulletin de la Société Zoologique de France 9, 189-197.
- Carayon, J. 1984.** Faits remarquables acompagnant l'insemination chez certains Heteropteres Miridae. Bulletin de la Société zoologique de France 89, 312–328.
- Castañé, C., Alomar, O., Goula, M., Gabarra, A. 2000.** Natural populations of *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii* in the control of the greenhouse whitefly in tomato crops. IOBC/WPRS Bulletin 23(1), 221-224.
- Castañé, C. 2002.** Status of biological and integrated control in greenhouse vegetables in Spain: successes and challenges. IOBC/WPRS Bulletin 25, 49-52.
- Castañé, C., Alomar, O., Goula, M., Gabarra, R. 2004.** Colonization of tomato greenhouses by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. Biological Control 30(3), 591-597.
- Castañé, C., Zapata, R. 2005.** Rearing the predatory bug *Macrolophus caliginosus* on a meat-based diet Biological Control 34(1), 66-72.

- Castañé, C., Quero, R., Riudavets, J. 2006.** The brine shrimp *Artemia* sp. As alternative prey for rearing the predatory bug *Macrolophus caliginosus*. *Biological Control* 38, 405-412.
- Castañé, C., Alomar, O., Riudavets, J., Gemeno, C. 2007.** Reproductive biology of the predator *Macrolophus caliginosus*: Effect of age on sexual maturation and mating. *Biological Control* 43, 278-286.
- Castañé, C., Arnó, J., Beitia, F., Gabarra, R. 2008.** Control biológico de moscas blancas. En: Jacas, J.A., Urbaneja, A. Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma (Eds). España. Pp 239-253.
- Chatterjee V.C. 1984.** Copulation and oviposition behaviour of *Nesidiocoris caesar* (Ballard) (Heteroptera: Miridae). *Entomon* 9, 35–37.
- Clark, M.F., Adams, A.N. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-483.
- Constant, B., Grenier, S., Bonnot, G. 1994.** Analysis of some morphological and biochemical characteristics of the eggs of the predaceous bug *Macrolophus caliginosus* (Het:Miridae) during embryogenesis. *Entomophaga* 39(2), 189-198.
- Constant, B., Grenier, S., Bonnot, G. 1996.** Artificial Substrate for Egg Laying and Embryonic Development by the Predatory Bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Biological Control* 7(2), 140-147.
- Damiens, D., Bressac, C., Brillard, J.P. Chevrier, C. 2002.** Qualitative aspects of sperm stock in males and females from *Eupelmus orientalis* and *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Chalcidoidea) as revealed by dual fluorescence. *Physiological Entomology* 27, 97-102.

- Damiens, D., Bressac, C., Chevrier, C. 2003.** The effect of age on sperm stock and egg laying in the parasitoid wasp, *Dinarmus basalis*. *Journal of Insect Science* 3, 1-5.
- Davis, N.T. 1955.** Morphology of the female organs of reproduction in the Miridae (Hemiptera). *Annals Entomological Society of America* 48, 132-155.
- DeBach, P. 1964.** *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. Chapman and Hall LTD. London.
- Demary, K.C. 2005.** Sperm storage and viability in *Photinus fireflies*. *Journal of Insect Physiology* 51, 837-841.
- Dong, S.Z., Ye, G.Y., Zhu, J.Y., Chen, Z.X., Hu, C., Liu, S. 2007.** Vitellin of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae), a pupal endoparasitoid of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae): Biochemical characterization, temporal patterns of production and degradation. *Journal of Insect Physiology* 53, 468-477.
- El-Dessouki, S.A., El-Kifl, A.H., Helal, H.A. 1976.** Life cycle, host plants and symptoms of damage of the tomato bug, *Nesidiocoris tenuis* Reut. (Heteroptera: Miridae) in Egypt. *Journal of Plant Diseases and Protection* 83(4), 204–220.
- Evans, J.P., Simmons, L.W. 2008.** The genetic basis of traits regulating sperm competition and polyandry: can selection favour the evolution of good- and sexy-sperm? *Genetica* 134, 5-19.
- Fauvel, G.; Malausa, J.C., Kaspar, B. 1987.** Étude en laboratoire des principales caractéristiques biologiques de *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Entomophaga* 32 (5), 529-543.
- Fedorka, K.M., Mousseau, T.A. 2002.** Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. *Animal behaviour* 64, 361-367.

- Gabarra, R., Castañé, C., Bordas, E., Albajes, R. 1988.** *Dicyphus tamaninii* as a beneficial insect and pest in tomato crops in Catalonia, Spain. *Entomophaga* 33(2), 219-228.
- Gabarra, R., Arnó, Alomar, O., Albajes, R. 1999.** Naturally occurring populations of *Encarsia pergandiella* (Hymenoptera: Aphelinidae) in tomato greenhouses. *IOBC/WPRS Bulletin* 22, 85-88.
- Gabarra, R., Besri, M. 1999.** Tomatoes. En: Albajes, R., Gullino, M.L., van Lenteren, J.C., Elad, Y. (Eds). *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Pp: 420-434.
- Gabarra R., Alomar, O., Castañé, C., Goula, M., Albajes, R. 2004.** Movement of greenhouses whitefly and its predators between in- and outside of Mediterranean greenhouses. *Agriculture, Ecosystems Environment* 102, 341-348.
- Gabarra, R., Zapata, R., Castañé, C., Riudavets, J., Arnó, J. 2006.** Releases of *Eretmocerus mundus* and *Macrolophus caliginosus* for controlling *Bemisia tabaci* on spring and autumn greenhouse tomato crops. *IOBC/WPRS Bulletin* 29(4), 67-72.
- Gabarra, R., Arnó, J., Riudavets, J. 2008.** Tomate. En: Jacas, J.A., Urbaneja, A. *Control biológico de plagas agrícolas*. Phytoma (Eds). España. Pp 410-422.
- Gage, M.J.G. 1994.** Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 258, 247–254.
- Galipienso, L., Herranz, M.C., Pallás, V., Aramburu, J. 2005.** Detection of a tomato strain of *Parietaria mottle virus* (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology* 54, 29-35.

- García-González, F., Simmons, L.W. 2005.** Sperm viability matters in insect sperm competition. *Current Biology* 15, 271-275.
- Gemeno, C., Alomar, O., Riudavets, J., Castané, C. 2007.** Mating periodicity and post-mating refractory period in the zoophytophagous plant bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *European Journal of Entomology* 104, 715–720.
- Gerling, D., Alomar, O., Arnó, J. 2001.** Biological Control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Protection* 20, 779-799.
- Gomendio, M., Roldán, E. 2008.** Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *The International Journal of Developmental Biology* 52, 439-447.
- Goula, M., Alomar, O. 1994.** Mirids (Heteroptera: Miridae) of interest to integrated control management on tomato crops. Guía para su identificación. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 20, 131-143.
- Greenstone, M.H., Trowell, S.C. 1994.** Arthropod predation: a simplified immunodot format for predator gut analysis *Annals of Entomological Society of America* 87, 214-217.
- Groot A.T., van der Wal A.J., Schuurman, A., Visser J.H., Blommers L.H.M., van Beek T.A. 1998.** Copulation behavior of *Lygocoris pabulinus* under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88, 219–228.
- Groot, A.T., Smid, H.M. 2000.** Polyandry in the mirid bug *Lygocoris pabulinus* (L.) effects on sexual communication and fecundity. *Invertebrated Reproduction and Development* 38, 143-155.
- Hagler, J.R., Cohen, A.C., Enriquez, F.J., Bradley-Dunlop, D. 1991.** An egg-specific monoclonal antibody to *Lygus hesperus*. *Biological Control* 1, 75-80.

- Hansen, D.L., Brødsgaard, H.F., Enkegaard, A. 1999.** Life table characteristics of *Macrolophus caliginosus* preying upon *Tetranychus urticae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93(3), 267-273.
- Happ, G.M. 1992.** Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology* 37, 303-320.
- Harcourt, A.H., Harvey, P.H., Larson, S.G., Short, R.V. 1981.** Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293, 55–57.
- Harmer, A.M.T., Radhakrishnan, P., Taylor, P.W. 2006.** Remating inhibition in female Queensland fruit flies: Effects and correlates of sperm storage. *Journal of Insect Physiology* 52, 179-186.
- Hart, A.J., Bale, J.S., Tullett, A.G., Bale, J.S., Walters, K.F.A. 2002.** Effects of temperature on the establishment potential in the U.K. of the non-native glasshouse biocontrol agent *Macrolophus caliginosus*. *Physiological Entomology* 27 (2), 112-123.
- Hinton, H.E. 1962.** The structure of the shell and respiratory system of the eggs of *Halopeltis* and related genera (Hemiptera, Miridae). *Proceeding of the Zoological Society of London* 139, 483–488.
- Holman, L. 2009.** Sperm viability staining in ecology and evolution: potential pitfalls. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 1679-1688.
- Hosken, D.J. 1997.** Sperm competition in bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264, 385–392.
- Hosken, D.J., Ward, P.I. 2000.** Copula in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): investigating sperm competition models by histological observation. *Journal of Insect Physiology* 46, 1355-1363.

- Hosken, D.J., Ward, P.I. 2001.** Experimental evidence for testis size evolution via sperm competition. *Ecology Letters* 4, 10-13.
- Hosken, D.J., Stockley, P., Tregenza, T., Wedell, N. 2009.** Monogamy and the battle of the sexes. *Annual Review of Entomology* 54, 361-378.
- Hughes, L.B., Chang, B., Wagner, D., Pierce, N.E. 2000.** Effects of mating history on ejaculate size, fecundity, longevity and copulation duration in the ant-tended lycaenid butterfly, *Jalmenus evagoras*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47, 119-128.
- Hunter, F.M., Birkhead, T.R. 2002.** Sperm viability and first or second male depending upon eye color. A total of 21,452 sperm competition in insects. *Current Biology* 12, 121–123.
- Jacas, J.A., Urbaneja, A., Viñuela, E. 2006.** History and future of introduction of exotic arthropod biological control agents in Spain: a dilemma? *BioControl* 51, 1-30.
- Jacas, J.A., Urbaneja, A., Garcia-Marí, F. 2008.** Artrópodos depredadores, in: Jacas, J.A., Urbaneja, A. (Eds), *Control biológico de plagas hortícolas*. Phytoma España, pp. 39-56.
- Kullenberg, B. 1947.** Über Morphologie und Funktion des Kopulationsapparats der Capsiden und Nabiden. *Zool. Bidr. Upps* 24, 217-418.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M. 2000.** Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45, 175–201.

- Letourneau, D.K. 1998.** Conservation biology: lessons for conserving natural enemies pp 9-38. In: Barbosa, P. Conservation Biological Control. Academic Press U.S.A.
- Lynch, L., Thomas, M.B. 2000.** Nontarget effects in the biocontrol of insects with insects, nematodes and microbial agents: the evidence. *Biocontrol News and Information* 21, 117-130.
- Ma, W.K., Ramaswamy, S.B. 1987.** Histological changes during ovarian maturation in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae). *Journal of Insect Morphology and Embryology* 16, 309-322.
- M.A.P.A. (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). 2008.** Produccion Integrada. [Document online]. Disponible a internet a: <<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/ProduccionIntegrada/Int.htm>>. (15/01/08).
- Malo, S. 2009.** Control biologic de *Bemisia tabaci* (Hem.: Aleyrodidae): *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae), *Macrolophus pygmaeus* (Hem.: Miridae) i la seva interacció. Tesis doctoral. Universitat de Lleida. 188p.
- Martinez-Cascales, J.I., Cenis, J.L., Cassis, G., Sanchez, J.A. 2006.** Species identity of *Macrolophus melanotoma* (Costa 1853) and *Macrolophus pygmaeus* (Rambur 1839) (Insecta: Heteroptera: Miridae) based on morphological and molecular data and bionomic implications. *Insect Systematics and Evolution* 37, 385-404.
- McLain, D.K. 1980.** Female choice and the adaptive significance of prolonged copulation in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Psyche* 87, 325–336.
- Moller, A.P. 1988.** Testis size, ejaculate quality and sperm competition in birds. *Biological Journal of the Linnean Society* 33, 273-283.

- Moller, A.P. 1989.** Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals. *Functional Ecology* 3, 91-96.
- Montserrat, M., Albajes, R., Castañé, C. 2000.** Functional response of four Heteroptera predators preying on greenhouse whitefly and western flower thrips. *Environ. Entomol.* 29(5), 1075-1082.
- Nation, J.L. 2002.** Insect physiology and biochemistry. CRC press, Boca Raton, USA. pp 485.
- Oliveira, P.L., Kawooya, J.K., Ribeiro, J.M.C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E.W., Walker, F.A., Machado, E.A., Nussenzweig, R.H., Padovan, G.J., Masuda, H. 1995.** A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 10897-10901.
- Parker, G. 1970.** Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45, 525–567.
- Perdikis, D.C., Lykouressis, D.P. 2002.** Life table and biological characteristics of *Macrolophus pygmaeus* when feeding on *Myzus persicae* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102, 261-272.
- Perdikis, D. C., Margaritopoulos, J. T., Stamatis, C., Mamuris, Z., Lykouressis, D. P. Tsitsipis, J. A., Pekas, A. 2003.** Discrimination of the closely related biocontrol agents *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae) and *M. pygmaeus* using mitochondrial DNA analysis. *Bulletin of Entomological Research* 93, 507-514.
- Perdikis, D.C., Favas, C., Lykouressis, D.P., Fantinou, A. 2007.** Ecological relationships between non-cultivated plants and insect predators in agroecosystems: the case of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) and *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae). *Acta Oecologica* 31, 299-306.

- Powell, C.A. 1987.** Preparation of monoclonal antibody specific for double-stranded RNAs. *Phytopathology* 77, 1743 (abstr).
- Pratt, G.E., Davey, K.G. 1972.** The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal) I. The effect of allatectomy. *Journal of Experimental Biology* 56, 201-214.
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S. 1992.** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology* 37, 217-251.
- Richards, P.C., Schmidt, J.M. 1996.** The suitability of some natural and artificial substrates as oviposition sites for the insidious flower bug, *Orius insidiosus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 325–333.
- Ridley, M. 1988.** Mating frequency and fecundity in insects. *Biological Reviews* 63, 509-549.
- Riudavets, J., Castañé, C. 1998.** Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in the Mediterranean. *Environmental Entomology* 27(1), 86-93.
- Robledo, A., van der Blom, J., Sanchez, J.A., Torres, S. 2009.** Control Biológico en Invernaderos Horícolas. Coexphal, FAECA. 176p.
- Sanchez, J.A., García, F., Lacasa, A., Gutiérrez, L., Oncina, M., Contreras, J., Gómez, J. 1997.** Response of the Anthocorids *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* and the phytoseid *Amblyseius cucumeris* for the control of *Frankliniella occidentalis* in commercial crops of sweet pepper in Murcia (Spain). *IOBC/WPRS Bulletin* 20, 177-185.
- Sanchez, J.A., Lacasa, A. 2006.** A biological pest control story. *IOBC/WPRS Bulletin* 29(4), 17-22.

- Sanchez, J.A. 2008.** Factors influencing zoophytophagy in the plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae). *Agricultural and Forest Entomology* 10(2), 75–80.
- Sanchez, J.A., Lacasa, A. 2008.** Impact of the zoophytophagous plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) on tomato yield. *Journal of Economic Entomology* 101(6), 1864-1870.
- Sanchez, J.A., Lacasa, A., Arnó, J., Castañé, C., Alomar, O. 2009.** Life history parameters for *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Heteroptera: Miridae) under different temperature regimes. *Journal of Applied Entomology* 133, 125–132.
- SAS Institute 1999–2001.** The SAS System for Windows 8.02. SAS Institute, Cary, NC.
- Shapiro, J.P., Ferkovich, S.M. 2002.** Yolk Protein Immunoassays (YP-ELISA) to assess diet and reproductive quality of mass-reared *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Journal of Economic Entomology* 95, 927-935.
- Shapiro, J.P., Wasserman, H.A., Greany, P.D., Nation, J.L. 2000.** Vitellin and vitellogenin in the soldier bug, *Podisus maculiventris*: identification with monoclonal antibodies and reproductive response to diet. *Archives of Insect Biochemistry Physiology* 44, 130–135.
- Simmons, L.W. 2001a.** Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Simmons, L.W. 2001b.** The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and good-sperm hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*. 14, 585-594.
- Simmons, L.W., García-González, F. 2008.** Evolutionary reduction in testes size and competitive fertilization success in response to the experimental removal of sexual selection in dung beetles. *Evolution* 62, 2580-2591.

- South, S.H., Arnqvist, G. 2008.** Evidence of monandry in a mosquito (*Sabethes cyaneus*) with elaborate ornaments in both sexes. *Journal of Insect Physiology* 21, 451-459.
- Strong, F.E., Sheldahl, J.A., Hugher, P.R. Hussein, E.M.K. 1970.** Reproductive biology of *Lygus hesperus* Knight. *Hilgardia* 40, 105–147.
- Sutula, C.L., Gillet, J.M., Morrissey, S.M., Ramsdell, D.C. 1986.** Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70, 722-726.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A., Masaki, S. 1986.** Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press. N.Y.
- Thornhill, R., Alcock, J. 1983.** The Evolution of Insect Mating Systems. Harvard University Press, MA, USA.
- Tommasini, M.G., van Lenteren, J.C. 2003.** Occurrence of diapause on *Orius laevigatus*. *Bulletin of Insectology* 56, 225–251.
- Torreno, H.S., Magallona, E.D. 1994.** Biological relationship of the bug, *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) with tobacco. *The Philippine Entomologist* 9, 406-425.
- Urbaneja, A., Ripollés, J. L., Abad, R., Calvo, J., Vanaclocha, P., Tortosa, D., Jacas, J. A., Castañera, P. 2005a.** Importancia de los artrópodos depredadores de insectos y ácaros en España. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 31, 209-223.
- Urbaneja, A., Tapia, G., Stansly, P. 2005b.** Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het: Miridae). *Biocontrol Science and Technology* 15(5), 513-518.
- van der Blom, J. 2008.** Pimiento bajo abrigo. En: Jacas, J.A., Urbaneja, A. Control biológico de plagas agrícolas. *Phytoma* (Eds). España. Pp 399-409.

- van der Blom, J., Robledo, A., Torres, S., Sanchez, J.A. 2009.** Consequences of the wide scale implementation of biological control in greenhouses horticulture in Almería, Spain. IOBC/WPRS Bulletin 49, 9-13.
- van Driesche, R.G., Bellows, T.S. 1996.** Biological Control: Guide to Its Application. Ed Springer.
- van Lenteren, J.C. 1995.** Integrated pest management in protected crops. En: Dent, D. (eds.) Integrated Pest Management. Chapman and Hall, London. pp: 311-343.
- Vandekerkhove, B., Van Baal, E., Bolckmans, K., De Clercq, P. 2006.** Effect of diet and mating status on ovarian development and oviposition in the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus*. Biological Control 39, 532-538.
- Vila, E. 2004.** Refugis vegetals en la conservació de mírids depredadors. Tesi Doctoral. Universitat de Lleida. 217p
- Villavaso, E.J. 2007.** Morphological characteristics of mating in tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). Journal of Entomological Science 42(2), 185-192.
- Wheeler Jr, A.G., Miller, G.L., Henry, T.J. 1949.** Biology and habits of *Macrolophus tenuicornis* (Hemiptera: Miridae) on Hayscentedfern (Pteridophyta: Polypodiaceae). Melsheimer Entomological Series 27, 11-17.
- Wheeler Jr, A.G. 2001.** Biology of the Plant Bugs (Hemiptera: Miridae): Pests, Predators, Opportunists. Cornell University Press, Ithaca, New York, 507p.
- Zalom, F.G., Goodell, P.B., Wilson, L.T., Barnett, W.W., Bentley, W.J. 1983.** Degree days the calculation and use of heat units in pest management. University of California. Division of Agriculture and natural Resources. Leaflet 21373.