

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**OCURRENCIA ESTACIONAL Y DISPERSIÓN DE *Piezodorus  
guildinii* (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EN  
URUGUAY**

**por**

**Lucía MIGUEL GONZÁLEZ**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
*Magister* en Ciencias Agrarias opción  
Ciencias Vegetales

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
mayo 2017**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dra. Lic. Cs. Biol. Patricia González, Ing. Agr. Beatriz Scatoni y M.Sc. Lic. Bq. Leticia Bao, el 10 de mayo de 2017.  
Autora: Lic. Cs. Biol. Lucía Miguel González. Director Ph.D. Ing. Agr. Antônio R. Panizzi, Co-directora Dra. Ing. Agr. Stella Zerbino.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por permitirme realizar los ensayos de campo en su estación de La Estanzuela y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por haberme apoyado durante la realización de esta Tesis.

Mi orientador Ph.D. Ing. Agr. Antônio Panizzi por su apoyo e incentivación en la realización del trabajo. A mi orientadora por segunda vez Dra. Ing. Agr. Stella Zerbino por sus invaluable consejos, su exigencia en la realización del trabajo y en especial por compartir sus conocimientos conmigo

Las integrantes del tribunal Dra. Lic. Cs. Biol. Patricia González-Vainer, MSc. Bioq. Leticia Bao y Ing. Agr. Beatriz Scatoni por sus aportes y sugerencias para mejorar este trabajo.

Ing. Agr. Elisabeth Cárrega y Patricia Rabella por disposición a colaborar en todo lo referente a cursos y trámites administrativos y la Ph.D. Ing. Agr. Isabel Sans por su dedicación en la corrección del formato de la tesis.

Lic. Bibl. Graciela Vila y Alejandra Díaz de la biblioteca de INIA – La Estanzuela por su amabilidad y auxilio en la búsqueda bibliográfica.

Mis compañeros Eduardo García y Mabel Pessio por su invaluable ayuda en los trabajos de campo y a Lic. MSc. Marina Picón por su ayuda y consejos en los trabajos de laboratorio. Sin ellos esta tesis no hubiera sido posible.

Mis compañeros y amigos, en especial a Noelia Casco y Ruth Scholz por su permanente apoyo, ánimo y mates, el camino hubiera sido más difícil sin ellos. Al equipo de Entomología y Fitopatología de INIA y a mis compañeros de MGAP por su aliento durante la realización de los ensayos y la redacción del manuscrito.

A mi familia por su permanente apoyo y en especial a Juan por su amor y su paciencia infinita.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1. HIPÓTESIS.....	3
1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	3
1.3. <i>Piezodorus guildinii</i> (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ..	4
1.3.1. <u>Distribución geográfica</u> .....	4
1.3.2. <u>Hospederos</u> .....	5
1.3.3. <u>Aspectos bioecológicos</u> .....	6
1.3.4. <u>Daños e importancia económica</u> .....	9
1.4. DISPERSIÓN.....	12
1.4.1. <u>Métodos de marcación de insectos</u> .....	13
2. <u>OCURRENCIA ESTACIONAL DE <i>Piezodorus guildinii</i> (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EN EL NOROESTE DE URUGUAY</u> .....	16
2.1. RESUMEN.....	16
2.2. ABSTRACT.....	17
2.3. INTRODUCCIÓN.....	18
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.4.1. <u>Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación</u> .....	20
2.4.2. <u>Formas estacionales</u> .....	21

2.4.3. <u>Análisis de datos</u> .....	24
2.5. RESULTADOS .....	25
2.5.1. <u>Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y hábitat</u> .....	25
2.5.2. <u>Formas estacionales</u> .....	29
2.5.2.1. Morfología: tamaño y coloración del cuerpo.....	29
2.5.2.2. Contenido de lípidos.....	34
2.5.2.3. Desarrollo de los órganos del aparato reproductor.....	35
2.6. DISCUSIÓN.....	37
2.6.1. <u>Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación</u> .....	37
2.6.2. <u>Formas estacionales</u> .....	41
2.7. CONCLUSIONES.....	42
2.8. BIBLIOGRAFÍA.....	43
3. <u>DISPERSIÓN DE <i>Piezodorus guildinii</i> (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ENTRE CULTIVOS DE SOJA [<i>Glycine max</i> (L.) Merrill] Y DE ALFALFA (<i>Medicago sativa</i> L.)</u> .....	49
3.1. RESUMEN.....	49
3.2. ABSTRACT .....	50
3.3. INTRODUCCIÓN.....	51
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	53
3.4.1. <u>Área experimental</u> .....	53
3.4.2. <u>Aplicación de proteínas</u> .....	53
3.4.3. <u>Colecta de insectos</u> .....	54
3.4.4. <u>ELISA</u> .....	55

3.4.5. <u>Análisis de datos</u> .....	56
3.5. RESULTADOS .....	58
3.5.1. <u>Eficiencia de mercado</u> .....	58
3.5.2. <u>Movimiento entre cultivos</u> .....	59
3.5.3. <u>Distancia</u> .....	61
3.6. DISCUSIÓN.....	62
3.7. CONCLUSIONES.....	64
3.8. BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS.....	70
4. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</u> .....	71
4.1. CONCLUSIONES.....	75
5. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u> .....	77
6. <u>ANEXOS</u> .....	91

## RESUMEN

*Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) es el hemíptero fitófago con mayor importancia económica para la soja en Uruguay, porque es la especie más abundante y la que causa los mayores daños. Las ninfas y los adultos se alimentan de las estructuras de fructificación, por lo que cuando el cultivo alcanza el estado de madurez fisiológica, usualmente se dispersan hacia plantas huéspedes alternativas u ocupan sitios de hibernación. Con el fin de desarrollar nuevas estrategias para manejar esta especie a nivel del paisaje, el conocimiento del movimiento entre cultivos es esencial. Los propósitos del trabajo fueron: ampliar el conocimiento sobre las plantas y sitios de hibernación que habita *P. guildinii*, conocer la ocurrencia estacional en el Noroeste y estudiar el movimiento entre dos cultivos adyacentes de alfalfa y soja. La presencia de *P. guildinii* se registró en 15 especies vegetales y cuatro sitios de hibernación, se reportan siete nuevas especies vegetales. En alfalfa los adultos se registraron durante todo el año, mientras que las ninfas entre setiembre y mayo. Entre mayo y agosto un alto porcentaje de los adultos tienen características morfológicas y fisiológicas que indican que se encuentran en estado de diapausa reproductiva. A través de la técnica de inmunomarcación aplicada, se logró marcar chinches silvestres en cultivos de soja y alfalfa y determinar el movimiento de los adultos de *P. guildinii* entre ambos cultivos, el cual tuvo patrones bidireccionales y unidireccionales. El movimiento predominante fue desde la soja hacia la alfalfa, el cual se registró entre los estados fenológicos R3 (inicio de formación de vainas) y hasta R6. Desde alfalfa a la soja sólo se registró el movimiento de adultos en el estado R6. La distancia de dispersión varió de 2,5 a 47,5 m, con un promedio de 17,4 m. Los datos indican que en nuestro país la alfalfa es la planta huésped alternativa preferida, por lo que debería ser el cultivo en el que se deben concentrar los esfuerzos para desarrollar tácticas de manejo antes de que el insecto colonice la soja.

Palabras claves: Ocurrencia estacional, plantas huéspedes y asociadas, formas estacionales, inmunomarcado, dispersión.

## SUMMARY

### SEASONAL OCCURRENCE AND DISPERSION OF *Piezodorus guildinii* (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) IN URUGUAY

*Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) is the most important phytophagous hemipteran pest of soybean in Uruguay; it is the most abundant species of stink bug and causes the greatest damage to the crop. Nymphs and adults feed on the fruiting structures, and when the crop reaches the physiological maturity, they disperse to alternate host plants or to overwintering sites. In order to develop new strategies to manage *P. guildinii* at the landscape level, knowledge of its movement between crops is essential. The purposes of this study were, to advance the knowledge about host plants and overwintering sites utilized by *P. guildinii*, to unveil its seasonal occurrence in the Northwest region of Uruguay and to verify its movement between two adjacent alfalfa and soybean fields. Results indicated the presence of *P. guildinii* on 15 plant species, of which seven are considered new records, and in four overwintering sites. In alfalfa adults were recorded throughout the year, while nymphs were observed between September and May. From May to August a high percentage of adults have morphological and physiological traits that indicate they are in reproductive diapause. Through the applied immunomarking technique, wild *P. guildinii* adults were marked and released in soybean and alfalfa plantations to verify their movements between both crops. Movements showed bidirectional and unidirectional patterns. The predominant movement was from soybean to alfalfa, which was recorded between R3 (beginning of pod formation) and up to R6 (fully developed seed) phenological plant stages. From alfalfa to soybean, adult's movements were recorded in the stage R6. Dispersal distance ranged from 2.5 to 47.5 m, with an average of 17.4 m. These data demonstrated that in Uruguay, alfalfa is the preferred alternate host plant. Therefore, efforts should be concentrated on this crop to develop management tactics before *P. guildinii* moves to soybean crops.

*Keywords:* seasonal occurrence, host and associated plants, seasonal forms, immunomarking, dispersion.



## 1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay en los últimos años se registró un incremento considerable en el área destinada a los cultivos de secano como consecuencia de la expansión del cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], que en 2015-2016 ocupó un área aproximada de 1.150.000 ha (MGAP, 2016). Este cultivo es originario de regiones templadas a frías donde los problemas de insectos son casi inexistentes, a medida que el mismo se desarrolla en latitudes menores los problemas de plagas adquieren más importancia. En nuestro país, se agrega la coexistencia con áreas con leguminosas forrajeras, con las que comparten la mayoría de los insectos plaga.

Los hemípteros fitófagos (Hemiptera: Pentatomidae) constituyen uno de los grupos de insectos con mayor potencial de causar importantes pérdidas económicas en el cultivo de soja (Panizzi *et al.* 2000b, Panizzi 1997). Estos insectos tienen aparato bucal pico suctor y en general se alimentan de vainas y granos. Como consecuencia de la alimentación, pueden causar pérdidas significativas en el rendimiento, calidad y potencial germinativo de la soja, además de causar daños por la transmisión de microorganismos patógenos (Panizzi y Silva 2009, Medrano *et al.* 2007, Panizzi 2007, 2000, Belorte *et al.* 2003, Boethel *et al.* 2000, Russin *et al.* 1988). Las principales especies que colonizan el cultivo son *Dichelops furcatus* (Fabricius), *Edessa meditabunda* (Fabricius), *Nezara viridula* (Linnaeus) y *Piezodorus guildinii* (Westwood). Esta última es la de mayor importancia económica, porque es la más abundante y la que causa los mayores daños (Depieri y Panizzi 2011, Zerbino 2010, 2009, 2007).

Estos insectos tienen algunas características que dificultan su manejo. Causan daños económicos aún en bajas densidades. La inmigración de adultos desde otros cultivos puede producir un incremento rápido de la densidad poblacional, y en consecuencia, la necesidad de aplicaciones de insecticidas para su control (Panizzi 2013, Gazzoni 2012, Corso y Gazzoni 1998). A estas características se suma su tolerancia a los principios activos que son comúnmente utilizados, por lo que se requiere el uso de dosis altas para su control (Corso y Gazzoni, 1998).

Las ninfas mayores y los adultos de los pentatómidos, tienen capacidad de explorar, dentro y entre generaciones, diversas especies de plantas que son colonizadas en diferentes momentos. En general ocupan apenas 1/3 de sus vidas en el cultivo de soja, cuando ésta madura se desplazan hacia otras plantas silvestres/cultivadas y/o hacia sitios de hibernación (Panizzi y Parra, 2012). Como consecuencia de la distribución geográfica de las especies vegetales, las poblaciones locales tienen hábitos de alimentación específicos, razón por la cual información validada para determinada localidad puede no ser extrapolada para otra. Por ello es necesario realizar estudios locales que tengan el propósito de conocer las plantas que son colonizadas por las diferentes generaciones (Smaniotto y Panizzi, 2015).

Las tácticas de manejo dirigidas únicamente a un sólo cultivo tienen poco efecto en la población general del insecto. Para poder desarrollar un programa holístico que considere estrategias eficientes y ecológicamente compatibles, es imprescindible conocer la estacionalidad de un insecto y establecer cómo los factores bióticos y abióticos están involucrados en la misma (Panizzi y Parra 2009, Panizzi 1997, Giese *et al.* 1975). Con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias que permitan realizar un manejo de este insecto a nivel de predio o paisaje, es necesario determinar la secuencia de plantas que utilizan las distintas generaciones y la dispersión local entre los cultivos (Zerbino 2014, Huang 2012, Panizzi 1997). Estos estudios permiten diseñar tácticas que consideren el uso de la biodiversidad vegetal con el propósito de reducir o impedir la colonización del insecto al cultivo.

El conocimiento sobre la ecología de *P. guildinii* a nivel internacional (Antônio Panizzi, comunicación personal, 27/09/2010) y nacional es restringido (Ribeiro *et al.* 2009). Recientemente, Zerbino *et al.* (2016, 2015, 2014, 2013) realizaron estudios que permitieron: conocer la estacionalidad de este insecto, establecer la secuencia de plantas que utilizan las distintas generaciones y el momento en que los adultos se dispersan desde y hacia las plantas cultivadas en el suroeste del país. Asimismo determinaron la estrategia que utilizan para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables. Esta información para la región Noroeste es escasa, por lo cual en esta tesis se plantea realizar estudios que aporten información sobre los hábitats que

utiliza *P. guildinii* en ausencia del hospedero preferido y cuando los factores abióticos son desfavorables, y los momentos en que ocurren los movimientos entre los diferentes hábitats en dicha región. También se evaluará la distancia de vuelo asociada con el paisaje agrícola, la que aún es desconocida.

### 1.1. HIPÓTESIS

*Piezodorus guildinii* enfrenta las condiciones adversas del ambiente en estado de diapausa, colonizando distintas especies vegetales y sitios de hibernación.

*Piezodorus guildinii* tiene la capacidad de explorar diferentes especies de plantas dentro y entre generaciones, las cuales pueden ser colonizadas en secuencia.

### 1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Los objetivos generales de este trabajo fueron: conocer la ocurrencia estacional de la “chinche de las leguminosas” *Piezodorus guildinii* (Westwood) en el Noroeste de Uruguay y estudiar la dispersión entre cultivos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] y alfalfa (*Medicago sativa* L.) con el propósito de desarrollar estrategias de manejo.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Conocer las especies vegetales y sitios de hibernación que habita de *P. guildinii* durante el período en que el cultivo de soja está ausente.
- 2) Determinar el período en el cual la especie habita las leguminosas cultivadas en el Noroeste de Uruguay.
- 3) Evaluar los cambios morfológicos y fisiológicos de los adultos en los distintos meses del año.
- 4) Determinar si las proteínas constituyen un método de marcado eficiente.
- 5) Cuantificar la dispersión local de *P. guildinii* en el tiempo y el espacio en el paisaje agrícola soja –alfalfa.

### 1.3. *Piezodorus guildinii* (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

#### 1.3.1. Distribución geográfica

*Piezodorus guildinii*, conocida vulgarmente como chinche verde pequeña, chinche de las leguminosas y/o chinche de la alfalfa, es un pentatómido Neotropical que se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el Sur de América del Sur (Panizzi y Slansky, 1985b). Fue descrita por primera vez en la isla de São Vicente (América Central) (Panizzi *et al.*, 2012). En Uruguay, su presencia en el cultivo de soja se observó por primera vez en 1969, sin embargo, recién en 1981 comenzó a ser considerada plaga (Bourokhovitch y Morey, 1981).

En Brasil fue un insecto poco abundante hasta principios de la década de los 70, desde mediados de la década de los 80 es mencionada como especie de importancia económica en soja. Actualmente se distribuye desde Piauí hasta Rio Grande do Sul (Corrêa- Ferreira 2005, Corrêa- Ferreira y Azevedo 2002, Panizzi *et al.* 2000a, Panizzi y Corrêa- Ferreira 1997, Panizzi y Slansky 1985b, Panizzi y Smith 1977).

En Argentina, en 1969 por primera vez se reporta como una especie que causa daño en alfalfa. En ese momento el insecto fue observado en varias provincias del país, con registros poblacionales bajos y poco frecuentes en la Provincia de Buenos Aires (Fraga y Ochoa, 1972). En cultivos de soja su presencia se constata en las Provincias de Corrientes y Misiones en 1970 y en la década de los 80 en la región pampeana (Baigorri y Giorda, 1997), aunque recién comenzó a ser la especie predominante en los años 2001-2002 (Gamundi y Sosa 2008, Saluso *et al.* 2007, Sosa y Gamundi 2007, Massoni y Frana 2007, Serra y La Porta 2001).

En el sur de Estados Unidos, su presencia se registra desde 1900, pero fue una especie sin importancia económica. Recientemente comenzó a ocasionar daños de magnitud en soja, en los estados de Florida, Georgia, Missouri, Texas y los estados del Centro-Sur como Mississippi, Arkansas y Louisiana (Kamminga *et al.* 2012, Tindall y Fothergill 2011).

En nuestro país este insecto es considerado una de las plagas primarias de los sistemas de producción agrícola-ganaderos. Es el pentatómido fitófago más

abundante del cultivo de soja (Zerbino *et al.* 2016, Zerbino 2010, 2009, 2007, Ribeiro y Castiglioni 2009, Ribeiro *et al.* 2009, Castiglioni 2004, Ribeiro 2004, Zerbino y Alzugaray 2003) y de los semilleros de las leguminosas forrajeras (*Medicago sativa* L., *Lotus corniculatus* L., *Trifolium pratense* L. y *Trifolium repens* L.) (Zerbino *et al.* 2014, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro 2007, 2004, Castiglioni 2004). Dada su importancia económica fueron realizados diversos estudios relacionados a la duración de su ciclo de vida, plantas huéspedes alternativas, aplicaciones de distintas tácticas de manejo (barreras vivas, uso de NaCl como deterrente), estudio de las comunidades de enemigos naturales que la controlan, y de la abundancia de la especie en soja y leguminosas forrajeras (Zerbino *et al.* 2016, 2015, 2014, 2013, Zerbino 2014, 2010, 2009, 2007, Ribeiro y Castiglioni 2009, Ribeiro *et al.* 2009, Castiglioni 2004, Ribeiro 2004, Zerbino y Alzugaray 2003).

### 1.3.2. Hospederos

A nivel internacional, la presencia de *Piezodorus guildinii* está reportada en 66 especies vegetales pertenecientes a 25 familias (Smaniotto y Panizzi 2015, Batistella y Dal'Col 2014, Zerbino 2014, Chiaradia 2010, Garlet *et al.* 2010, Souza-Bunde *et al.* 2010, Panizzi 1985, Panizzi y Slansky 1985a, 1985c, Fraga y Ochoa 1972), aunque sólo se desarrolla en leguminosas silvestres y cultivadas (Zerbino *et al.* 2016, Zerbino 2014, Panizzi *et al.* 2000a, Panizzi 1997). Smaniotto y Panizzi (2015) y Panizzi (2000) distinguen dos grandes grupos de especies vegetales, las plantas huésped en la que el insecto se alimenta, desarrolla y reproduce, y las plantas asociadas que son las que le proporcionan refugio, agua y/o alimento, pero no se reproducen.

En Brasil completa el ciclo en leguminosas del género *Indigofera* (*I. endecaphylla* Jacq., *I. hirsuta* L., *I. suffruticosa* Mill. e *I. truxillensis* Kunth), *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Crotalaria lanceolata* E. Mey., *Lens culinaris* Medik., *Lotononis bainesii* Baker, *Lotus corniculatus* L., *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus* L., *Medicago polymorpha* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., *Sesbania aculeata* Pers., *T. repens* y *Vicia* sp. (Smaniotto y

Panizzi 2015, Panizzi 1985). Por su parte, en Argentina se reportó que se desarrolla cuando se alimenta de *M. sativa*, *T. pratense*, *T. repens* y *Vicia sativa* L. (Smaniotto y Panizzi 2015, Massoni y Frana 2005, Fraga y Ochoa 1972).

En Uruguay *P. guildinii* coloniza diversas especies de leguminosas cultivadas (*G. max*, *P. vulgaris*) y leguminosas forrajeras (*M. sativa*, *L. corniculatus*, *T. pratense* y *T. repens*) (Zerbino *et al.* 2014, Castiglioni *et al.* 2010, Ribeiro y Castiglioni 2009, Ribeiro *et al.* 2009). La presencia de este insecto también fue registrada en otras especies cultivadas como *Gossypium hirsutum* L., *Helianthus annuus* L., *Sorghum bicolor* (L.) Moench y *Zea mays* L., y silvestres como: *Acacia melanoxylon* R. Br., *Catalpa bignonioides* Walter, *Cotoneaster lacteus* W. W. Sm., *Eugenia uniflora* L., *Grevillea robusta* A. Cunn, *Ligustrum lucidum* Aiton, *Lolium multiflorum* Lam., *Myrcianthes pungens* (Berg) Legrand, *Phyllostachys* sp., *Pittosporum undulatum* Ventenat, *Psidium* sp. (Zerbino 2014, Ribeiro 2007, Zerbino y Alzugaray 2003, Alzugaray y Ribeiro 2000). Asimismo, en determinados períodos este insecto también puede ser observado debajo de la corteza y de la hojarasca de *Eucalyptus* sp., en rastrojos de soja y sorgo y en la gramilla (*Cynodon dactylon* L.) localizada en el borde de los cultivos de soja (Zerbino *et al.* 2015, Zerbino 2014).

### 1.3.3. Aspectos bioecológicos

Los adultos son de color verde y alcanzan a medir 10 mm. Se les reconoce porque tienen una banda transversal en el pronoto, generalmente de color rojizo que en los machos es más clara. Los huevos son de color negro, tienen forma de barril y son depositados en hileras dobles. El número de huevos por postura puede variar entre 3 y hasta 37, dependiendo del alimento y de las condiciones de fotoperiodo y temperatura, aunque generalmente varían entre 15 y 20 huevos/ postura (Zerbino *et al.* 2016, 2013, Panizzi *et al.* 2000b, Panizzi y Smith 1977). Preferentemente son depositados en las vainas de soja, aunque ocasionalmente pueden ser observados en ambas caras de las hojas o en los tallos.

Las ninfas pasan por cinco estadios. Las recién eclosionadas son muy pequeñas (1 mm), no se alimentan y tienen comportamiento gregario, permaneciendo próximas a la postura, probablemente como defensa física y química (Villas Bôas *et al.*, 1985). Las ninfas entre el segundo y quinto estadio tienen un largo de cuerpo de 2,3; 2,6; 4,6 y 7,8 mm, respectivamente (Grazia *et al.*, 1980). Inicialmente, son de color rojo y negro, y cuando avanzan en el ciclo de desarrollo tienen coloración verdosa con manchas rojas y negras en el abdomen (Panizzi 2007, Fraga y Ochoa 1972). A partir del segundo estadio se dispersan y comienzan a ingerir alimento (Villas Bôas *et al.*, 1985). El tiempo dedicado a la actividad alimentaria aumenta en el estado de ninfa desde 7,3 % entre el segundo y cuarto estadio, a 16,9 % en el quinto estadio, y alcanza un valor de 34,7 % en el estado adulto (Kuss-Roggia, 2009).

El fotoperíodo y la temperatura son factores abióticos que tienen importantes efectos en el ciclo de vida de *P. guildinii* (Zerbino *et al.* 2016, 2015, 2014, 2013, Zerbino 2014, Panizzi y Silva 2009, Panizzi 2007, 1997, 1992, 1987, Panizzi *et al.* 2002, 2000a, Serra y La Porta 2001, Panizzi 1985, Panizzi y Slansky 1985a). En el estado de ninfa el descenso de la temperatura en condiciones de fotofase corta (10 h) tiene un efecto mayor que el acortamiento de la fotofase a 25° C (Zerbino, 2014). La duración del estado de ninfa de *P. guildinii* en condiciones de 14 h de luz y 25° C es de 21,2 días y con 10 h a 20° C es de 41,9 días (Zerbino *et al.*, 2013). Zerbino *et al.* (2013) observaron que la duración de la fotofase, sólo afectó la duración del 4° y 5° estadio ninfal. En el caso de los adultos estos factores tienen efectos en la longevidad, y en el desempeño reproductivo de las hembras (Zerbino, 2014). Los adultos son más longevos a medida que la temperatura disminuye. Los machos viven  $94,1 \pm 11,9$  días y las hembras  $107,4 \pm 12,9$  días cuando se desarrollan con 10 horas de luz y 20° C (Zerbino *et al.*, 2013). La longevidad de ambos sexos disminuye a 65 días cuando las condiciones de desarrollo son 10 horas de luz y 25° C (Zerbino *et al.* 2013, Serra y Laporta 2001). En condiciones de fotofase corta y temperaturas bajas, la performance reproductiva se reduce significativamente. Las hembras tienen un período de preoviposición de 50 días y sólo ovipositan en el 24,2 % de los casos (Zerbino *et al.*, 2013).

A pesar de que se alimenta exclusivamente de leguminosas, existen importantes variaciones en el tiempo de desarrollo y la mortalidad de las ninfas, así como en la longevidad, supervivencia y desempeño reproductivo de los adultos según la especie vegetal de la que se alimenta, aún dentro de un mismo género (Zerbino *et al.* 2016, Zerbino 2014, Panizzi y Silva 2009, Panizzi 2007, 1997, 1992, 1987, Panizzi *et al.* 2002, 2000a, Panizzi 1985, Panizzi y Slansky 1985a, Panizzi y Smith 1977). En estudios realizados en Brasil, se determinó que el estado de ninfa tiene una duración menor cuando se alimentan de *C. lanceolata* (18,4 días) que si lo hacen de *G. max* (21 días), *I. endecaphylla*, *I. truxillensis*, *S. aculeata* (22 días), *I. hirsuta* (25 días) e *I. suffruticosa* (29 días) (Panizzi *et al.* 2002, Panizzi 1992, 1987). Respecto a la mortalidad de las ninfas, cuando son alimentadas con en *I. suffruticosa* e *I. hirsuta* se registran valores mayores que si reciben *I. endecaphylla* y *I. truxillensis* como alimento (Panizzi, 1992). Zerbino *et al.* (2016) determinaron que la menor y mayor mortalidad de ninfas se registra con soja y trébol rojo como alimento, respectivamente.

La longevidad de los adultos varía cuando se alimentan con soja entre 50 y 90 días, con leguminosas forrajeras de 27,5 a 75,2 días y con algunas especies del género *Indigofera* desde 16 a 112 días (Zerbino *et al.* 2016, Zerbino 2014, Panizzi 1992, 1987, Panizzi y Smith 1977). Cuando el alimento recibido es chauchas verdes de poroto (*P. vulgaris*) o de soja (*G. max*), los machos viven más tiempo que las hembras; por el contrario, si el alimento es semillas maduras de soja, las hembras son más longevas que los machos. La longevidad de ambos sexos es similar cuando se alimentan con maní, (Panizzi y Slansky, 1985a). La supervivencia de adultos es mayor cuando el alimento consiste en vainas inmaduras de soja y alfalfa (*M. sativa*) a cuando consiste en vainas inmaduras de lotus (*L. corniculatus*) o flores de trébol rojo con semillas inmaduras (*T. pratense*) (Zerbino *et al.* 2016, Zerbino 2014).

El alimento también tiene efectos en la fecundidad de las hembras (Zerbino *et al.* 2016, Panizzi y Silva 2009, Panizzi 1997). Las hembras alimentadas con vainas inmaduras de alfalfa y soja son más fecundas que las que reciben vainas de lotus como alimento; mientras que cuando se alimentan con trébol rojo no oviponen



(Zerbino *et al.*, 2016). El número de posturas es aproximadamente tres cuando el alimento recibido es granos maduros de soja, diez si es vainas inmaduras de soja, y 37 cuando se alimentan con algunas especies del género *Indigofera* (Panizzi, 1992). De acuerdo al alimento recibido, también existen variaciones en el número total de huevos por hembra, mientras que en soja varía entre 28 y 148, con *C. lanceolata*, alfalfa, *I. hirsuta* e *I. truxillensis*, registran valores de 58, 134, 200 y 500, respectivamente (Zerbino *et al.* 2015, Panizzi 1992, Panizzi y Slansky 1985a).

#### 1.3.4. Daños e importancia económica

Los adultos y las ninfas, durante el proceso de alimentación, con los estiletes externos (mandíbulas) perforan y rompen los tejidos vegetales y a través del canal salival, formado por los estiletes internos (maxilas), inyectan saliva que contiene enzimas digestivas (Depieri y Panizzi 2011, Panizzi 2000, 1997). La saliva contiene fuertes agentes histolíticos que licúan las porciones sólidas o semisólidas de las células facilitando su ingestión. Los tejidos licuados por la saliva son ingeridos a través del canal alimentario (Panizzi y Silva 2009, Todd y Herzog 1980). Los daños a los tejidos vegetales resultan de la frecuencia de introducción de los estiletes y de la duración del período de alimentación, asociados a secreciones salivales que pueden ser tóxicas y causar necrosis (Panizzi, 2000). En particular *P. guildinii* se destaca por ser la especie que causa los mayores daños en la superficie y profundidad de los granos o semillas, esto es debido a que durante su alimentación los cuerpos de proteína son completamente destruidos, probablemente porque la acción histolítica de las enzimas salivares es mayor en esta especie en comparación a las otras que integran el complejo de pentatómidos de la soja (Depieri y Panizzi, 2011).

La alimentación de las chinches durante los primeros estadios de desarrollo del grano causa la detención del crecimiento, la caída de vainas, el aborto y la deformación de las semillas. Cuando se alimentan en R6, los granos son más pequeños que los normales y tienen deformaciones, con manchas blanquecinas o marrones (Corrêa-Ferreira y Azevedo, 2002). Como consecuencia de la alimentación, las chinches pueden causar pérdidas significativas en el rendimiento,

calidad y potencial germinativo de la soja e incluso alterar el proceso de maduración de las plantas (Panizzi 2007, 2000, Belorte *et al.* 2003). Además, provocan la modificación de la relación contenido de proteína/contenido de materia grasa. Los granos dañados incrementan ligeramente su contenido en proteína y disminuyen en forma proporcional el contenido en aceite. Asimismo, se observa un deterioro en la calidad del aceite proveniente de granos dañados por chinches, que incrementaron en forma relativa su contenido en ácidos linoleico, palmítico y esteárico y un decremento proporcional de ácido linolénico (Villas Bôas *et al.*, 1990). Corrêa-Ferreira y Azevedo (2002) concluyeron que plantas de soja infestadas con *P. guildinii* producen mayor cantidad de semillas de mala calidad, mayor cantidad de semillas no viables, menor cantidad de vainas y más vainas vacías por planta en comparación a plantas atacadas por *N. viridula* y *Euschistus heros* Fabricius.

Durante el proceso de alimentación pueden transmitir patógenos, éstos pueden ser infecciones oportunistas en la herida, o infecciones por microorganismos bacterianos y fúngicos transmitidos por las chinches (Panizzi y Silva 2009, Medrano *et al.* 2007, Boethel *et al.* 2000, Russin *et al.* 1988). Algunos de los microorganismos identificados son *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botryodiplodia* spp., *Cercospora kikuchii* Matsumoto y Tomoy, *Colletotrichum truncatum* (Schwein.), *Fusarium* spp., *Nematospora corily* Peglion, *Penicillium* spp. y *Phomopsis* spp. (Russin *et al.*, 1988). Cuando colonizan el cultivo de soja en las etapas de formación y llenado de granos (R3-R5.5 según la escala de Fehr *et al.*, 1971) pueden inducir retrasos en la maduración, la retención foliar y la producción de pequeños folíolos y vainas supernumerarias pegadas al tallo principal (Gamundi y Sosa, 2008). Esto provoca el síntoma conocido como “soja loca”, en el que las vainas maduran pero las hojas permanecen verdes, lo que dificulta su cosecha (Boethel *et al.* 2000, Sosa-Gómez y Moscardi 1995). Sosa-Gómez y Moscardi (1995) determinaron que *P. guildinii* provoca mayor retención foliar que *N. viridula*. Esto se debe a la disolución química de los tejidos de semillas producidas por su saliva y no debido al tiempo de alimentación, ni al largo de sus piezas bucales (Depieri y Panizzi, 2011).

La gran capacidad de daño de las chinches por el tipo de alimentación (Depieri y Panizzi 2011, Corrêa- Ferreira 2005, Corrêa- Ferreira y Azevedo 2002, Sosa-Gómez y Moscardi 1995), y las dificultades para su control mediante el uso de insecticidas como consecuencia de la tolerancia intrínseca a los principios activos que son utilizados comúnmente (Corso y Gazzoni, 1998), determina que se requiera el uso de dosis altas de insecticidas y que estos insectos causen daños económicos con bajos niveles poblacionales. En Argentina, el umbral de daño económico establecido en soja varía con el estado fenológico; en R3-R4, R5, R6-R7 los valores que se consideran son entre 0,5 y 0,7; un individuo, y cuatro individuos (adultos y/o ninfas de cuarto y quinto estadio) por metro de surco, respectivamente (Iannone, citado por Ribeiro, 2007). En Uruguay, Zerbino (2010) determinó que la decisión de control se debe realizar cuando la densidad poblacional alcanza valores de entre 1 y 1,5 individuos mayores de 5 mm (ninfas y adultos) por metro de surco desde el estado R5.

El concepto de manejo integrado de plagas (MIP) incluye el reconocimiento de los insectos, el monitoreo, la determinación de los niveles de daño que orientan a la toma de decisiones para mantener la población por debajo de un umbral previamente determinado y la elección de diferentes tácticas de control que integradas de forma armónica permiten optimizar el control de manera sostenible. El uso de varias tácticas de control va a depender de la disponibilidad y de su posibilidad de adopción. En la práctica, las dos tácticas más utilizadas han sido el manejo del ambiente y el control químico. En especies polífagas como los hemípteros, las tácticas de control centradas en un sólo cultivo tienen poco efecto en la población general de un insecto (Ehler, 2000). Para el desarrollo de un MIP eficiente y ecológicamente compatible es necesario conocer como los factores bióticos (alimento) y abióticos (fotoperíodo y temperatura) están involucrados en la estacionalidad de los insectos; con esta información es posible diseñar tácticas a ser aplicadas en ausencia del cultivo preferido, que disminuyan o impidan que el insecto colonice el cultivo (Zerbino, 2014).

El conocimiento de sitios de hibernación, de las plantas huésped preferidas y del momento de colonización de los cultivos son esenciales para poner en práctica programas eficaces de MIP en *P. guildinii*. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados sobre soja, y pocos esfuerzos han sido dedicados para conocer cuáles son los hospederos alternativos y la secuencia en que los colonizan; en qué momento se produce la dispersión desde y hacia las plantas cultivadas y cuál es la performance de las ninfas y los adultos sobre las mismas (Panizzi y Parra 2009, Panizzi 1997). Con estos estudios se puede establecer cuál es el huésped alternativo más importante en la biología del insecto y en cuáles especies vegetales se deben concentrar esfuerzos para desarrollar tácticas de manejo que mitiguen el impacto de *P. guildinii* en el cultivo de soja (Zerbino *et al.* 2016, 2015, Zerbino 2014, Panizzi y Parra 2009). Recientemente, Zerbino *et al.* (2015) determinaron la secuencia de hospederos de *P. guildinii* para el Suroeste. Los autores, de acuerdo a los resultados obtenidos, proponen que la alfalfa debe ser la especie vegetal en la cual habría que concentrar esfuerzos para desarrollar a aplicar tácticas de control durante la primavera, que impidan el desarrollo de la población que va a colonizar la soja.

#### 1.4. DISPERSIÓN

Los hemípteros fitófagos se caracterizan por explorar una variedad de plantas huéspedes dentro y entre generaciones. Las ninfas y adultos se movilizan entre las mismas o diferentes especies de plantas, las cuales pueden ser colonizadas en secuencia (Zerbino *et al.*, 2015).

La dispersión local en el campo es un elemento esencial para la comprensión de la ecología de los insectos y el desarrollo de estrategias de manejo de plagas. En caso de los hemípteros fitófagos, para poder implementar prácticas de manejo eficientes es necesario conocer los movimientos entre las especies vegetales y el momento en que se produce la dispersión desde y hacia las plantas cultivadas. Para realizar estudios de movimiento es necesario disponer de métodos que permitan marcar los insectos de modo de poder determinar el movimiento realizado (Zerbino *et al.* 2015, Zerbino 2014, Pilkay 2013, Huang 2012, Panizzi y Parra 2009, Panizzi 1997).

#### 1.4.1 Métodos de marcación de insectos

Existen diversos métodos de marcación, que incluyen etiquetas, colorantes internos o externos, polvos fluorescentes, mutilaciones, uso de elementos raros (trazas) y el uso de radares armónicos (Pilkay 2013, Hagler y Jackson 2001, Reynolds *et al.* 1997). Estos métodos se aplican a individuos obtenidos en el laboratorio o a los recogidos en el campo (Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Huang y Toews 2012, Hagler y Jones 2010, Boina *et al.* 2009, Tillman *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Jackson 2001, 1998, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000, Hagler 1997, Hagler *et al.* 1992). Cada uno de estos métodos de marcación y recaptura tienen ventajas y desventajas, pero todos ellos se caracterizan porque suelen considerar, desde unos pocos puntos de liberación, una proporción relativamente pequeña de la población, para luego extrapolar los patrones de movimiento a nivel de población (Hagler y Jackson, 2001).

La principal ventaja de la marcación de insectos con las etiquetas es que las mismas son de bajo costo y durables, pero este método consume tiempo y es tedioso. Otros métodos de marcado similares que utilizan pinturas o tintas pueden ser baratos y fáciles de aplicar, pero algunos productos químicos en los marcadores pueden ser tóxicos para los insectos (Hagler y Jackson, 2001). Este método ha sido utilizado eficazmente para el estudio de movimiento de *N. viridula* y *Euschistus servus* (Say) a nivel del paisaje agrícola algodón- maní en EEUU (Tillman *et al.*, 2009). Huang y Toews (2012) marcaron eficientemente chinches con polvo Day-Glo fluorescente que puede ser detectado bajo luz UV. El método es barato y rápido de aplicar, pero un exceso de polvo puede matar o producir efectos adversos sobre el comportamiento.

La mutilación de alguna parte del insecto puede resultar efectiva a la hora de realizar estudios de movimiento. Las principales ventajas es que las marcas son persistentes y pueden ser reconocidas rápidamente en el campo, pero también insumen mucho tiempo y podrían alterar el movimiento del insecto y su comportamiento. Los insectos también se pueden individualizar usando una marca ingerida. Por ejemplo, los insectos pueden ser identificados o señalados con

elementos traza, tales como rubidio, después de ingerir alimento marcado. La limitación de utilizar esta técnica es que requiere equipo de detección costoso y experiencia técnica para analizar los resultados (Hagler y Jackson, 2001).

Otra metodología para el estudio de los movimientos de dispersión en insectos es la implantación de un radar armónico en el objeto de estudio. El radar armónico opera mediante la transmisión de una señal de radar direccional a la etiqueta de radar implantada, que consta de una antena y un diodo de barrera Schottky. La unidad receptora genera tonos audibles a diferentes intensidades al localizar la etiqueta. Se ha propuesto que el uso de radar armónico tiene el potencial de ser una tecnología viable para el seguimiento de pentatómidos en entornos agrícolas. Unidades de radar armónico fueron utilizadas por Pilkay (2013) para el estudio de la movilidad de *N. viridula* en cultivos de algodón [*Gossypium hirsutum* (L.)].

Los patrones de movimiento se pueden comprender mejor cuando se realiza la marcación de un gran número de insectos silvestres. El uso de diferentes marcas permite estudiar el movimiento inter-áreas (Huang 2012, Jones *et al.* 2006, Hagler y Jackson 2001). La técnica de inmunomarcado demostró ser eficiente para determinar los patrones de movimiento de varios grupos de insectos (Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Irvin *et al.* 2012, Hagler y Jones 2010, Boina *et al.* 2009, Horton *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Miller 2002, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000, Hagler *et al.* 1992). Esta técnica permite superar muchos de los inconvenientes asociados con las otras técnicas de marcado mencionadas anteriormente (Hagler y Jackson 1998, Hagler 1997, Hagler *et al.* 1992). Inicialmente, los insectos fueron marcados con proteínas de vertebrados específicas (inmunoglobulinas IgG) y luego fueron examinados para detectar la presencia de las mismas mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando anticuerpos específicos para estas proteínas (Hagler y Jackson 1998, Hagler 1997, Hagler *et al.* 1992). El alto costo de las IgG purificadas hace que el método sea poco práctico para muchos propósitos. Posteriormente, Jones *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo más económico en el que se utilizan como marcadores alimentos de bajo costo, como es el caso de: albúmina de huevo (clara de huevo), caseína bovina (leche de vaca) y

proteína de soja (leche de soja) para marcar insectos silvestres en el campo (Huang 2012, Boina *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006).

Esta técnica tiene varias ventajas, entre ellas el bajo costo de aplicación, la posibilidad de uso a gran escala y la detección de múltiples marcas en un sólo insecto, dado que no hay reacción cruzada entre los diferentes marcadores, ni con las plantas a la que son aplicados. Además, el análisis de ELISA es simple, sensible, de bajo costo y se ha normalizado para realizarlos de forma masiva (por ejemplo, más de 1000 muestras por día) (Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Hagler y Jones 2010, Horton *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Miller 2002, Hagler y Jackson 2001). También presenta algunas desventajas que se deben considerar al momento de utilizarlo en estudios de dispersión. Como consecuencia de la sensibilidad del procedimiento de marcación, en el momento de la aplicación de las proteínas es necesario tener cuidado para evitar la deriva a zonas no deseadas. Los factores como la lluvia, la humedad, y el viento pueden alterar la eficacia de los marcadores (Jones *et al.*, 2006). Por último, la extrema sensibilidad del ensayo ELISA requiere el desarrollo de procedimientos para reducir el riesgo de contaminación cruzada entre antígenos y generación de resultados falsos positivos (Sanders y Carpenter 2014, Hagler y Miller 2002).

## 2. OCURRENCIA ESTACIONAL DE *Piezodorus guildinii* (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EN EL NOROESTE DE URUGUAY

### 2.1. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivos ampliar el conocimiento sobre las plantas y sitios de hibernación de *Piezodorus guildinii* y determinar el período en que se encuentra en diapausa en el Noroeste de Uruguay. Entre julio 2013 y junio 2014, en dicha región, fueron realizados muestreos semanales en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación. La presencia de *P. guildinii* se registró en 15 especies vegetales y cuatro sitios de hibernación. *Cotoneaster pannosus* Franch., *Cotoneaster salicifolia* Franch., *Quercus ilex* L., *Quercus robur* L., *Quercus suber* L., *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. y *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk. son nuevos reportes para *P. guildinii*. En el período de estudio, en *Medicago sativa* L. se colectaron el 81 % de los adultos totales y el 95 % de las ninfas mayores; los adultos se registraron durante todo el año, mientras que las ninfas entre setiembre y mayo. Entre mayo y agosto (meses de menor temperatura y de fotofase más corta) un alto porcentaje de los adultos tienen órganos reproductivos inmaduros, menor tamaño de cuerpo y mayor contenido de lípidos, las hembras muestran cambios en la coloración de la banda del pronoto, hembras y machos en la del conectivo, lo que indica que se encuentran en estado de diapausa. Los resultados sugieren que en el Noroeste el período de diapausa es más breve que en el Suroeste. Además, confirman que en Uruguay la alfalfa es la planta huésped alternativa preferida, por lo que es el cultivo donde deben concentrarse los esfuerzos para desarrollar tácticas de manejo eficientes antes que el insecto colonice la soja.

Palabras Clave: Plantas huésped y asociadas, sitios de hibernación, estacionalidad, diapausa



SEASONAL OCCURRENCE OF *Piezodorus guildinii* (WESTWOOD)  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) IN THE NORTHWEST OF URUGUAY

2.2. ABSTRACT

This study aimed to increase the knowledge about host plants and overwintering sites utilized by *Piezodorus guildinii* and to determine its diapause period in the Northwest of Uruguay. From July 2013 to June 2014, weekly samples were taken examining on different plant species and hibernation sites in the Northwest region. *Piezodorus guildinii* was recorded on 15 plant species and in 4 overwintering sites. *Cotoneaster pannosus* Franch., *Cotoneaster salicifolia* Franch., *Quercus ilex* L., *Quercus robur* L., *Quercus suber* L., *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. and *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk. are new plant records for *P. guildinii*. In the study period, in *Medicago sativa* L. 81% of total adults and 95% of older nymphs were collected from alfalfa; adults were recorded throughout the year, while nymphs were registered from September to May. Results indicated that from May to August (months of lower temperature and shorter photophase) a high percentage of adults show undeveloped reproductive structures, smaller body size and higher content of lipids (accumulated energy reserves), females showed clear coloration of the pronotum band and females and males showed clear colouration of the connexivum band, indicating diapause. Results of these studies suggest that in the Northwest region the period of diapause of *P. guildinii* is shorter than in the South. In addition, they confirm that alfalfa is the preferred alternate host plant in Uruguay, efforts should be concentrated on this crop to develop management tactics before *P. guildinii* disperse to soybean.

Key Words: Host plants, overwintering sites, seasonality, diapause

### 2.3. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad, abundancia y calidad del alimento, conjuntamente con el fotoperíodo y la temperatura son los principales factores que regulan la dinámica de los hemípteros fitófagos. *Piezodorus guildinii* dispone de su alimento preferido (vainas inmaduras de soja) durante un breve período de tiempo, desde final del verano a principios de otoño (Panizzi y Silva 2009, Panizzi 2000). Luego que la soja se cosecha, cuando el alimento comienza a ser escaso y la duración de la fotofase y temperatura disminuyen, se desplaza hacia otras especies vegetales con menor calidad nutricional y/o a sitios de hibernación que les permiten sobrevivir a las condiciones ambientales adversas (Zerbino *et al.* 2015, Panizzi y Parra 2009, Panizzi y Silva 2009, Panizzi *et al.* 2000a, Panizzi 2000, 1997). Al igual que otros hemípteros de la región templada, esta especie enfrenta las condiciones adversas del ambiente como adulto en diapausa reproductiva (Zerbino *et al.* 2015, 2014, Saulich y Musolin 2012, Panizzi y Silva 2009, Higuchi 1994, Ichimori *et al.* 1990, Ali y Ewiess 1977). Este es un proceso dinámico que se caracteriza por la disminución o detención de las actividades metabólicas, lo que origina cambios morfológicos, fisiológicos, epidérmicos, bioquímicos y de comportamiento (Košťal 2006, Hodek 2002, Danks 1987, Tauber *et al.* 1986, Beck 1980). Los individuos que se encuentran en estado de diapausa se caracterizan porque tienen órganos reproductivos inmaduros y alto contenido de lípidos, asociados a la detención de la alimentación (Kiritani, 1963), además de que pueden ocurrir cambios en el tamaño, la forma y la coloración del cuerpo (Zerbino *et al.* 2015, 2014, Musolin 2012, Niva y Takeda 2003, Musolin y Numata 2003, Chocorosqui y Panizzi 2003, Mourão y Panizzi 2002, Nakamura y Numata 1997, Kobayashi y Numata 1995, Hodek y Hodková 1993, Albuquerque 1993, 1989, Denlinger 1986, Ito 1985, Ali y Ewiess 1977, McPherson 1974).

Para diseñar estrategias de manejo a ser aplicadas durante el período en que el cultivo de soja está ausente, es imprescindible conocer la secuencia de plantas y/o sitios de hibernación que utilizan las distintas generaciones, y el momento en el que ocurre la dispersión desde la soja hacia otras plantas cultivadas y/o silvestres y viceversa (Panizzi, 1997). Estos movimientos fueron estudiados para varias especies

de pentatómidos en distintas partes del mundo (Panizzi 1997, Panizzi y Slansky 1985b). Como consecuencia de la distribución geográfica de las especies vegetales, las poblaciones locales tienen hábitos de alimentación específicos, razón por la cual la información válida para una localidad particular puede no serlo para otro sitio. Por ello, es necesario realizar estudios locales que permitan determinar la secuencia de plantas y sitios de hibernación que son utilizadas por las diferentes generaciones y establecer cuáles son las principales plantas huéspedes alternativas (Ehler 2000, Panizzi 1997, Panizzi y Slansky 1985b).

La secuencia de hospederos de *P. guildinii* en Uruguay fue recientemente estudiada por Zerbino *et al.* (2015) para la región Suroeste. Los autores establecieron que inmediatamente después de la cosecha de la soja, al comienzo del otoño, las ninfas y los adultos de *P. guildinii* se dispersan hacia las leguminosas forrajeras (principalmente hacia alfalfa *Medicago sativa* L.). Posteriormente, los adultos también se pueden trasladar hacia plantas perennes, hasta el fin del otoño, las cuales fundamentalmente proporcionan abrigo, y luego se movilizan a los sitios de hibernación como la hojarasca de eucaliptos. Los adultos hibernantes, que en primavera vuelven a tener actividad reproductiva, colonizan las leguminosas forrajeras, fundamentalmente alfalfa (Zerbino *et al.*, 2015). Luego, las ninfas mayores y adultos descendientes de la generación hibernante se dispersan hacia la soja durante el inicio de la fase reproductiva del cultivo (Zerbino *et al.* 2015, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro y Castiglioni 2009).

En los departamentos de Paysandú y Río Negro se siembra el 25,4 % del área de soja de Uruguay (MGAP, 2016). En particular para estos departamentos, la información que se dispone sobre la estacionalidad de *P. guildinii* es escasa. Particularmente se desconoce dónde habita en los meses de otoño e invierno (período de ausencia del hospedero preferido y de factores abióticos desfavorables); y cómo y cuándo se dan los movimientos entre los diferentes hábitats. Este trabajo tuvo como objetivos ampliar el conocimiento sobre las plantas y/o hábitats que coloniza *P. guildinii*, conocer la ocurrencia estacional en el Noroeste de Uruguay, y evaluar el estado fisiológico y fenológico de los individuos colectados en los distintos

hospederos y diferentes momentos. Con esta información se podrá establecer cuáles son las especies vegetales más importantes en la historia de vida *P. guildinii* en esa región, de manera de poder planificar tácticas de manejo que permitan disminuir el impacto de esta especie en la soja.

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación

Entre julio del 2013 y julio del 2014, se realizaron muestreos semanales en predios localizados en los departamentos de Río Negro y Paysandú (Latitud S entre 32° 01' y 33° 02'; Longitud W entre 57° 50' y 57° 24'), con el propósito de identificar las especies vegetales donde *P. guildinii* está presente y de estudiar la estacionalidad del insecto en esa región. Las situaciones consideradas fueron: cultivos de leguminosas forrajeras [(3) *M. sativa*, (3) *Lotus corniculatus* (L.), (2) *Trifolium pratense* L. y (1) *Trifolium repens* L.], y de (2) soja luego de la cosecha (rastrojo), (2) gramilla [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.], (2) hojarasca de *Eucalyptus* sp., y (2) montes con especies nativas e introducidas, estos tres últimos localizados próximos a los cultivos anteriormente mencionados. Entre paréntesis se indica el número de situaciones evaluadas.

Los métodos de colecta variaron de acuerdo al tipo de vegetación. En leguminosas forrajeras se utilizó la red entomológica de 38 cm de diámetro, dando 400 segadas en cada situación. Para el muestreo de restos vegetales en un área seleccionada al azar se colocó un marco de hierro de un metro cuadrado. Luego, se revisaron los residuos, se retiraron y se examinó la superficie del suelo. Este procedimiento se repitió en 10 puntos al azar en cada una de las situaciones consideradas. En las especies arbóreas y arbustivas se empleó el método del paraguá entomológico, el cual consistió en colocar un paño blanco de un metro cuadrado en forma horizontal, sobre el cual se efectuaron 15 golpes en el follaje.

Los adultos y ninfas fueron colectados e identificados con la fecha y lugar de colecta, y transportados al laboratorio donde fueron muertos por congelamiento. Para

cada especie vegetal se calculó el promedio mensual ( $\pm$ EEM) del total de adultos y ninfas colectados por muestreo.

#### 2.4.2. Formas estacionales

En el laboratorio se determinó el sexo y se realizó la evaluación del tamaño y color del cuerpo de cada adulto colectado. Las variables morfométricas evaluadas fueron: largo (desde el ápice de las yugas hasta el final de los hemielitros) y ancho del cuerpo (en la región del pronoto), largo lateral del pronoto y ancho de la cabeza a la altura de los ojos (Figura 2.1). Las mediciones se realizaron con el software Image Pro-Express 5.1, luego de obtener una fotografía digital.

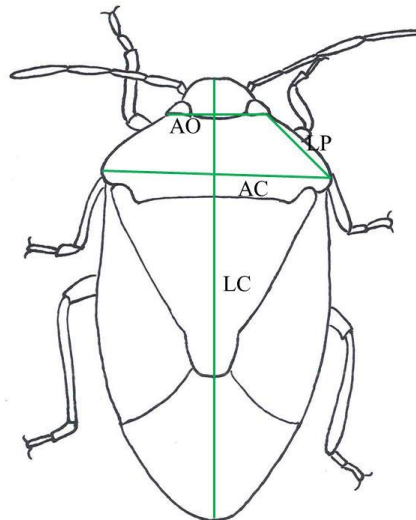


Figura 2.1. Variables morfométricas evaluadas en los adultos de *Piezodorus guildinii*. LC: largo del cuerpo, AC: ancho del cuerpo, LP: largo lateral del pronoto y AO: ancho de la cabeza.

Inmediatamente después se realizó la evaluación del color de la banda del pronoto y del conectivo. Las hembras se caracterizaron de acuerdo al color de la banda del pronoto y del conectivo en tipo claro y oscuro tal como lo establecieron Zerbino *et al.* (2015, 2014). En los machos se observaron en el color del conectivo, variaciones desde blanco a anaranjado. De acuerdo a las mismas, se tipificaron claros

cuando el conectivo era de color blanco o crema y como oscuros cuando era amarillo o anaranjado (Figura 2.2).

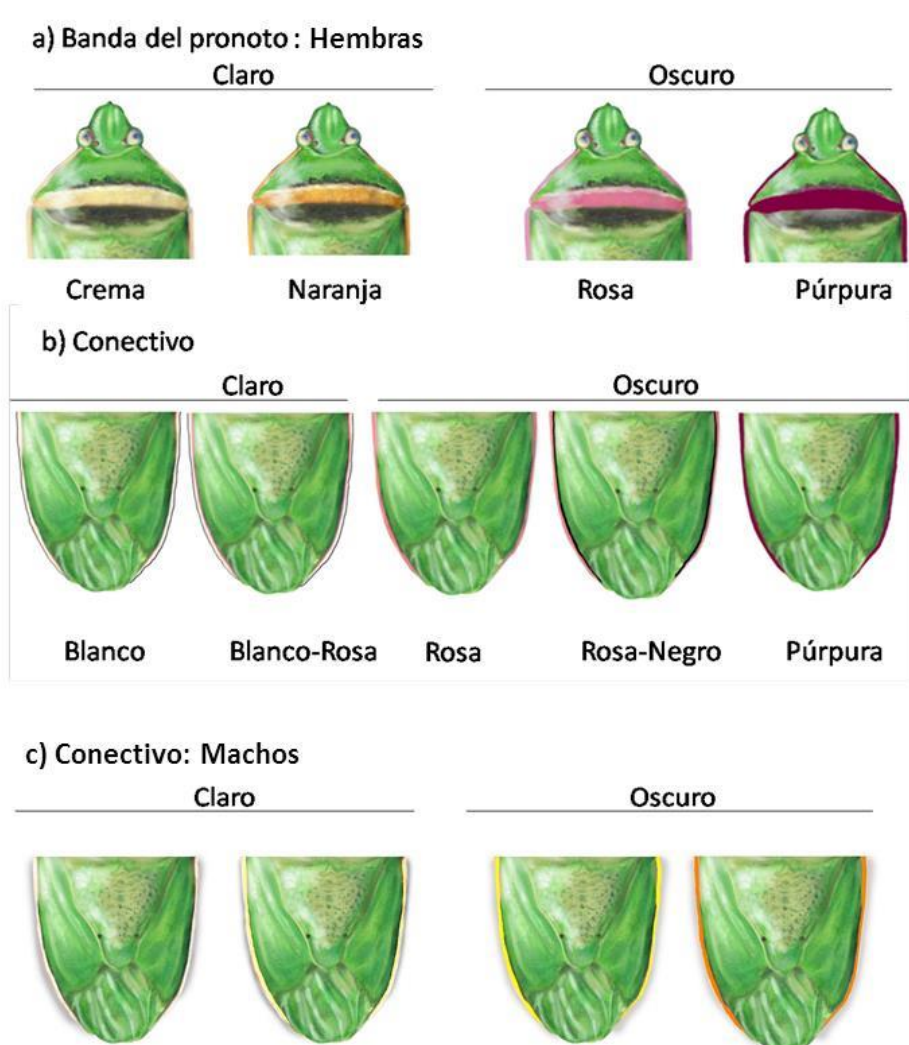


Figura 2.2. Tipificación de los adultos de *Piezodorus guildinii* de acuerdo al color de a) banda del pronoto de las hembras, b) conectivo de las hembras y c) banda del pronoto de los machos. Adaptado de Zerbino *et al.* (2015).

Posteriormente, a los efectos de determinar los cambios fisiológicos, los machos y las hembras colectados en cada fecha de muestreo se dividieron en dos grupos. Un grupo se dispuso para realizar la evaluación de contenido de lípidos del cuerpo; para ello se utilizó un extractor Twisselman de acuerdo a la metodología descrita por

Panizzi y Hirose (1995). A efectos de determinar el peso seco (PS), los insectos, identificados por sexo y fecha de muestreo, se colocaron en una estufa a 60° C durante 48 horas, inmediatamente se determinó el peso con una balanza electrónica (OAHUS PA214) (con 0,01 mg). Luego, cada individuo se acondicionó en una bolsa de tejido de 3 cm x 4 cm, con la correspondiente identificación (sexo y fecha de muestreo) y colocados en un tubo a razón de seis individuos, los cuales recibieron el reflujó del extractor químico (éter de petróleo). La temperatura del matraz que contenía el extractor de lípidos fue 120° C y la extracción tuvo una duración de dos horas. Finalizado el período de extracción, los insectos se llevaron nuevamente a estufa, a la misma temperatura, durante 15 horas, de modo de obtener el peso sin lípidos (magro). La determinación del porcentaje de lípidos totales almacenados por el insecto, se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos en peso seco} = (\text{Peso seco} - \text{Peso magro}) / \text{Peso seco} \times 100$$

En el otro grupo de insectos, se realizó la evaluación del desarrollo de los órganos reproductivos. Los adultos fueron fijados con alfileres entomológicos en la región anterior del pronoto y retiradas las alas, el escutelo y las placas que cubren la región dorsal del abdomen. La cavidad abdominal se limpió con alcohol 70 % de modo de tener una correcta visión de los órganos reproductivos.

Las hembras se caracterizaron de acuerdo con Zerbino *et al.* (2015, 2014) y Mourão y Panizzi (2002) en: ovario desarrollado con huevos, ovario desarrollado sin huevos y ovario inmaduro (Figura 2.3A). En el caso de los machos, se midió el largo del testículo y fueron tipificados de acuerdo a lo establecido por Zerbino *et al.* (2014) como desarrollado ( $\geq 1,55$  mm) o inmaduro ( $\leq 1,54$  mm). También se evaluó la condición del saco ectodérmico como expandido o colapsado (Figura 2.3B; Zerbino *et al.* 2015, 2014, Esquivel 2009).

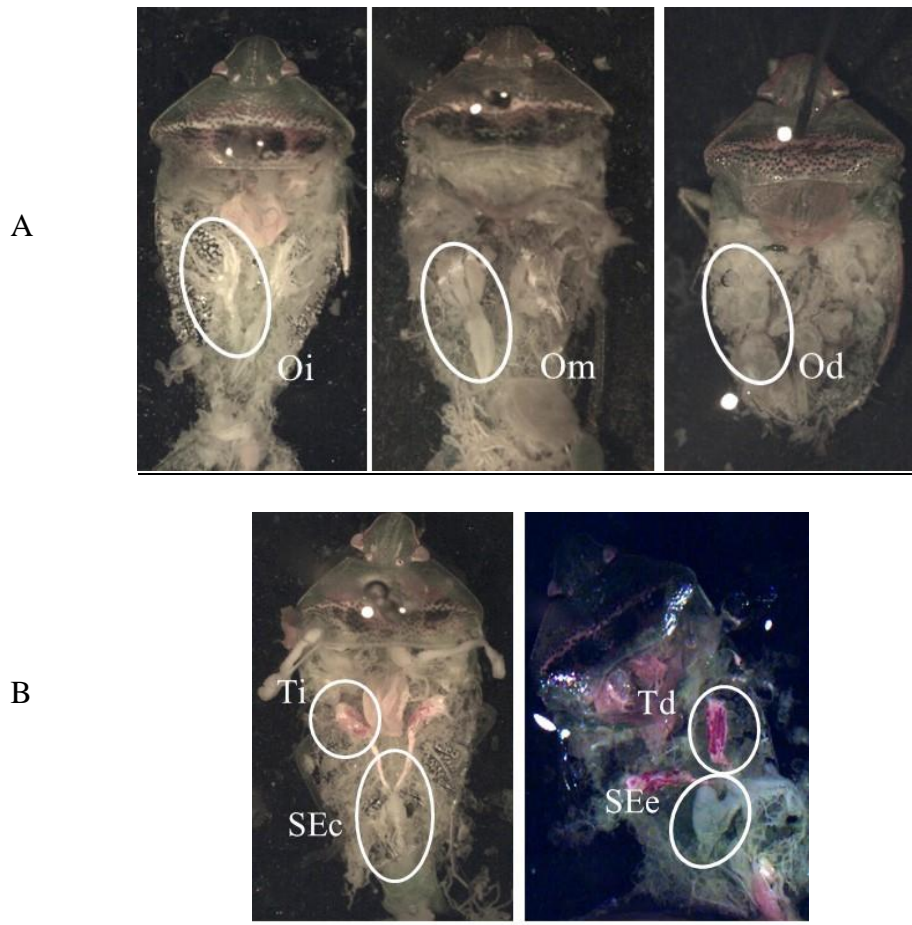


Figura 2.3. (A) Tipificación del desarrollo del ovario de hembras de *Piezodorus guildinii* Oi) ovario inmaduro, Om) ovario intermedio, Od) ovario desarrollado. (B) Tipificación del estado del aparato reproductor masculino, Ti) testículo inmaduro Td) testículo desarrollado, SEc) saco ectodérmico colapsado y SEe) saco ectodérmico expandido.

#### 2.4.3. Análisis de datos

Las variables morfométricas y el largo del testículo cumplieron con los principios de normalidad, homogeneidad e independencia, por lo que se analizaron con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.4). El modelo consideró como efecto fijo el mes de muestreo; y en el caso de las variables morfométricas y de los lípidos al sexo y la interacción mes\*sexo. Las medidas se compararon utilizando



la prueba de Tukey-Kramer honestly significant (HSD) con una probabilidad de  $P \leq 0,05$ .

Las variables expresadas como porcentaje se analizaron con modelos lineales generalizados (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Para el análisis del color de la banda del pronoto y del conectivo de hembras y machos y para el análisis de la condición de los testículos y del desarrollo del saco ectodérmico de los machos se consideró la distribución binomial y la función logit, mientras que para el análisis del desarrollo del ovario se utilizó la distribución multinomial con la función cumlogit. En todos los casos, el modelo consideró al mes como efecto fijo. Los resultados son presentados como la máxima verosimilitud de la distribución Chi cuadrado.

## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y hábitat

La presencia de *P. guildinii* se registró en 15 especies vegetales pertenecientes a nueve familias y cuatro “hábitats”. Durante todo el período de muestreo, se interceptaron un total de 15854 insectos. Aproximadamente el 35 % fueron adultos (5036), machos y hembras estuvieron representados en proporción semejante (2704 hembras y 2332 machos). La mayor colecta de ninfas mayores (estadios 4 y 5) ocurrió en enero y febrero y la de adultos en octubre, diciembre y enero (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Número total de adultos y ninfas mayores de *Piezodorus guildinii* colectados en diferentes meses del año, en el Noroeste de Uruguay.

Meses	Hembras		Machos		Ninfas	
	Total	%	Total	%	Total	%
Octubre	532	19,7	376	16,1	792	7,8
Noviembre	298	11,0	208	8,9	936	9,2
Diciembre	435	16,1	404	17,3	1247	12,3
Enero	419	15,5	370	15,9	3202	31,5
Febrero	269	9,9	244	10,5	2592	25,5
Marzo	304	11,2	268	11,5	919	9,1
Abril	209	7,7	207	8,9	284	2,8
Mayo	69	2,6	67	2,9	15	0,1
Junio	30	1,1	46	2,0	0	0
Julio	20	0,7	21	0,9	0	0
Agosto	24	0,9	7	0,3	0	0
Setiembre	95	3,5	114	4,9	166	1,6
Total	2704		2332		10153	

En las leguminosas forrajeras (*M. sativa*, *L. corniculatus*, *T. pratense* y *T. repens*) se colectaron el 95 % de los adultos y el 100 % de las ninfas mayores. La alfalfa fue la especie donde se registró la mayor cantidad de adultos (81 %) y de ninfas mayores (95 %).

Las 11 especies de plantas restantes fueron arbóreas y arbustivas. En ellas se colectó un total de 199 adultos (98 hembras y 101 machos). *Pittosporum undulatum* Ventenat y *Cotoneaster salicifolia* Franch. fueron las especies donde se obtuvo la mayor cantidad de adultos (51 y 37 individuos respectivamente) y durante un período más prolongado (Cuadro 2.2). En las nueve especies leñosas restantes, las colectas variaron entre 30 (*Cotoneaster pannosus* Franch.) y tres individuos [*Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk.]. En los cuatro “hábitats” se interceptaron un total de 52 individuos (29 hembras y 23 machos), y la mayor y menor colecta correspondió al rastrojo de soja y a la hojarasca de *Quercus robur* L., respectivamente (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Resultado de la prospección de *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) en diferentes especies vegetales/ hábitats del Noroeste de Uruguay. Número de individuos y de muestreos en los que se colectaron insectos, para el período julio 2013-junio 2014.

Hospedero	Familia	Total de adultos	Total ninfas	N° de muestreos con colecta	Período
<i>Medicago sativa</i> <sup>1</sup>	Leguminosae	4071	9650	97	jul-jun
<i>Lotus corniculatus</i> <sup>1</sup>	Leguminosae	475	367	28	oct-abr
<i>Trifolium pratense</i> <sup>1</sup>	Leguminosae	131	36	10	dic-feb
<i>Trifolium repens</i> <sup>1</sup>	Leguminosae	108	100	8	oct-ene
<i>Pittosporum undulatum</i> <sup>2</sup>	Pittosporaceae	51	0	19	abr-oct
<i>Cotoneaster salicifolia</i> <sup>2</sup>	Rosaceae	37	0	14	may-set
<i>Cotoneaster pannosus</i> <sup>2</sup>	Rosaceae	30	0	20	may-jul
<i>Quercus ilex</i> <sup>2</sup>	Fagaceae	23	0	12	may-jul
<i>Quercus robur</i> <sup>2</sup>	Fagaceae	16	0	4	may-jul
<i>Quercus suber</i> <sup>2</sup>	Fagaceae	7	0	5	may-jul
<i>Phyllostachys</i> sp. <sup>2</sup>	Poaceae	16	0	9	abr-jul
<i>Ligustrum</i> sp. <sup>2</sup>	Oleaceae	6	0	4	may-jul
<i>Lithraea molleoides</i> <sup>2</sup>	Anacardiaceae	6	0	4	jun-jul
<i>Eugenia uniflora</i> <sup>2</sup>	Myrtaceae	4	0	4	may-jul
<i>Pouteria salicifolia</i> <sup>2</sup>	Sapotaceae	3	0	2	jun-jul
Rastrojo de <i>Glycine max</i> <sup>3</sup>	-	35	0	3	May
Hojarasca de <i>Eucalyptus</i> <sup>3</sup>	-	11	0	8	may-set
<i>Cynodon dactylon</i> <sup>3</sup>	-	4	0	3	jul-ago
Hojarasca <i>Q. robur</i> <sup>3</sup>	-	2	0	1	Jun

<sup>1</sup> red entomológica

<sup>2</sup>paraguas entomológico

<sup>3</sup>cuadrado, situaciones consideradas hábitat

De todas las situaciones en las que se colectaron ejemplares de *P. guildinii*, sólo en cinco plantas hospederas (*M. sativa*, *L. corniculatus*, *P. undulatum*, *C. salicifolia* y hojarasca de *Eucalyptus*) el registro ocurrió durante períodos mayores a cinco meses (Cuadro 2.2). La ocurrencia estacional de adultos y ninfas mayores en dichas situaciones (plantas y sitios de hibernación) se presenta en la Figura 2.4, el resto de las situaciones se agruparon). En *M. sativa* los adultos se observaron durante todo el año, y las ninfas mayores entre setiembre y mayo. La intercepción de adultos y ninfas mayores en *L. corniculatus* ocurrió entre el comienzo de la primavera y mediados de otoño (octubre a abril). Es de destacar que en *T. pratense* y *T. repens* la presencia del insecto se registró en períodos breves, desde fin de la primavera (diciembre) hasta mitad del verano (febrero) y entre el comienzo de la primavera (octubre) e inicio del verano (enero), respectivamente (Cuadro 2.2). En *T. repens* las ninfas mayores sólo fueron observadas en noviembre y diciembre.

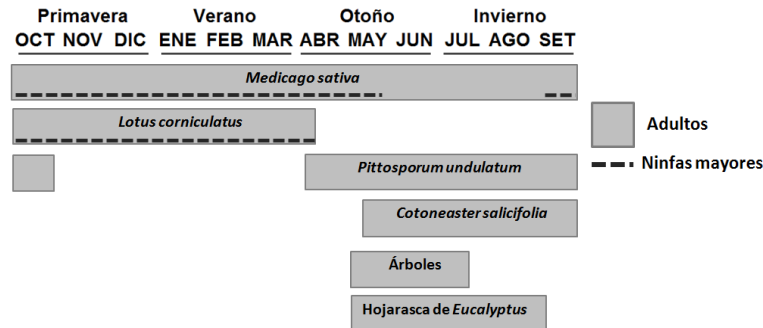


Figura 2.4. Ocurrencia estacional de adultos (en gris) y ninfas mayores (línea punteada) de *Piezodorus guildinii* en diferentes especies vegetales y sitio de hibernación en el Noreste de Uruguay.

El período de colecta de adultos en *P. undulatum* ocurrió desde comienzo del otoño hasta mediados de primavera (abril a octubre), mientras que en *C. salicifolia* (Cuadro 2.2, Figura 2.4) se inició un mes después y terminó un mes antes (mayo a setiembre). En *C. pannosus* el período de colecta fue considerablemente más breve que en *C. salicifolia* (Cuadro 2.2). En las restantes especies vegetales, los adultos se

observaron desde el otoño hasta mediados del invierno (abril/mayo a julio), con excepción de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. y *P. salicifolia*, que sólo se interceptaron entre los meses de junio y julio (Cuadro 2.2).

El período de colecta de adultos en la hojarasca de *Eucalyptus* sp. se extendió desde mayo a setiembre, mientras que en gramilla ocurrió entre julio y agosto. En rastrojo de soja la interceptación de adultos sólo ocurrió durante el mes de mayo (Cuadro 2.2, Figura 2.4).

## 2.5.2. Formas estacionales

### 2.5.2.1. Morfología: Tamaño y coloración del cuerpo

En las variables morfométricas hubo efecto del mes de colecta (largo del cuerpo  $F_{11, 3221} = 140,33$ ;  $P < 0,0001$ ; ancho del pronoto  $F_{11,3198} = 164,39$ ;  $P < 0,0001$ ; largo del margen lateral del pronoto  $F_{11,3200} = 167,98$ ;  $P < 0,0001$ ; y ancho de la cabeza a la altura de los ojos  $F_{11,3189} = 89,97$ ;  $P < 0,0001$ ) y del sexo (largo del cuerpo  $F_{1,3221} = 170,78$ ;  $P < 0,0001$ ; ancho del pronoto  $F_{1,3198} = 139,01$ ;  $P < 0,0001$ ; largo del margen lateral del pronoto  $F_{1,3200} = 91,69$ ;  $P < 0,0001$  y ancho de la cabeza a la altura de los ojos  $F_{1,3189} = 90,74$ ;  $P < 0,0001$ ). Los cambios registrados en ambos sexos en los distintos meses (interacción mes\*sexo) fueron significativamente diferentes (largo del cuerpo  $F_{11,23} = 3,62$ ;  $P < 0,0001$ ; ancho del pronoto  $F_{11,23} = 3,25$ ;  $P = 0,0002$ ; largo del margen lateral del pronoto  $F_{11,23} = 3,23$ ;  $P = 0,0002$ ; y ancho de la cabeza a la altura de los ojos  $F_{11,23} = 2,99$ ;  $P = 0,0006$ ).

En los Cuadros 2.3 y 2.4 se presentan los valores medios ( $\pm$ EEM) de las cuatro variables morfométricas de los machos y las hembras, respectivamente. En ambos sexos, en todas las variables analizadas, los individuos colectados en los meses de febrero y abril tuvieron un tamaño significativamente mayor y menor, respectivamente, que los interceptados en los restantes meses.

Cuadro 2.3. Horas de luz (promedio mensual), tamaño del cuerpo (mm) de los machos adultos de *Piezodorus guildinii* colectados en el Noroeste en los diferentes meses del año ( $X \pm EEM$ ). Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba de Tukey's HSD:  $P \leq 0,05$ ).

Mes	Horas de luz (h)	Largo del cuerpo (mm)	Ancho del pronoto (mm)	Margen lateral del pronoto (mm)	Ancho de la cabeza a la altura de los ojos (mm)
Octubre	12,87	9,61 $\pm$ 0,56 c	5,08 $\pm$ 0,01 d	1,97 $\pm$ 0,01 d	2,19 $\pm$ 0,00 d
Noviembre	13,73	9,62 $\pm$ 0,93 c	5,11 $\pm$ 0,02 d	1,99 $\pm$ 0,01 cd	2,20 $\pm$ 0,01 cd
Diciembre	14,18	9,76 $\pm$ 0,71 b	5,23 $\pm$ 0,02 b	2,06 $\pm$ 0,01 b	2,21 $\pm$ 0,01 b
Enero	13,95	9,82 $\pm$ 0,65 b	5,17 $\pm$ 0,02 c	2,06 $\pm$ 0,01 b	2,21 $\pm$ 0,01 b
Febrero	13,20	10,08 $\pm$ 0,80 a	5,37 $\pm$ 0,02 a	2,12 $\pm$ 0,01 a	2,26 $\pm$ 0,01 a
Marzo	12,28	9,85 $\pm$ 0,75 b	5,22 $\pm$ 0,02 bc	2,04 $\pm$ 0,01 b	2,22 $\pm$ 0,01 b
Abril	11,30	8,83 $\pm$ 0,87 f	4,68 $\pm$ 0,03 f	1,80 $\pm$ 0,02 f	2,10 $\pm$ 0,01 f
Mayo	10,5	9,31 $\pm$ 1,11 e	4,92 $\pm$ 0,04 e	1,92 $\pm$ 0,02 e	2,16 $\pm$ 0,01 e
Junio	10,12	9,61 $\pm$ 1,43 cd	5,07 $\pm$ 0,03 d	1,99 $\pm$ 0,02 cd	2,19 $\pm$ 0,01 cd
Julio	10,30	9,65 $\pm$ 2,17 bcd	5,11 $\pm$ 0,03 cd	2,03 $\pm$ 0,02 bc	2,20 $\pm$ 0,01 bc
Agosto	10,97	9,74 $\pm$ 3,68 abcd	5,03 $\pm$ 0,08 d	1,93 $\pm$ 0,04 de	2,20 $\pm$ 0,01 de
Setiembre	11,88	9,47 $\pm$ 0,89 d	9,43 $\pm$ 0,02 c	1,89 $\pm$ 0,01 e	2,15 $\pm$ 0,01 e

Cuadro 2.4. Horas de luz (promedio mensual), tamaño del cuerpo (mm) de las hembras adultas de *Piezodorus guildinii* colectadas en el Noroeste en los diferentes meses del año ( $X \pm EEM$ ). Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba de Tukey's HSD:  $P \leq 0,05$ ).

Mes	Horas de luz (h)	Largo del cuerpo (mm)	Ancho del pronoto (mm)	Margen lateral del pronoto (mm)	Ancho de la cabeza a la altura de los ojos (mm)
Octubre	12,87	10,02 $\pm$ 0,02 d	5,26 $\pm$ 0,01 de	2,06 $\pm$ 0,01 c	2,23 $\pm$ 0,00 cd
Noviembre	13,73	9,97 $\pm$ 0,03 d	5,28 $\pm$ 0,02 d	2,07 $\pm$ 0,01 c	2,24 $\pm$ 0,01 cd
Diciembre	14,18	10,22 $\pm$ 0,03 c	5,46 $\pm$ 0,01 b	2,15 $\pm$ 0,03 b	2,28 $\pm$ 0,00 b
Enero	13,95	10,30 $\pm$ 0,03 bc	5,43 $\pm$ 0,02 bc	2,16 $\pm$ 0,01 b	2,28 $\pm$ 0,01 b
Febrero	13,20	10,58 $\pm$ 0,03 a	5,59 $\pm$ 0,02 a	2,21 $\pm$ 0,01 a	2,32 $\pm$ 0,01 a
Marzo	12,28	10,35 $\pm$ 0,06 b	5,45 $\pm$ 0,03 b	2,15 $\pm$ 0,01 b	2,29 $\pm$ 0,01 b
Abril	11,30	8,95 $\pm$ 0,06 f	4,72 $\pm$ 0,03 h	1,81 $\pm$ 0,01 f	2,12 $\pm$ 0,01 f
Mayo	10,5	9,68 $\pm$ 0,08 e	5,10 $\pm$ 0,04 fg	1,99 $\pm$ 0,02 d	2,22 $\pm$ 0,01 cd
Junio	10,12	9,99 $\pm$ 0,06 e	5,23 $\pm$ 0,04 de	2,05 $\pm$ 0,02 cd	2,25 $\pm$ 0,01 bc
Julio	10,30	9,90 $\pm$ 0,07 de	5,21 $\pm$ 0,04 def	2,03 $\pm$ 0,02 cd	2,22 $\pm$ 0,01 cd
Agosto	10,97	10,02 $\pm$ 0,05 cd	5,16 $\pm$ 0,04 efg	1,99 $\pm$ 0,02 d	2,20 $\pm$ 0,01 de
Setiembre	11,88	9,72 $\pm$ 0,05 e	5,06 $\pm$ 0,02 g	1,92 $\pm$ 0,01 e	2,19 $\pm$ 0,01 e

El color de la banda del pronoto de las hembras varió significativamente con el mes de colecta ( $\chi^2 = 447,5$ ;  $gl = 11$ ;  $P < 0,0001$ ). Un alto porcentaje de las hembras colectadas entre junio y agosto, tuvo la banda del pronoto clara ( $> 80\%$ ), mientras que desde la mitad de la primavera hasta la mitad del verano (noviembre a febrero) la mayoría presentó la banda del pronoto oscura ( $> 90\%$ ). En el mes de mayo ambos grupos estuvieron representados en igual proporción (Figura 2.5 A).

La proporción de hembras y machos con conectivo de diferente color también varió con el mes de colecta (hembras  $\chi^2 = 674,7$ ;  $gl = 11$ ;  $P < 0,0001$ ; machos  $\chi^2 = 347,02$ ;  $gl = 11$ ;  $P < 0,0001$ ). En las hembras, entre mayo y setiembre se registró el porcentaje mayor con el conectivo del tipo claro, alcanzando valores de  $100\%$  en junio y julio, mientras que entre noviembre y enero la mayoría tuvieron el conectivo oscuro ( $> 78\%$ ; Figura 2.5 B).



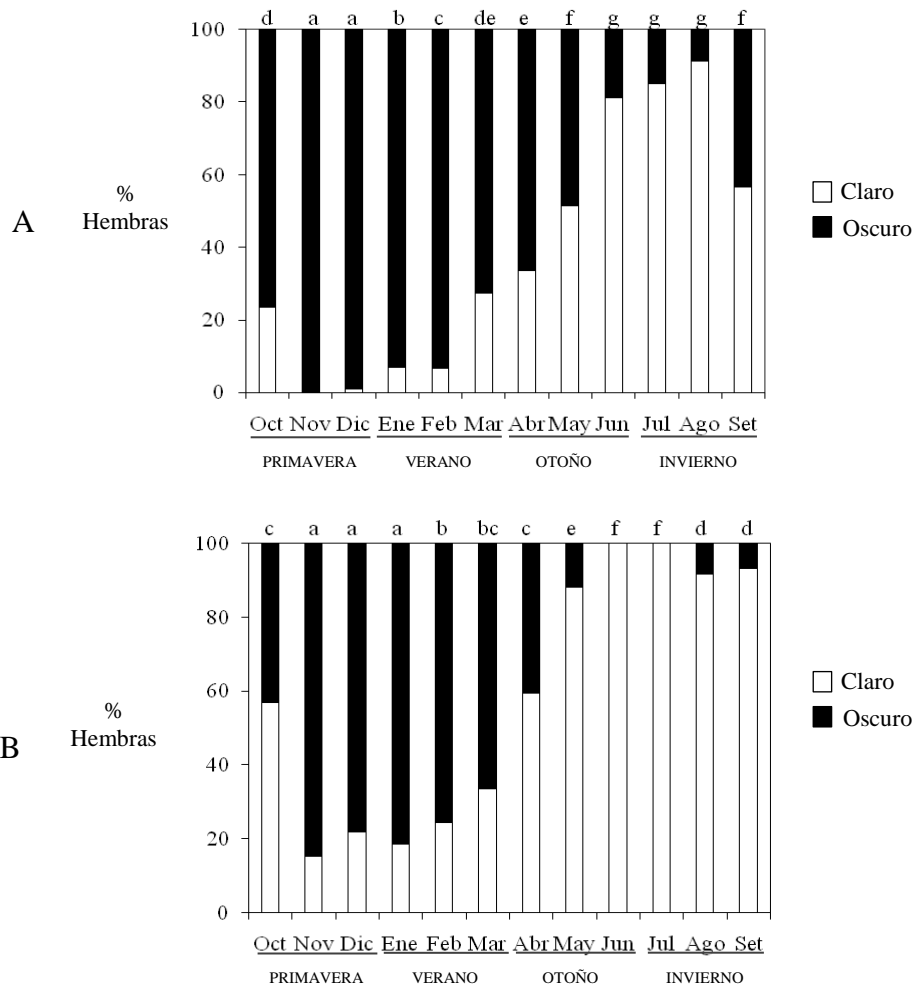


Figura 2.5. Porcentaje de hembras adultas de *Piezodorus guildinii*, colectadas en los departamentos de Río Negro y Paysandú, con la banda del pronoto (A) y el conectivo (B) con diferente tipo de coloración en los distintos meses del año. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ( $P \leq 0,05$ ).

Entre junio y setiembre se registraron altos porcentajes de machos con el conectivo del tipo claro, el máximo correspondió al mes de agosto (100 %). Por el contrario, la mayoría de los machos colectados entre octubre y marzo tuvieron el conectivo oscuro (> 80 %; Figura 2.6).

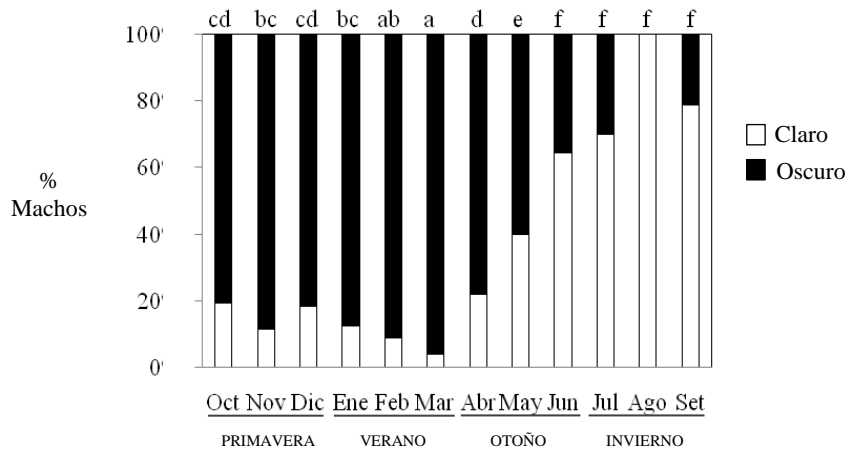


Figura 2.6. Porcentaje de machos adultos de *Piezodorus guildinii*, colectados en los departamentos de Río Negro y Paysandú, con el conectivo con diferente tipo de coloración en los distintos meses del año. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ( $P \leq 0,05$ ).

#### 2.5.2.2. Contenido de lípidos

El mes de colecta tuvo efecto significativo en el contenido de lípidos del cuerpo ( $F_{11,23} = 41,33$ ;  $P < 0,0001$ ). Machos y hembras registraron un contenido de lípidos similar ( $F_{1,23} = 0,0$ ;  $P = 0,95$ ) y en ambos sexos la variación en los meses fue semejante (interacción mes\*sexo  $F_{11,23} = 0,94$ ;  $P = 0,50$ ).

Los adultos colectados durante los meses mayo-agosto tuvieron un contenido de lípidos significativamente mayor que los recogidos en los meses restantes, particularmente los colectados en junio y julio fueron los que registraron los mayores valores. Los menores valores de lípidos correspondieron a los individuos capturados en noviembre, diciembre y enero. Los meses de setiembre, octubre y de febrero a abril presentaron valores intermedios entre ambos grupos (Figura 2.7).

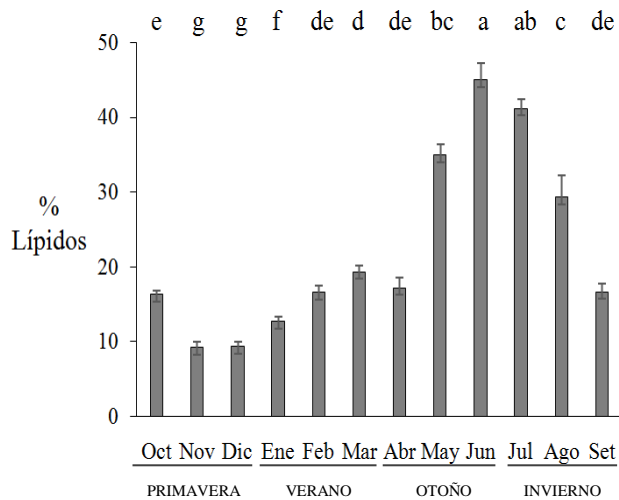


Figura 2.7. Contenido medio ( $\pm$  EEM) de lípidos del cuerpo (%) de adultos de *Piezodorus guildinii* colectados en los departamentos de Río Negro y Paysandú en los distintos meses del año. Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba de Tukey's HSD:  $P \leq 0,05$ ).

#### 2.5.2.3. Desarrollo de los órganos del aparato reproductor

El mes de colecta tuvo efecto significativo en el desarrollo de los ovarios de las hembras ( $\chi^2 = 468,55$ ;  $gl = 11$ ;  $P < 0,0001$ ; Figura 2.8). La mayoría de las hembras colectadas entre mayo y agosto, (duración promedio del día  $< 11$  h), tuvieron los ovarios inmaduros ( $> 72$  %), con un máximo de 100 % en junio (Figura 2.8). A partir de setiembre y hasta febrero, la mayor proporción de hembras colectadas tuvo el ovario desarrollado. Particularmente, en noviembre y diciembre, se registraron los valores más altos (89,3 % y 92,9 %, respectivamente). Entre noviembre y febrero ninguna de las hembras presentó los ovarios inmaduros (Figura 2.8). En marzo y abril una alta proporción de las hembras tuvieron los ovarios del tipo intermedio (56,9 y 78,3 %, respectivamente).

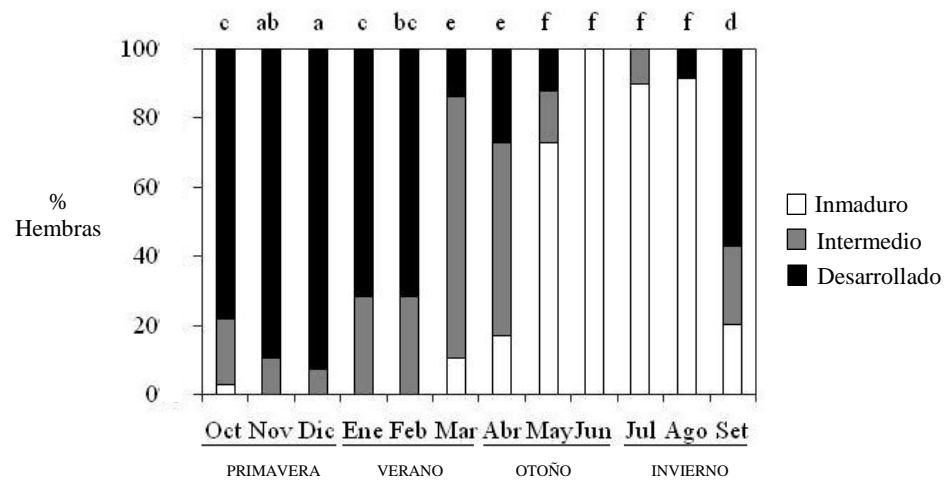


Figura 2.8. Porcentaje de hembras adultas de *Piezodorus guildinii* con diferente desarrollo de los ovarios, para las colectadas en los departamentos de Río Negro y Paysandú en los distintos meses del año. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ( $P \leq 0,05$ ).

El porcentaje de machos con diferente desarrollo de los testículos ( $\chi^2 = 163,57$ ;  $gl=11$ ;  $P < 0,0001$ ) y del saco ectodérmico ( $\chi^2 = 273,6$ ;  $gl = 11$ ;  $P < 0,0001$ ) varió con el mes de colecta. De acuerdo a los resultados obtenidos, se destaca que entre abril y setiembre la mayoría de los machos (> 58 %) mostró los testículos inmaduros, mientras que desde octubre a marzo una gran proporción (> 63 %) los tuvo desarrollados (Figura 2.9 A). Para el saco ectodérmico, los resultados indican que en junio, julio y agosto la mayoría de los machos (> 95 %) tuvieron el saco ectodérmico colapsado, mientras que a partir de noviembre y hasta febrero inclusive un alto porcentaje (> 80 %) lo tuvieron expandido. El mes con mayor porcentaje de machos con el saco ectodérmico expandido (86 %) fue diciembre (Figura 2.9 B).

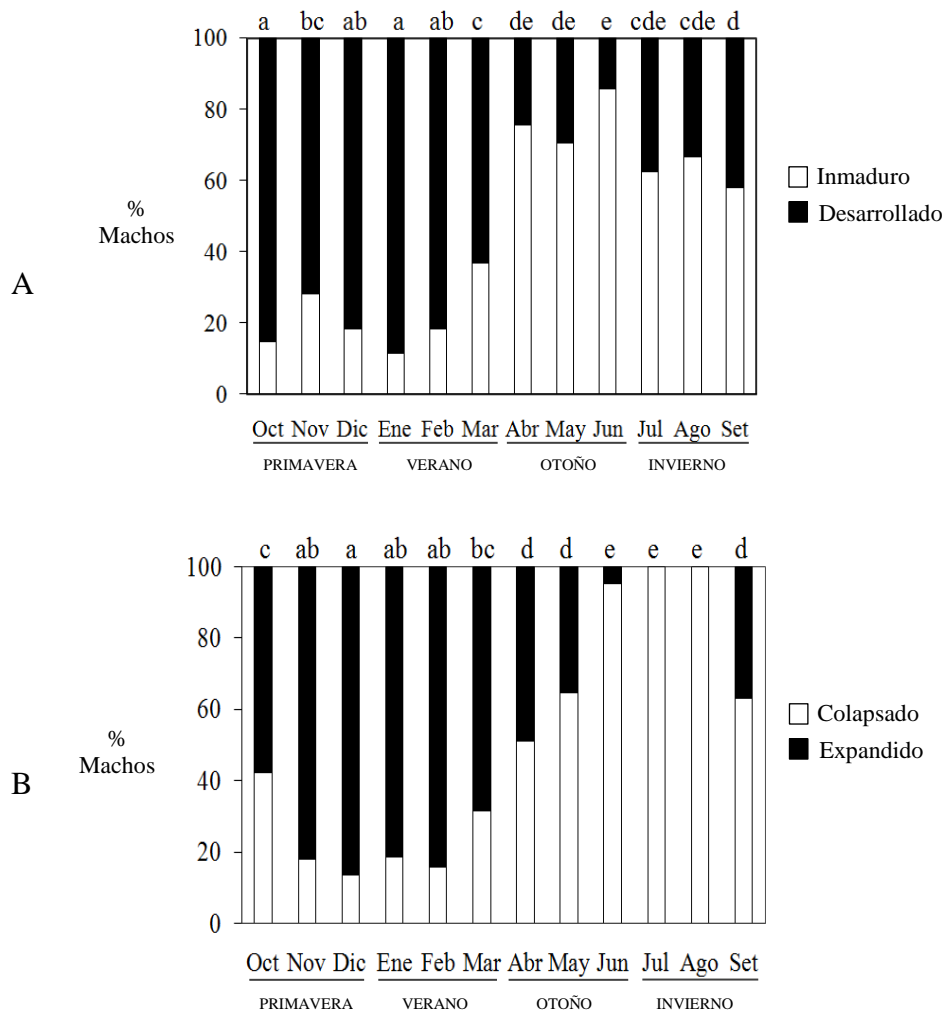


Figura 2.9. Porcentaje de machos con diferente grado de desarrollo de los testículos (A) y del saco ectodérmico (B) de machos adultos de *Piezodorus guildinii* colectados en los departamentos de Río Negro y Paysandú en los distintos meses del año. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ( $P \leq 0,05$ ).

## 2.6. DISCUSIÓN

### 2.6.1. Ocurrencia estacional de adultos y ninfas en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación

Los resultados obtenidos en este estudio aportaron conocimientos sobre nuevas plantas y sitios de hibernación que *P. guildinii* coloniza en el Noroeste de Uruguay.

Este insecto fue observado en 15 especies vegetales y cuatro “hábitat” durante el período en que el cultivo de soja está ausente. Particularmente se destacan las leguminosas forrajeras (*M. sativa* y *L. corniculatus* principalmente), seguidas de *P. undulatum* y *C. salicifolia* y hojarasca de *Eucalyptus* sp. porque fue donde la colecta fue mayor y más prolongada. En cambio, en el Suroeste fueron *M. sativa*, *T. pratense*, *L. corniculatus*, *P. undulatum*, *Ligustrum lucidum* Aiton, *Phyllostachys* sp. y hojarasca de *Eucalyptus* sp. (Zerbino 2014), lo que indica que existen algunas diferencias entre ambas regiones.

A nivel mundial, la presencia de este insecto está reportada en 66 especies vegetales y 25 familias (Smaniotto y Panizzi 2015, Batistella y Dal’Col 2014, Zerbino 2014, Chiaradia 2010, Garlet *et al.* 2010, Souza-Bunde *et al.* 2010, Panizzi 1985, Panizzi y Slansky 1985b, 1985c, Fraga y Ochoa 1972). De las especies vegetales reportadas en los distintos estudios nueve son comunes a Uruguay y 11 se registraron exclusivamente en nuestro país, particularmente siete en este estudio, es el caso de *C. pannosus*, *C. salicifolia*, *Quercus ilex* L., *Q. robur*, *Quercus suber* L., *L. molleoides* y *P. salicifolia*. Costa *et al.* (1995) realizaron una prospección de pentatómidos en especies arbóreas que incluyó *L. molleoides* en São Sepé -Rio Grande do Sul, Brasil, y en esta especie vegetal no hubo registro de *P. guildinii*. Esto reafirma la importancia de realizar estudios locales para determinar las plantas huéspedes alternativas y sitios de hibernación de los hemípteros (Panizzi y Parra, 2009).

En este trabajo, las leguminosas forrajeras (*M. sativa*, *L. corniculatus*, *T. pratense*, *T. repens*) fueron los únicos huéspedes donde se interceptaron ninfas. Smaniotto y Panizzi (2015) y Panizzi (2000) distinguen dos grandes grupos de especies vegetales, las plantas huéspedes en la que el insecto se alimenta, desarrolla y reproduce, y las plantas denominadas asociadas que son las que le proporcionan refugio, agua y/o alimento, pero no se reproducen. De acuerdo a estas clasificaciones, las leguminosas forrajeras deben ser consideradas plantas huéspedes. Zerbino *et al.* (2016), en el laboratorio determinaron que *M. sativa* y *L. corniculatus*, pueden ser consideradas plantas huéspedes, pero que *T. pratense* es una especie

asociada dado que los adultos no se reproducen y las ninfas no completan el ciclo cuando son alimentados exclusivamente con esta especie. Estos autores consideran que las ninfas mayores y adultos colonizan el cultivo de manera temporaria, en ausencia de otros alimentos (Zerbino *et al.*, 2015). Probablemente *T. pratense* es fuente de agua y nutrientes cuando las otras especies vegetales no están disponibles y no contribuye sustancialmente con las poblaciones que ingresan al cultivo de soja (Zerbino, 2014). No existe información sobre el desempeño de ninfas y adultos alimentadas con *T. repens*. En Uruguay, no se ha registrado la presencia de ninfas de *P. guildinii* en especies vegetales no leguminosas (Zerbino *et al.* 2015, Castiglioni *et al.* 2010, Ribeiro y Castiglioni 2009, Ribeiro *et al.* 2009).

*Medicago sativa* fue la especie vegetal donde la colecta de adultos y de ninfas mayores fue superior, además en este cultivo los adultos fueron interceptados durante todo el año. En las restantes leguminosas forrajeras el período de colecta y la cantidad de adultos y ninfas mayores colectados fueron considerablemente inferiores que en alfalfa. Estos resultados indican que en el Noroeste la alfalfa también es la planta huésped preferida y es el principal hospedero antes y después del cultivo de soja (Zerbino *et al.* 2015, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro y Castiglioni 2009, Panizzi y Slansky 1985b).

Del grupo de especies leñosas, *P. undulatum* y *C. salicifolia* se destacaron porque el período de colecta fue el más extenso. En el Suroeste, los adultos también se interceptaron en *P. undulatum* por un período prolongado (marzo-octubre) (Zerbino *et al.* 2015, Zerbino 2014). En la región de estudio, *Ligustrum* spp. se caracterizó por ser una de las especies donde la colecta fue exigua y el período de la misma fue breve (mayo-julio). Por el contrario, en el Suroeste el período de captura se puede extender desde marzo hasta octubre (Zerbino *et al.*, 2015). Panizzi y Grazia (2001) y Zerbino *et al.* (2015) mencionan que en esta especie *P. guildinii* fue registrada en bajo número.

En el rastrojo de soja, la colecta de adultos sólo se registró durante un mes en el otoño, lo que sugiere que este “hábitat” no es utilizado por el insecto como sitio de hibernación. Zerbino *et al.* (2015) y Panizzi y Grazia (2001) consideran que el

incremento en la abundancia de adultos que se registra en otoño en las plantas perennes es consecuencia de la dispersión desde las áreas de soja cuando se realiza la cosecha. Por el contrario, en la hojarasca debajo de los montes de *Eucalyptus* spp., la presencia del insecto fue registrada durante cuatro meses en otoño e invierno, lo que sugiere que este es un sitio de hibernación elegido por los adultos para enfrentar las condiciones adversas del ambiente. Zerbino *et al.* (2015) obtuvieron similares resultados, la colecta de adultos se registró entre abril y setiembre. Fraga y Ochoa (1972) en Argentina y Corrêa- Ferreira y Panizzi (1982) en Brasil mencionan que los adultos de *P. guildinii* en el invierno pueden ser encontrados debajo de la corteza de los árboles o de otros objetos que ofrecen protección.

A partir de los resultados obtenidos se puede inferir la secuencia de colonización de plantas y de sitios de hibernación que son utilizados por las distintas generaciones de *P. guildinii* durante un año, en el Noroeste. Después de la cosecha de soja, ninfas mayores y adultos se dispersan hacia las leguminosas forrajeras, con preferencia a la alfalfa. En la mitad del otoño; los adultos se desplazan hacia las plantas (arbóreas) perennes y en menor medida a los sitios de hibernación (donde el pico máximo de captura ocurre en agosto). En las plantas perennes y los sitios de hibernación los adultos permanecen hasta la mitad del invierno, y al final de esta estación inician los movimientos en un primer momento hacia la alfalfa y luego hacia otras leguminosas forrajeras donde se reproducen y dan origen a la generación que coloniza el cultivo de soja, cuando éste inicia la fase reproductiva. Massoni y Frana (2005) mencionan que los adultos observados en alfalfa entre el final del invierno y comienzo de la primavera son sobrevivientes de la generación del otoño.

La relación entre las plantas huéspedes o asociadas, sitios de hibernación y la colonización al cultivo de soja varía en función de la zona geográfica y el agroecosistema. En el Suroeste de nuestro país, cuando los adultos de la generación hibernante inician su reproducción en la primavera tienen preferencia por las leguminosas forrajeras, y desde éstas colonizan la soja al inicio de la fase reproductiva del cultivo (Zerbino *et al.* 2015, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro y Castiglioni 2009). En el Estado de Paraná-Brasil, las primeras tres generaciones de



*P. guildinii* se desarrollan en el cultivo de soja, mientras que la cuarta generación que tiene lugar en otoño, se alimenta y reproduce en *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Crotalaria* sp. y distintas especies del género *Indigofera*, mientras que la quinta y última generación sólo se desarrolla en estas últimas, antes de que comiencen a colonizar la soja al final de la primavera (Panizzi y Silva 2009, Panizzi 1997).

La ausencia de ninfas en las colectas desde fin de otoño hasta la mitad del invierno (junio-agosto), sugiere que durante este período en el Noroeste *P. guildinii* no se reproduce. Zerbino *et al.* (2015) reportan que en el Suroeste la ausencia de ninfas se registró entre el final del otoño y el inicio de la primavera, es decir durante un período más prolongado. La explicación de estas diferencias estaría dada por la distinta latitud en que ambos estudios fueron realizados.

#### 2.6.2. Formas estacionales

Los adultos de ambos sexos de *P. guildinii* mostraron diferencias en la morfología y fisiología según el momento del año en que se colectaron. En los interceptados entre mayo y agosto se registró menor tamaño del cuerpo, mayor contenido de lípidos y órganos reproductivos inmaduros respecto a los capturados desde setiembre hasta abril. Las hembras mostraron variación en la coloración de la banda del pronoto y conectivo, mientras que en los machos sólo se detectaron diferencias en la última característica. La mayor proporción de las hembras colectadas en otoño-invierno tuvo banda del pronoto y del conectivo con coloraciones claras. Lo mismo sucedió en los machos. Estos resultados indican la ocurrencia de formas estacionales diferentes y que durante el otoño e invierno, cuando la duración del día es igual o menor a 11 h, los adultos permanecen en diapausa reproductiva. Zerbino *et al.* (2015, 2014) determinaron los mismos cambios morfológicos y fisiológicos en hembras colectadas en el Suroeste de Uruguay. Estos autores no encontraron cambios notorios en la coloración del conectivo de los machos, probablemente debido a que el color varió entre blanco y anaranjado por lo que resulta difícil de percibir las diferencias. Estas variaciones en el color del conectivo de los machos deben ser confirmados en condiciones de laboratorio.

Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos por Zerbino *et al.* (2015), se observa que en el Suroeste más del 80 % de las hembras presentaron el ovario del tipo inmaduro durante seis meses del año, mientras que en el Noroeste esto sucedió sólo durante tres meses. En el Noroeste en ningún mes se registró 100 % de hembras con aparato reproductor inmaduro, mientras que en el Suroeste esto sucedió entre los meses de julio y setiembre. Las diferencias encontradas en ambos estudios sugieren que en el Noroeste la diapausa es más corta y menos intensa. Los machos en esta región, al igual que en el Suroeste (Zerbino *et al.*, 2015), tienen órganos reproductivos inmaduros durante un corto período de tiempo, lo que confirma que también en el Noroeste la diapausa de los machos es más corta y menos intensa que en las hembras. Zerbino *et al.*, (2015) hipotetizan que de esta forma los machos estarían fisiológicamente listos para la cópula cuando las hembras finalizan la diapausa. No obstante, estas diferencias deben ser relativizadas, dado que ambos estudios fueron realizados en distintos períodos.

## 2.7. CONCLUSIONES

Con este estudio se amplió el conocimiento para el Noroeste de Uruguay, sobre las principales plantas huéspedes y sitios de hibernación donde *P. guildinii* se encuentra durante el período en que el cultivo de soja está ausente, y se pudo inferir la sucesión de plantas huéspedes y de sitios de hibernación que son utilizados por las sucesivas generaciones. En este trabajo se reportan siete especies nuevas que coloniza *P. guildinii* en el período de ausencia del cultivo de soja en Uruguay. Los resultados obtenidos demuestran que, para la región de estudio, la alfalfa (*M. sativa*) también es la planta huésped alternativa más importante.

La ocurrencia de formas estacionales diferentes permite establecer que desde fines del otoño y durante el invierno, cuando la duración del día es igual o menor a 11 h, los adultos permanecen en estado de diapausa reproductiva con acumulación de reservas energéticas (lípidos), estructuras reproductivas inmaduras, cambios en el tamaño del cuerpo y en su coloración. La diferencia en la coloración del conectivo de los machos debe ser confirmada en condiciones de laboratorio. Este trabajo

complementa la información obtenida en el Suroeste del país. De acuerdo a los resultados obtenidos en ambas regiones se puede establecer que en las condiciones climáticas de nuestro país, *P. guildinii* pasa el invierno en estado adulto sin reproducirse.

## 2.8. BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque GS. 1993. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. *Crop Protection*, 12 (8): 627 – 630.
- Albuquerque GS. 1989. Ecologia de populações, biologia e estratégias da história de vida de *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae). Tesis de Maestría. Porto Alegre, Brasil. UFRGS. 309 p.
- Ali M, Ewiess MA. 1977. Photoperiodic and temperature effects on rate of development and diapause in the green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 84 (1–4): 256 – 264.
- Batistella MP, Dal'Col A. 2014. Pentatomids associated with blackberry. *Ciencia Agrotecnologia*, 38 (3): 256 – 261.
- Beck SD. 1980. *Insect photoperiodism*. New York: Academic Press. 387 p.
- Castiglioni E, Ribeiro A, Alzugaray R, Silva H, Ávila I, Loíacono M. 2010. Prospección de parasitoides de huevos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en el litoral oeste de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 14 (2): 22 – 25.
- Chiaradia LA. 2010. Artropodofauna associada à erva-mate em Chapecó, SC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 9 (2): 134 – 142.
- Chocorosqui VR, Panizzi AR. 2003. Photoperiodic influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63 (4): 655 – 664.

- Corrêa- Ferreira BS, Panizzi AR. 1982. Percevejos pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. Londrina: Anais II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, 2: 140 – 151.
- Costa EC, Borgoni PC, Bellomo VH. 1995. Percevejos coletados em copas de diferentes espécies florestais. Pentatomidae-1. Ciencia Florestal Santa Maria, 5 (1): 123 – 128.
- Danks HV. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. Canadá: Biological Survey of Canada (Terrestrial arthropods) Monographs series No 1. 439 p.
- Denlinger DL. 1986. Dormancy in tropical insects. Annual Review of Entomology, 31: 239 – 364.
- Ehler LE. 2000. Farmscape ecology of stink bugs in Northern California. Thomas Say Publications: Memoirs. Entomological Society of America. 59p.
- Esquivel JF. 2009. Stages of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae): improved visualization. Annals of the Entomological Society of America, 102 (2): 303 – 309.
- Fraga CP, Ochoa LH. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). Buenos Aires: IDIA-Suplemento (Revista del INTA información sobre investigación y desarrollo agropecuario), 28: 103 – 117.
- Garlet J, Roman M, Corrêa Costa E. 2010. Pentatomídeos (Hemiptera) associados a espécies nativas em Itaara, RS, Brasil. Revista Biotemas, 23 (1): 91 – 96.
- Higuchi H. 1994. Photoperiodic induction of diapause hibernation and voltinism in *Piezodorus hybneri* (Heteroptera: Pentatomidae). Applied Entomology and Zoology, 29 (4): 585 – 592.
- Hodek I. 2002. Controversial aspects of diapause development. European Journal of Entomology, 99 (2): 163 – 173.

- Hodek I, Hodková M. 1993. Role of temperature and photoperiod in diapause regulation in Czech populations of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *European Journal of Entomology*, 90 (1): 95 – 98.
- Ichimori JW, Ohtomo R, Suzuki K, Kurihara M. 1990. Specific protein related to adult diapauses in the leaf beetle *Gastrophysa atrocynaea*. *Journal of Insect Physiology*, 36 (2): 85 – 91.
- Ito K. 1985. Seasonal changes of lipid content in adult *Cletus punctiger*. *Applied Entomology and Zoology*, 20 (3): 350 – 351.
- Kiritani K. 1963. The change in reproductive system of the southern green stink bug, *Nezara viridula*, and its application to forecasting of the seasonal history. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 7 (4): 327 – 337.
- Kobayashi S, Numata H. 1995. Effects of temperature and photoperiod on the induction of diapauses and the determination of body coloration in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Zoological Science*, 12 (3): 343 – 348.
- Koštal V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapauses. *Journal of Insect Physiology*, 52 (2): 113 – 127.
- Massoni F, Frana J. 2005. Si no es en soja ¿las chinches dónde están? INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2005. Rafaela: Publicación Miscelánea, 104: 100 – 102.
- McPherson JE. 1974. Photoperiodic effects in a southern Illinois population of the *Euschistus tristigmus* complex (Hemiptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 67 (6): 943 – 952.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2016. Encuesta Agrícola “Primavera 2015”. Montevideo: MGAP. 32p.
- Mourão APM, Panizzi AR. 2002. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1978) (Hemiptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 62 (2): 231 – 238.

- Musolin DL. 2012. Surviving winter: diapause syndrome in the southern green stink bug *Nezara viridula* in the laboratory, in the field, and under climate change conditions. *Physiological Entomology*, 37 (1): 1 – 14.
- Musolin DL, Numata H. 2003. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and color change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiological Entomology*, 28 (2): 65 – 74.
- Nakamura K, Numata H. 1997. Seasonal life cycle of *Aelia fieberi* (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to the phenology of its host plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 90 (5): 625 – 630.
- Niva CC, Takeda M. 2003. Effects of photoperiod, temperature and melatonin on nymphal development, polyphenism and reproduction in *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zoological Science*, 20 (8): 963 – 970.
- Panizzi AR. 2000. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29: 1 – 12.
- Panizzi AR. 1997. Wild hosts of pentatomids: Ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42: 99 – 122.
- Panizzi AR. 1985. *Sesbania aculeata*: nova planta hospedeira de *Piezodorus guildinii* no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 20 (10): 1237 – 1238.
- Panizzi AR, Parra JRP. 2009. A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas*. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. 1107 – 1139.
- Panizzi AR, Silva FAC. 2009. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.) *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas*. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. 465 – 522.
- Panizzi AR, Grazia J. 2001. Stinks bugs (Heteroptera, Pentatomidae) and an unique host plant in the Brazilian subtropics. *Iheringia, Série Zoologia*, 90: 21 – 25.

- Panizzi AR, Cardoso SR, Oliveira EDM. 2000a<sup>1</sup>. Status of pigeonpea as an alternative host of *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), a pest of soybean. Florida Entomologist, 83 (3): 334 – 342.
- Panizzi AR, Hirose E. 1995. Seasonal body weight, lipid content, and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezara viridula* and *Euchistus heros*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 76 (3): 247 – 253.
- Panizzi AR, Slansky F. 1985b<sup>2</sup>. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in Americas. Florida Entomologist, 68 (1): 184 – 214.
- Panizzi AR, Slansky F Jr. 1985c<sup>3</sup>. New host plant record of the stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Florida. Florida Entomologist, 68 (1): 215 – 216.
- Ribeiro A, Castiglioni E. 2009. Fluctuaciones de poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en soja y alfalfa en Paysandú, Uruguay. Agrociencia Uruguay, 13(2): 32 – 36.
- Ribeiro A, Castiglioni E, Silva H, Bartaburu S. 2009. Fluctuaciones de poblaciones de pentatómidos (Hemiptera: Pentatomidae) en soja (*Glycine max*) y lotus (*Lotus corniculatus*). La Rioja: Boletín de Sanidad Vegetal- Plagas, 35: 429 – 438.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. Cary: SAS Institute. 16p.
- Saulich AKH, Musolin DL. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. Entomological Review, 92 (1): 1 – 26.
- Silva FAC, Panizzi AR. 2010. Análise morfométrica de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae) coletados em diferentes localidades

---

<sup>1</sup> Se utiliza la letra “a” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

<sup>2</sup> Se utiliza la letra “b” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

<sup>3</sup> Se utiliza la letra “c” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

- do Brasil, Argentina e Uruguai. En: Congresso Brasileiro de Entomologia. (XXIII, Natal, Brasil) Póster 266. 1CD.
- Smaniotto LF, Panizzi AR. 2015. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. *Florida Entomologist*, 98 (1): 7 – 17.
- Souza- Bunde PR, Grazia J, Mendonça MS Jr., Schwertner CF, Silva EJE, Garcia ÉN. 2010. Pentatomidade (Hemiptera: Heteroptera) of the Pampa biome: Serra do Sudeste and Parque de Espinilho da Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brazil. *Biota Neotropical*, 10 (3): 83 – 88.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. Seasonal adaptations of insects. New York: Oxford University Press. 411p.
- Zerbino MS. 2014. Adaptaciones y respuestas inducidas de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) a las variaciones del ambiente. Efecto del fotoperíodo, de la temperatura y del alimento en la biología, fisiología y fenología. Tesis de Doctorado. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 222p.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2016. Performance of nymph and adult of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cultivated legumes. *Neotropical entomology*, 45 (2): 114 – 122.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2015. Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes. *Journal of Pest Science*, 88: 495 – 505.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014. Phenological and physiological changes in adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) due to variation in photoperiod and temperature. *Florida Entomologist*, 97 (2): 734 – 743.



### 3. DISPERSIÓN DE *Piezodorus guildinii* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ENTRE CULTIVOS DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] Y DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

#### 3.1. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la dispersión de *Piezodorus guildinii* entre cultivos adyacentes de soja y alfalfa. Desde el estado R3 (inicio formación de vainas) de la soja hasta semilla completamente desarrollada (R6), se aplicó semanalmente un marcador de proteína en cada cultivo (alfalfa= caseína bovina, soja= proteína de soja) en parcelas de 1620 m<sup>2</sup>. En ambos cultivos se establecieron dos transectas separadas por 12 m, con siete puntos de muestreo cada 7,5 m. Los insectos se colectaron con red entomológica durante las 48 horas posteriores a cada aplicación. Los inmunoensayos se realizaron como ELISA indirectos. En total se colectaron 464 adultos de *P. guildinii*, 166 en soja y 298 en alfalfa. El 72,41 % fueron positivos para al menos una de las proteínas. La eficiencia de marcado fue 53,61 y 89,10 % para caseína bovina y proteína de soja, respectivamente. Se registraron movimientos unidireccionales y bidireccionales. Los movimientos unidireccionales predominantes se registraron desde la soja, lo que sugiere que un cultivo de alfalfa sin cortes durante el período reproductivo de la soja reduce la colonización del insecto en este último cultivo. La distancia de dispersión varió entre 2,5 y 47,5 m; con una media de 17,4 m. Los resultados indican que la técnica de inmunomarcado de adultos de *P. guildinii* es una herramienta útil para conocer cómo las poblaciones de este insecto usan parches adyacentes de hábitat, lo que contribuirá al diseño de estrategias de manejo de plagas a nivel del paisaje o de predio.

Palabras Clave: chinche de la alfalfa, movimiento entre cultivos, técnica de inmunomarcado

DISPERSION OF *Piezodorus guildinii* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)  
BETWEEN SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merrill] AND ALFALFA (*Medicago  
sativa* L.) FIELDS

3.2. ABSTRACT

Dispersion of *Piezodorus guildinii* between adjacent soybean and alfalfa fields was studied. From the R3 (beginning of pod formation) state of soybean to R6 (fully developed seed), a protein marker was applied weekly in each crop (alfalfa= bovine casein, soy= soy protein) in 1620 m<sup>2</sup> plots. In both cultures, two transects were established separated by 12 m with seven sampling points every 7.5 m. Bugs were collected with entomological net for 48 hours after each application. Immunoassays were performed as indirect ELISA. In total 464 adults of *P. guildinii* were collected, 166 from soybean and 298 from alfalfa, 72.4% were positive for at least one of the proteins. The marking efficiency was 53.6 and 89.1% for bovine casein and soy protein, respectively. There were unidirectional and bidirectional movements between both cultures. Predominant unidirectional movements were recorded from soybeans, suggesting that uncut alfalfa during the reproductive period of soybean reduces the colonization of the insect in this last crop. Dispersion distances varied from 2.5 to 47.5 m, with an average distance of 17.4 m. Results indicated that the immunomarking technique on *P. guildinii* adults was successful and may be used to learn how populations of these insect use adjacent patches of habitat. This will help to design landscape and farmscape pest management strategies.

Key Words: Red-banded stinkbug, movement between crops, immunomarking technique

### 3.3. INTRODUCCIÓN

El complejo de hemípteros fitófagos (Hemiptera: Pentatomidae) que coloniza el cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los grupos de insectos plagas con mayor potencial de causar pérdidas económicas (Panizzi *et al.* 2000b, Panizzi 1997). En Uruguay *Piezodorus guidinii* es la especie más abundante y la que causa los mayores daños (Depieri y Panizzi 2011, Zerbino 2010, 2009, 2007).

Este insecto, al igual que otros hemípteros fitófagos que se alimentan de semillas, coloniza distintas especies vegetales según su fenología, por lo que las prácticas de manejo enfocadas únicamente en un cultivo específico pueden tener poco efecto sobre la población general del insecto (Zerbino *et al.* 2016, Panizzi y Parra 2009, Ehler 2000, Panizzi 1997). Con el fin de desarrollar estrategias de manejo a nivel de predio o del paisaje, el conocimiento del movimiento entre distintas especies vegetales es fundamental. Recientemente en Uruguay, Zerbino *et al.* (2015) y Miguel (2017) determinaron que la alfalfa (*Medicago sativa* L.) es el principal huésped antes y después del cultivo de soja. Los autores de ambos trabajos sugieren que es la especie vegetal sobre la que habría que concentrar las tácticas de control durante la primavera, de modo de impedir el desarrollo de la población que coloniza la soja. Para ello es necesario determinar los patrones de dispersión entre ambos cultivos, el momento y la manera en que se producen los mismos (Huang 2012, Panizzi y Parra 2009, Panizzi 1997).

El estudio del movimiento de los insectos se realiza mediante el uso de técnicas de marcación (marca-liberación-recaptura; marca y captura). Los métodos de marca-liberación-recaptura (uso de etiquetas, colorantes internos o externos, polvos fluorescentes, elementos raros (trazas), radares armónicos y mutilaciones) tienen importantes limitaciones, que pueden conducir a conclusiones equivocadas sobre el comportamiento de la dispersión natural. Ellos se basan en liberar y recapturar insectos marcados en un número limitado de sitios (Pilkay 2013, Hagler y Jackson 2001, Reynolds *et al.* 1997) y en general las marcas se aplican a individuos que se desarrollan en el laboratorio (Huang y Toews 2012, Hagler y Jones 2010, Boina *et al.*

2009, Tillman *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Jackson 2001, 1998, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000, Hagler 1997, Hagler *et al.* 1992).

Las restricciones planteadas por los métodos de marca-liberación-recaptura fueron superadas por la técnica del inmunomarcado (marca y captura). Este método permite la marca de insectos directamente en el campo causando alteraciones mínimas en el movimiento natural y la dispersión en el espacio y el tiempo. Los insectos se marcan con una proteína (marcador) por contacto durante la aplicación de la misma o posteriormente con las superficies previamente marcadas. Con esta técnica es posible el uso simultáneo de distintas proteínas, lo que permite estudiar el movimiento inter o entre áreas (Blaauw *et al.* 2016, Bastola *et al.* 2014, Hagler *et al.* 2014, Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Jones *et al.* 2006, Hagler y Jackson 2001). Luego de la aplicación de los marcadores, los insectos son recolectados y analizados para la proteína específica mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Blaauw *et al.* 2016, Jones *et al.* 2006, Hagler y Jackson 1998, Hagler 1997, Hagler *et al.* 1992). Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, sensible, de bajo costo y permitir el análisis simultáneo de un importante número de muestras (Bastola *et al.* 2014, Hagler *et al.* 2014, Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Hagler y Jones 2010, Horton *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Miller 2002, Hagler y Jackson 2001). El inmunomarcado fue utilizado de manera eficiente en el estudio del movimiento de varios grupos de insectos, entre los que se incluyen diferentes especies de hemípteros fitófagos, en diversos cultivos (Blaauw *et al.* 2016, Bastola *et al.* 2014, Hagler *et al.* 2014, Sanders y Carpenter 2014, Huang 2012, Irvin *et al.* 2012, Hagler y Jones 2010, Boina *et al.* 2009, Horton *et al.* 2009, Shrestha *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006, Hagler y Miller 2002, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000, Hagler *et al.* 1992). Su uso requiere de algunas precauciones. La eficacia de los marcadores puede ser alterada por las condiciones ambientales, principalmente precipitación y viento (Hagler y Jackson, 2001). Por otra parte, en el procedimiento de colecta de los insectos es necesario evitar la contaminación cruzada entre marcadores y generar resultados falsos positivos (Sanders y Carpenter 2014, Hagler y Miller 2002).

Los estudios de ocurrencia estacional de *P. guildini* realizados en el Noroeste y Suroeste de nuestro país (Miguel 2017, Zerbino *et al.* 2015) sugieren que este insecto se dispersa entre cultivos de soja (*G. max*) y alfalfa (*M. sativa*) según la fenología de los mismos. Sin embargo, estos estudios carecen de la evidencia explícita de este movimiento. Es objetivo del presente trabajo estudiar la dispersión local entre ambos cultivos mediante la técnica de inmunomarcado.

### 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4.1. Área experimental

El experimento fue realizado en la Estación Experimental INIA- La Estanzuela, Colonia (34° 20'18'' S, 57° 41'25'' O) en 2014/15. En dos parcelas de 45 por 36 m (1620 m<sup>2</sup>) separadas por 2,5 m, en setiembre se sembró *M. sativa* (CV Chaná) y en diciembre *G. max* (CV NA5909). En ambos cultivos se realizó el manejo de fertilización y herbicidas recomendado. No se realizaron aplicaciones de insecticidas.

#### 3.4.2. Aplicación de proteínas

Durante marzo y abril de 2015 (9, 16, 22 y 29 de marzo; 7 y 15 de abril), a partir del estado de inicio de formación de vainas de la soja (R3) y hasta semilla completamente desarrollada (R6) (escala fisiológica de Fehr *et al.* 1971), se realizaron seis aplicaciones de las proteínas marcadoras. Durante el período de estudio, la alfalfa se mantuvo siempre en estado de fructificación. Para la aplicación se utilizó una pulverizadora de mochila de presión constante (CO<sub>2</sub>) con una barra de aplicación de seis boquillas (tipo abanico, con ángulo de 110°) separadas entre sí 50 cm. Las proteínas, utilizadas como antígenos, fueron leche de soja en polvo (diluida al 10 % en agua) y leche bovina en polvo (diluida al 20 % en agua) sobre los cultivos de soja y de alfalfa, respectivamente. A los efectos de evitar la contaminación cruzada entre las proteínas, la barra de aplicación y las boquillas se lavaron con agua durante tres minutos. En las seis semanas de duración de este experimento, no fueron registradas precipitaciones entre el momento de aplicación de las proteínas y la ejecución de los muestreos.

### 3.4.3. Colecta de insectos

En ambos cultivos se establecieron dos transectas, separadas por 12 metros, con 7 puntos de muestreo ubicados a 0- 7,5- 15- 22,5- 30- 37,5- 45 m, los cuales se identificaron con estacas (Figura 3.1). La colecta de insectos se realizó con red entomológica a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de las proteínas. En cada punto de muestreo se realizaron 20 redadas alrededor de la estaca. Los individuos colectados se colocaron de manera individual en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e identificados de acuerdo al cultivo, la transecta, el punto de muestreo y la fecha. Posteriormente, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar los análisis para la determinación de las proteínas.

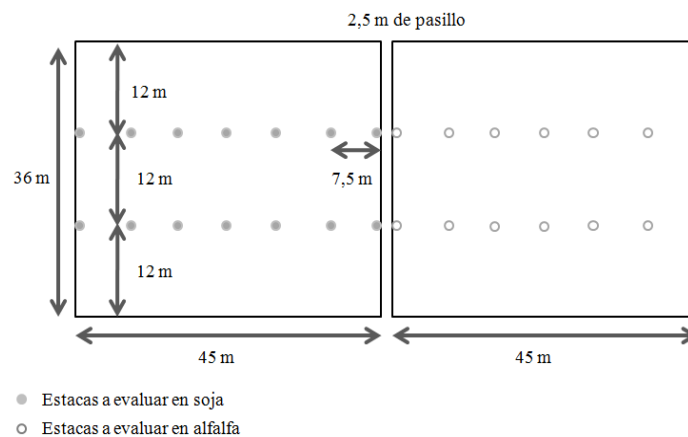


Figura 3.1. Diagrama de la instalación de parcelas de soja y alfalfa para estudiar la dispersión de *Piezodorus guildinii* entre los cultivos en diferentes distancias (m).

En cada muestreo se utilizaron dos redes entomológicas, una en cada cultivo, a efectos de evitar la contaminación cruzada entre proteínas. Finalizados los mismos, las redes entomológicas fueron lavadas tres veces con agua y jabón.

#### 3.4.4. ELISA

Los inmunoensayos se realizaron como ELISA indirectos (Crowther, 2001) según la metodología desarrollada por Jones *et al.* (2006). En la determinación del control negativo se utilizaron insectos de la colonia de cría del Laboratorio de Entomología de la Estación Experimental INIA- La Estanzuela, a los que se les agregó la solución del buffer de extracción. Para las determinaciones de blancos sólo se utilizó el buffer de extracción.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron conejo anti-soja (R45254, R-Biopharm) diluido (1:4000) en StartingBlock (37538, Pierce Biotechnology) para leche de soja y conejo anti-caseína bovina (ab166596, Abcam) diluido (1:500) en PBS + 20 % suero bovino (A9647, Sigma-Aldrich) en leche bovina. En ambos protocolos, como anticuerpo secundario se utilizó burro anti-conejo IgG (H+L) (31458, Pierce Biotechnology) diluido (1:8000) en StartingBlock.

En los tubos de microcentrífuga que contenían los insectos colectados, se agregó 1 ml de buffer de extracción [agua destilada con Tris-solución salina tamponada (TBS, pH 8,0) y 0,3 g/L de sodio etilendiamina tetra acetato (EDTA)], y se agitaron en vórtex durante un minuto. Inmediatamente en los pocillos individuales de una placa de microtitulación (96 pocillos) se dispensó una alícuota de 80 µl del sobrenadante y se incubó durante dos horas a 37° C.

En el caso de proteína de leche de soja, los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBS + 2,3 g/litro de sulfato dodecyl de sodio (SDS) (PBS-SDS), seguido por dos veces de 300 µl de PBS. A continuación, en cada pocillo se agregaron 300 µl de StartingBlock (37538, Pierce Biotechnology). Cuando el antígeno fue leche bovina, los pocillos se lavaron cinco veces con 300 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 0,09 % de Triton-X100 (PBST), y luego se añadieron 300 µl de PBS + 10% ethanolamina. En ambos casos las placas se incubaron durante una hora a 37° C.

A continuación, las placas de los dos antígenos se lavaron una vez con 300 µl de PBST por pocillo y se agregaron 80 µl del anticuerpo primario correspondiente, y se

incubaron nuevamente. En el caso de la leche de soja, la misma se realizó durante 30 minutos a 37° C, mientras que para la leche bovina se efectuó durante la noche a 4 °C. Posteriormente, los anticuerpos se descartaron y las placas se lavaron cinco veces con PBST a razón de 300 µl por pocillo. Inmediatamente después, se agregaron 80 µl de la dilución del anticuerpo secundario y durante dos horas se incubaron a 37° C. Después de descartar el anticuerpo secundario, cada pocillo de las placas se lavó tres veces con 300 µl de PBS-SDS y luego dos veces con 300 µl de PBS. Luego, se agregaron 80 µl de TMB (ImmunoPure, kit de sustrato TMB Ultra 34028, Pierce Biotechnology) a cada pocillo.

Finalizado este proceso, las placas con proteína de soja y de leche bovina se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 y 30 minutos, respectivamente. Para detener la reacción colorimétrica, posteriormente se agregaron 80 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N en cada pocillo. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió con un lector de placas de doble longitud de onda a 450 nm usando 490 nm como patrón de referencia (Termo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer). Todas las lecturas se corrigieron en función del valor del buffer de extracción (TBS + EDTA) (blanco). Cuando el valor de DO detectado fue mayor que el doble del control negativo, ese ejemplar fue considerado positivo para la proteína analizada.

#### 3.4.5. Análisis de datos

A efectos de determinar el movimiento entre los cultivos, los adultos de *P. guildinii* colectados se tipificaron en cuatro categorías de acuerdo a las marcas detectadas: (I) residentes, los marcados con la proteína aplicada en el cultivo donde fueron colectados. (II) Inmigrantes unidireccionales, aquellos que tenían una marca diferente a la proteína aplicada en el cultivo donde se colectaron. (III) Inmigrantes bidireccionales, insectos con marca de ambas proteínas, lo que indica que tuvieron movimiento entre los cultivos (ida y vuelta). (IV) Sin marca, incluye a los que la técnica no detectó marca ya sea por que fue muy débil o porque no estaban marcados.



El análisis de los valores medios de colecta de las cuatro categorías, se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, dado que son variables discretas, que tuvieron varianza heterogénea y se encontró asociación entre la media y la varianza (Infostat, 2015). La comparación de la eficiencia media de marcado (EfM) de las proteínas se realizó mediante una prueba t (Proc TTES, SAS Institute, 2008). Las aplicaciones fueron consideradas repeticiones. La EfM de una proteína aplicada es el cociente entre el número total de insectos marcados con la proteína específica aplicada en ese cultivo (tMpe) (incluye residentes, movimiento unidireccional y bidireccional), y la suma del total de insectos colectados en ese cultivo [tC (cultivo)] más los insectos inmigrantes en el otro cultivo [InMpe (otro cultivo)] (incluye inmigrantes con movimiento unidireccional y bidireccional). Por ejemplo, para la proteína aplicada en alfalfa este cálculo sería: tMleche de vaca (total de marcados con leche de vaca) / ([alfalfa (total colectado en alfalfa) + InMleche de vaca (individuos marcados con proteína de leche de vaca colectados en la soja)]. El análisis del efecto de los cultivos y de la fenología de la soja en la colecta de las cuatro categorías se realizó mediante modelos lineales generalizados (PROC Genmod, SAS Institute, versión 9.2). La separación de medias se realizó con una prueba de LSD con  $\alpha = 0,05$ .

En el estudio de la distancia de dispersión sólo se tuvo en cuenta los insectos inmigrantes con movimiento unidireccional. Se consideró que la mínima distancia recorrida fue el trayecto desde el punto cero del cultivo donde recibió la marca hasta el punto de colecta. A efectos de determinar si hubo diferencias en la distancia mínima de dispersión por efecto de la fenología de la soja, se realizó el análisis con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2). El diseño experimental fue de bloques al azar con dos repeticiones. Los valores de distancia se transformaron a logaritmo a efectos de corregir la heterogeneidad de la varianza. Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.5. RESULTADOS

Durante las seis semanas de estudio se colectaron 464 adultos de *P. guildinii*, 298 provenían de la alfalfa y 166 de la soja. El número medio de adultos colectados total, con y sin marca de las proteínas fue semejante en ambos cultivos (Cuadro 3.1). Ambos sexos estuvieron representados en proporciones similares (57,3 % fueron hembras y 42,7 % machos).

Cuadro 3.1. Número de adultos medio ( $\pm$  EEM) de *Piezodorus guildinii* colectados en cultivos de alfalfa y soja durante el período marzo- abril 2014 (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41')

	Alfalfa	Soja	N <sup>1</sup>	H <sup>2</sup>	P
Total	49,7 $\pm$ 10,8	27,7 $\pm$ 4,8	6	2,56	0,1212
Con marca	33,8 $\pm$ 8,5	22,2 $\pm$ 3,3	6	1,08	0,3312
Sin marca	15,8 $\pm$ 5,7	5,5 $\pm$ 1,8	6	2,56	0,1212

<sup>1</sup> Número de aplicaciones de proteínas

<sup>2</sup> Estadístico de Kruskal-Wallis

#### 3.5.1. Eficiencia de mercado

El 72,4 % (336) de los insectos colectados (464) tuvo al menos la marca de una proteína. Del total de marcados, 273 (148 en alfalfa y 125 en soja) y 63 (55 colectados en alfalfa y 8 en soja) insectos tuvieron una y dos marcas, respectivamente

La EfM fue mayor con proteína de soja en cinco de las seis aplicaciones realizadas (Cuadro 3.2). El valor medio registrado (89,1 %) fue significativamente diferente que el obtenido para caseína bovina (53,6 %) ( $t = -3,25$ ;  $gl\ 10$ ;  $P = 0,0088$ ).

Cuadro 3.2. Eficiencia media de marcado ( $\pm$  EEM) de adultos de *Piezodorus guildinii* para la caseína bovina y proteína de soja en las distintas semanas de aplicación de proteínas (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

Semana de aplicación	Estado fenológico de la soja	Caseína bovina		Proteína de soja	
		N	EfM (%)	N	EfM (%)
1	R3	70	22,2	12	100,0
2	R4	51	47,1	30	78,7
3	R5.1	22	64,0	39	84,4
4	R5.3	44	45,7	37	86,0
5	R5.5	89	64,4	34	76,9
6	R6	22	78,3	14	70,8
Promedio		53,6 $\pm$ 8,0 a		89,1 $\pm$ 3,2 b	

### 3.5.2. Movimiento entre cultivos

En soja y alfalfa se registraron las cuatro categorías establecidas (sin marca, residentes, inmigrantes con movimiento unidireccional y bidireccional). En ambos cultivos los residentes fueron el grupo mayoritario y los valores registrados fueron semejantes durante todo el período de estudio ( $\chi^2 = 3,49$ ;  $P = 0,0619$ ) (Cuadro 3.3). Hubo diferencias entre las aplicaciones ( $\chi^2 = 11,67$ ;  $P = 0,0396$ ). El número de adultos colectados cuando el cultivo de soja se encontraba en R5.5 (quinta aplicación), fue superior al valor obtenido en R3 y R6 (Cuadro 3.3).

El número de insectos medio con movimiento bidireccional fue significativamente superior en alfalfa ( $\chi^2 = 22,91$ ;  $P < 0,0001$ ). Estas diferencias fueron debidas a los valores registrados cuando la soja se encontraba en R5.3 y R5.5 (cuarta y quinta aplicación de proteínas; Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Número de adultos de *Piezodorus guildinii* medio ( $\pm$  EEM) de las distintas categorías colectados en cultivos de alfalfa y soja de acuerdo al estado fenológico de la soja (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

Categoría	Semana	Estado	N <sup>2</sup>	Alfalfa	Soja
	de aplicación	fenológico de la soja			
Residentes	1	R3	14	0,79 $\pm$ 0,33 a A <sup>1</sup>	0,71 $\pm$ 0,32 a A
	2	R4	14	1,29 $\pm$ 0,29 ab A	1,50 $\pm$ 0,40 ab A
	3	R5.1	14	0,79 $\pm$ 0,35 ab A	1,93 $\pm$ 0,56 ab A
	4	R5.3	14	0,71 $\pm$ 0,27 ab A	2,07 $\pm$ 0,62 ab A
	5	R5.5	14	2,14 $\pm$ 0,45 b A	1,71 $\pm$ 0,48 b A
	6	R6	14	0,64 $\pm$ 0,17 a A	0,93 $\pm$ 0,53 a A
			Promedio	6	1,06 $\pm$ 0,23 A
Inmigrantes bidireccionales (ida y vuelta entre los dos cultivos)	1	R3	14	0,21 $\pm$ 0,011 a A	0,14 $\pm$ 0,10 a A
	2	R4	14	0,43 $\pm$ 0,17 a A	0 a A
	3	R5.1	14	0,14 $\pm$ 0,10 a A	0,21 $\pm$ 0,15 a A
	4	R5.3	14	0,64 $\pm$ 0,25 a B	0,14 $\pm$ 0,14 a A
	5	R5.5	14	1,93 $\pm$ 0,55 a B	0,07 $\pm$ 0,07 a A
	6	R6	14	0,57 $\pm$ 0,25 a A	0 a A
			Promedio	6	0,66 $\pm$ 0,27 B
Inmigrantes unidireccionales (traslado de un cultivo al otro)	1	R3	14	1,00 $\pm$ 0,38 a A	0 a B
	2	R4	14	0,79 $\pm$ 0,33 a A	0 a B
	3	R5.1	14	0,29 $\pm$ 0,22 a A	0 a B
	4	R5.3	14	0,79 $\pm$ 0,33 a A	0 a B
	5	R5.5	14	1,21 $\pm$ 0,33 a A	0 a B
	6	R6	14	0,14 $\pm$ 0,09 a A	0,07 $\pm$ 0,07 a B
			Promedio	6	0,70 $\pm$ 0,17 B

<sup>1</sup> En cada categoría, Medias seguidas por la misma letra minúscula para las columnas y mayúsculas para las filas no son significativamente diferentes basado en el estadístico de máxima verosimilitud ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup> Número de muestreos.

El movimiento unidireccional sólo varió en función del cultivo ( $\chi^2 = 46,30$ ;  $P < 0,0001$ ). El movimiento predominante fue desde la soja hacia la alfalfa, sólo se registró desplazamiento desde este cultivo a la soja cuando ésta se encontraba en R6 (sexta aplicación de proteínas) (Cuadro 3.3).

### 3.5.3. Distancia

En la Figura 3.2 que se presenta la frecuencia media de colecta de adultos de *P. guildinii* con movimiento unidireccional (desde soja a alfalfa) en las diferentes distancias, se aprecia que hubo una tendencia a que la proporción de adultos colectados disminuya desde los 2,5 m hasta los 25 m y nuevamente aumente hasta los 40 m. El valor registrado a 25 m fue significativamente menor que el de las restantes distancias, con excepción de 47,5 m.

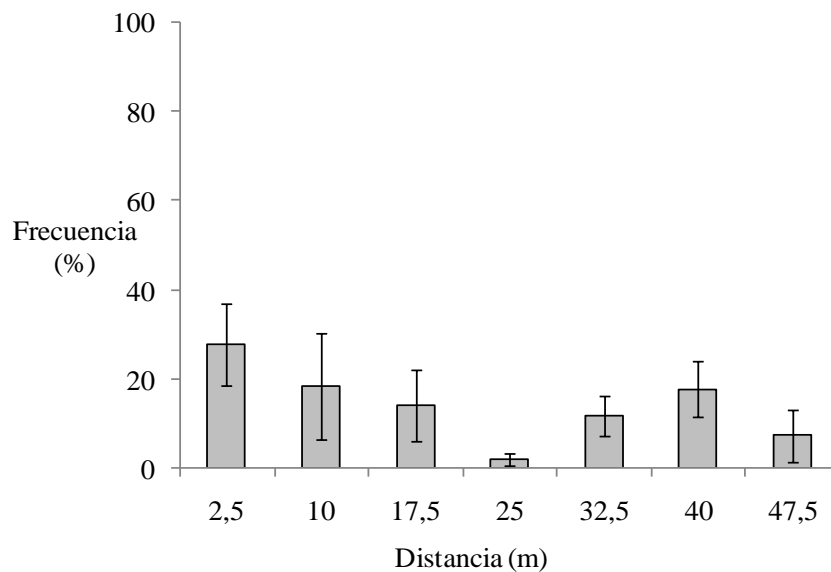


Figura 3.2. Frecuencia de colecta de adultos de *Piezodorus guildinii* con movimiento unidireccional (desde soja a alfalfa) en las diferentes distancias (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

La distancia de dispersión media fue de 17,4 metros, con un mínimo y máximo de 2,5 y 47,5 metros, respectivamente (Cuadro 3.4). Los valores registrados en las

distintas aplicaciones de proteínas fueron similares entre sí ( $F_{5,5} = 1,93$ ;  $P = 0,2435$ ). Los adultos con movimiento bidireccional recorrieron en promedio una distancia mínima de 30,71 metros.

Cuadro 3.4. Mínima distancia media de dispersión ( $\pm$  EEM) de adultos de *Piezodorus guildinii* desde la soja hacia la alfalfa en distintos estados fenológicos de la soja (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

Semana de aplicación	Estado fenológico de la soja	Total colectado	Distancia media
1	R3	14	30,9 $\pm$ 5,9 a <sup>1</sup>
2	R4	11	11,9 $\pm$ 5,6 a
3	R5.1	4	8,8 $\pm$ 8,8 a
4	R5.3	11	23,1 $\pm$ 5,6 a
5	R5.5	17	24,5 $\pm$ 2,4 a
6	R.6	5	5,0 $\pm$ 5,0 a
Promedio			17,4 $\pm$ 4,2

<sup>1</sup>Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba de Tukey-Kramer (HDS) ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.6. DISCUSIÓN

La técnica de inmunomarcado, utilizada en adultos de *P. guildinii* silvestres en cultivos de soja y alfalfa, permitió determinar los patrones de movimiento entre ambos cultivos. La dispersión de las poblaciones de hemípteros desde un hospedero a otro fue reportada previamente, aunque generalmente los movimientos fueron inferidos por las capturas temporales en diferentes cultivos (Tillman *et al.* 2009, Tillman 2006, Panizzi *et al.* 1980).

Dado que la técnica de inmunomarcado es relativamente nueva, la mayoría de los estudios de dispersión de pentatómidos utilizaron el método de marca-liberación-recaptura con poblaciones de insectos provenientes de cría en laboratorio (Blaauw *et al.* 2016, Huang 2012, Tillman *et al.* 2009, Tillman 2006, Costa y Link 1982, Panizzi *et al.* 1980). Jones *et al.* (2006) consideran que con el método de marca-liberación-

recaptura, la tasa de recaptura, en general, es muy baja y además tiene el inconveniente que la liberación de todos los individuos marcados se realiza desde un sólo sitio, por lo que se analiza el comportamiento de la dispersión de manera sesgada. En la actualidad, la técnica de inmunomarcado es el método menos sesgado y que determina con mayor precisión la circulación directa de los insectos entre las diferentes especies vegetales (Jones *et al.* 2006).

El porcentaje de individuos marcados registrado fue similar a los valores obtenidos con otros pentatómidos en otros sistemas agrícolas donde se utilizó la misma técnica. En este estudio el 58,8 % del total de los adultos capturados estuvieron marcados con una proteína y el 13,6 % con dos proteínas. Blaauw *et al.* (2016) cuando estudiaron los patrones de movimiento y distribución de *Halyomorpha halys* Stål en el cultivo de duraznero, reportan valores de 53,8 % y 9,5 %, con una y dos proteínas respectivamente. Huang (2012) en el cultivo de algodón determinó que el 57,3 % de los pentatómidos fitófagos tenía al menos una marca y el 23,6 % dos.

La EfM promedio fue superior con la proteína de soja. Si se considera que ambas proteínas marcadoras son similares, las diferencias en la arquitectura de las plantas de la soja y la alfalfa explicarían este resultado. Las hojas de soja (donde se aplicó proteína de soja) tienen un tamaño más grande que las de alfalfa (a las que se aplicó leche bovina), esto pudo permitir que los insectos se contaminaran con mayor facilidad (Boina *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006). Por el contrario, Huang (2012) determinó menores EfM en soja y algodón que en maní. Este autor, a partir de estos resultados, hipotetizó que los insectos en cultivos con hojas pequeñas y de crecimiento más prostrado se encuentran más expuestos. Las discordancias en estos resultados podrían deberse a diferencias de comportamientos de las distintas especies hemípteros fitófagos estudiados.

La técnica de marcación permitió determinar los patrones de dispersión local de adultos de *P. guildinii* entre los cultivos de soja y alfalfa. De acuerdo a los resultados obtenidos, una gran proporción permanece en el cultivo que colonizan en una primera instancia. Los adultos que se movilizan pueden realizar movimientos uni o bidireccionales. En las condiciones de manejo del experimento, donde la alfalfa

permaneció en estado de fructificación, los adultos que colonizaron este cultivo no se desplazaron hacia la soja, como era lo esperado. En base a esta información, se puede inferir que el insecto prefiere las vainas inmaduras de alfalfa a las de soja cuando tiene disponibilidad de ambos alimentos. Zerbino *et al.* (2015) establecieron que la alfalfa es la planta hospedera preferida.

La distancia de vuelo de los pentatómidos, asociado con el paisaje agrícola, es un aspecto poco estudiado a nivel mundial (Huang 2012, Ehler 2000). La mínima distancia media de dispersión de los adultos de *P. guildinii* (17,4 m) fue similar a la determinada por Huang (2012) (13,7 m). La mayor proporción de los adultos recorrió distancias menores a 17,5 m. Tillman *et al.* (2009) establece que la distancia de dispersión de los pentatómidos varía en función de la cercanía o lejanía del alimento. Si bien la mayor distancia mínima de dispersión fue de 47,5 m es importante considerar que fue el largo de la parcela, por lo que en futuros estudios sería necesario evaluar distancias mayores. Si bien los valores de mínima distancia media de dispersión registrados fueron semejantes en las seis evaluaciones realizadas, es importante destacar que los valores variaron entre  $5,0 \pm 5,0$  y  $30,94 \pm 5,94$  m. Para corregir esta variación, en futuros trabajos se debería incrementar el número de transectas.

El conocimiento de la dispersión local en un predio es un elemento esencial para entender el comportamiento del insecto y así poder desarrollar estrategias de manejo (Huang, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo son un aporte para el desarrollo de estrategias de manejo de *P. guildinii*. Es necesario confirmar si la alfalfa en las condiciones de manejo realizadas en este experimento disminuye la colonización del insecto en el cultivo de soja. Esto permitiría recomendar la siembra de una franja de alfalfa a una distancia aproximada del cultivo de soja menor a 17 m.

### 3.7. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, inéditos en el país, demostraron que la técnica de inmunomarcado es una herramienta útil para medir la distancia de dispersión y caracterizar los movimientos de *P. guildinii* en el paisaje agrícola de nuestro país. Los adultos pueden realizar movimientos uni o bidireccionales. La menor y mayor



distancia mínima de dispersión fueron 2,5 y 47,5 m, respectivamente, con una media de 17,4 m. Los movimientos desde la soja hacia la alfalfa fueron predominantes, por lo que se puede establecer que la siembra de una faja de alfalfa que permanezca en fructificación durante los estados reproductivos de la soja puede ser una táctica efectiva para disminuir la colonización del insecto en este cultivo. La técnica de inmunomarcado demostró ser sensible y sencilla, por lo que tiene potencial para ser utilizada en el estudio de otros sistemas planta-insectos.

### 3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Bastola A, Parajulee MN, Porter RP, Shrestha RB, Chen FJ, Carroll SC. 2014. Intercrop movement of convergent lady beetle *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), between adjacent cotton and alfalfa. *Insect Science*, 00: 1 – 12.
- Blaauw BR, Jones VP, Nielsen AL. 2016. Utilizing immunomarking techniques to track *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) movement and distribution within a peach orchard. San Diego y Londres: PeerJ. 17p.
- Boina DR, Meyer WL, Onagbola E.O, Stelinski LL. 2009. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology*, 38: 1250 – 1258.
- Costa EC, Link D. 1982. Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, 12 (1): 51 – 57.
- Crowther JR. 2001. *The ELISA guidebook*. Totowa: Humana Press. 421p.
- DeGrandi-Hoffman G, Hagler J. 2000. The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux*, 47: 302 – 306.

- Depieri RA, Panizzi AR. 2011. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 40: 197 – 203.
- Ehler LE. 2000. Farmscape ecology of stink bugs in Northern California. Thomas Say Publications: Memoirs. Entomological Society of America. 59p.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS. 1971. Stage of development description for soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11 (6): 929 – 931.
- Hagler JR. 1997. Field retention of a novel mark-release-recapture method. *Environmental Entomology*, 26: 1079 – 1086.
- Hagler JR, Naranjo SE, Machtley SA, Blackmer F. 2014. Development of a standardized protein immunomarking protocol for insect mark-capture dispersal research. *Journal of Applied Entomology*, 138: 772 – 782.
- Hagler JR, Jones VP. 2010. A protein-based approach to mark arthropods for mark-capture type research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135: 177 – 192.
- Hagler JR, Miller E. 2002. An alternative to conventional insect marking procedures: detection of a protein mark on pink bollworm by ELISA. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103: 1 – 9.
- Hagler JR, Jackson CG. 2001 Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology*, 46: 511 – 543.
- Hagler JR, Jackson CG. 1998. An immuno-marking technique for labeling minute parasitoids. *Environmental Entomology*, 27: 1010 – 1016.
- Hagler JR, Cohen AC, Bradley-Dunlop D, Enriquez FJ. 1992. New approach to mark insects for feeding and dispersal studies. *Environmental Entomology*, 21: 20 – 25.

- Horton DR, Jones VP, Unruh TR. 2009. Use of a new immunomarking method to assess movement by generalist predators between a cover crop and tree canopy in a pear orchard. *American Entomologist*, 55 (1): 49 – 56.
- Huang TI. 2012. Local dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in mixed agricultural landscape of the coastal plain. Tesis de Doctorado. Athens, Georgia, United States. University of Georgia. 129p.
- Huang TI, Toews MD. 2012. Feeding preference and movement of *Nezara viridula* and *Euschistus serous* (Hemiptera: Pentatomidae) on individual cotton plants. *Journal of Economic Entomology*, 105 (3): 847 – 853.
- Irvin NA, Hagker JR, Hoodle MS. 2012. Laboratory investigation of triple marking the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* with a fluorescent dye and two animal proteins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143: 1 – 12.
- Jones VP, Hagler JR, Brunner JF, Baker CC, Wilburn TD. 2006. An inexpensive immunomarking technique for studying movement patterns of naturally occurring insect populations. *Environmental Entomology*, 35(4): 827 – 836.
- Miguel L. 2017. Ocurrencia estacional de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en el Noroeste de Uruguay. En: Ocurrencia estacional y dispersión de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 90p.
- Panizzi AR. 1997. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42: 99 – 122.
- Panizzi AR, Parra JRP. 2009. A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas*. Brasilia DF: Embrapa Informação Tecnológica. 1107 – 1139.

- Panizzi AR, McPherson DG, Javahery JM, McPherson RM. 2000b<sup>4</sup>. Stink bugs (Pentatomidae). En: Schaefer CW, Panizzi AR. (Eds.). Heteroptera of Economic Importance. Boca Raton: CRC Press. 421 – 474.
- Panizzi AR, Galileo MHM, Gastal HAO, Toledo JFF, Wild DCH. 1980. Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybeans. *Environmental Entomology*, 9 (3): 293 – 297.
- Pilkay G. 2013. Ecology and Management of Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in Southeastern Farmscapes. Tesis de Doctorado. Clemson, EEUU. Clemson University. 229 pp.
- Reynolds DR, Riley JR, Armes NJ, Cooter RJ, Tucker MR. 1997. Techniques for quantifying insect migration. En: Dent DR, Walton MP (Eds.) *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*, Cambridge, CAB Int: 111 – 145.
- Sanders CJ, Carpenter S. 2014. Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of *Culicoides* biting midges. *Infection, Genetics and Evolution*, 28: 583 – 587.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. Cary: SAS Institute. 16 p.
- Shrestha RB, Parajulee MN, Carroll SC, Bastola A. 2009. Evaluation of intercrop movement of *Lygus* between cotton and roadside alfalfa. San Antonio: Beltwide Cotton Conferences. 873 – 881.
- Tillman PG. 2006. Sorghum as a trap crop for *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) in cotton. *Environmental Entomology*, 35: 771 – 783.
- Tillman PG, Northfield TD, Mizell RF, Riddle TC. 2009. Spatiotemporal patterns and dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in peanut-cotton farmscapes. *Environmental Entomology*, 38: 1038 – 1052.
- Zerbino MS. 2010. Manejo de chinches en soja. Montevideo: Revista INIA, 23: 24 – 27.

---

<sup>4</sup> Se utiliza la letra “b” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

- Zerbino MS. 2009. Avances en el control químico de chinches en soja. En: Jornada de Cultivos de Verano, 2009, Colonia. Serie Actividades de Difusión, 583: 1-8.
- Zerbino MS. 2007. Avances en el control químico de insectos en soja. En: Jornada de Cultivos de Verano. Dolores: Serie Actividades de Difusión, 505: 23 – 32.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2016. Performance of nymph and adult of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cultivated legumes. Neotropical entomology, 45 (2): 114 – 122.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2015. Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes. Journal of Pest Science, 88: 495 – 505.

## ANEXOS

Cuadro 3.4. Estadístico de Máxima Verosimilitud de los efectos cultivo (C), semana (S) e interacción (C\*S) para el número de adultos colectados de las categorías residentes e inmigrantes con movimiento unidireccional y bidireccional (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

Fuente de Variación	Gl	Residentes		Inmigrantes bidireccionales		Inmigrantes unidireccionales	
		$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
C	1	3,49	0,0619	22,91	<0,0001	46,30	<0,0001
S	5	11,67	0,0396	6,19	0,2881	1,29	0,9357
C*S	5	6,59	0,2530	15,40	0,0088	6,28	0,2800

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La información generada amplía el conocimiento sobre la bioecología de *Piezodorus guildinii* (Westwood) en Uruguay y es un aporte para el desarrollo de estrategias de manejo del insecto. Esta especie es considerada una de las plagas primarias de los sistemas de producción agrícola-pastoriles del país. Es el pentatómido fitófago más abundante en semilleros de leguminosas forrajeras (fundamentalmente alfalfa) y del cultivo de soja, en el que causa daños de magnitud (Zerbino *et al.* 2016, 2014, Zerbino 2010, 2009, 2007, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro y Castiglioni 2009, Castiglioni 2004, Ribeiro 2007, 2004, Zerbino y Alzugaray 2003). A pesar de su importancia económica a nivel nacional, el conocimiento sobre la estrategia de supervivencia y la secuencia de plantas hospederas utilizadas en algunas regiones del país era insuficiente, y el patrón de movimiento entre cultivos era desconocido.

Con los estudios realizados fue posible conocer para el Noroeste del país, la ocurrencia estacional del insecto en distintas especies vegetales y la estrategia de supervivencia cuando las condiciones ambientales son desfavorables; así como el patrón de movimiento de los adultos entre cultivos de alfalfa y soja, y se pudo establecer cuál es el huésped alternativo más importante en la historia de vida del insecto.

En el Noroeste de Uruguay (Latitud S entre 32° 01' y 33° 02'; Longitud W entre 57° 50' y 57° 24'), cuando el cultivo de soja está ausente, es posible encontrar a *P. guildinii* en al menos 15 especies vegetales y cuatro sitios de hibernación, de los que se destacan las leguminosas forrajeras (*Medicago sativa* L., *Lotus corniculatus* L.), *Pittosporum undulatum* Ventenat, *Cotoneaster salicifolia* Franch. y la hojarasca de *Eucalyptus* sp., porque son los hábitats donde el insecto es más abundante y su presencia se registra durante períodos más prolongados.

*Cotoneaster pannosus* Franch., *C. salicifolia*, *Quercus ilex* L., *Q. robur* L., *Q. suber* L., *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. y *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk. son nuevos reportes para la especie a nivel regional (Smaniotto y Panizzi 2015, Batistella y Dal'Col 2014, Zerbino 2014, Chiaradia 2010, Garlet *et al.* 2010, Souza-

Bunde *et al.* 2010, Panizzi 1985, Panizzi y Slansky 1985b, 1985c, Fraga y Ochoa 1972).

La relación entre las plantas huéspedes y asociadas, sitios de hibernación y la colonización al cultivo de soja varía en función de la zona geográfica y el agroecosistema considerado (Panizzi, 1997). A partir del conocimiento de la ocurrencia estacional es posible inferir la sucesión de plantas y de sitios de hibernación que son colonizados durante un año por las distintas generaciones de *P. guildinii* en el Noroeste. Después de la cosecha de soja, ninfas mayores y adultos se dispersan hacia las leguminosas forrajeras, fundamentalmente alfalfa. En la mitad del otoño; los adultos se desplazan hacia las plantas perennes (arbóreas) y en menor medida a los sitios de hibernación. En estos últimos, los adultos permanecen hasta la mitad del invierno, y al final de esta estación comienzan los movimientos hacia la alfalfa en un primer momento y luego hacia otras leguminosas forrajeras donde se reproducen y dan origen a la generación que coloniza el cultivo de soja cuando éste inicia la fase reproductiva. En la región de estudio las ninfas están ausentes durante tres meses (junio-agosto), mientras que en el Suroeste este período fue de cinco meses (junio-octubre) (Zerbino *et al.*, 2015).

Numerosos estudios señalan que la diapausa en estado adulto es la estrategia de supervivencia de los hemípteros cuando los factores bióticos y abióticos son desfavorables. Los insectos registran cambios en el tamaño, la forma y la coloración del cuerpo como consecuencia de las variaciones en el fotoperíodo y la temperatura (Zerbino *et al.* 2015, 2014, Musolin 2012, Niva y Takeda 2003, Musolin y Numata 2003, Chocorosqui y Panizzi 2003, Mourão y Panizzi 2002, Nakamura y Numata 1997, Kobayashi y Numata 1995, Hodek y Hodková 1993, Albuquerque 1993, 1989, Denlinger 1986, Ito 1985, Ali y Ewiess 1977, McPherson 1974). En la región de estudio desde fines del otoño y durante el invierno, cuando la duración del día es igual o menor a 11 h, los adultos permanecen en estado de diapausa con acumulación de reservas energéticas (lípidos), estructuras reproductivas inmaduras, menor tamaño del cuerpo, coloraciones claras de la banda del pronoto (hembras) y del conectivo (ambos sexos). El cambio de color observado en los machos debe ser confirmado en



condiciones de laboratorio. Este trabajo complementa la información obtenida por Zerbino *et al.* (2015) en el Suroeste del país. De acuerdo a los resultados obtenidos en ambas regiones se puede establecer que, en las condiciones climáticas de nuestro país, este insecto pasa el invierno en estado adulto sin reproducirse. A pesar de que ambos trabajos se realizaron en distinto momento, la comparación de los resultados (períodos de ausencia de ninfas, porcentaje de hembras y machos con aparato reproductor inmaduro) permite plantear la hipótesis de que la diapausa en el Noroeste es más corta y menos intensa que en el Suroeste. Es importante señalar que en este estudio, en la colecta de adultos en la alfalfa sólo se utilizó la red entomológica, mientras que Zerbino *et al.* (2015) en los muestreos realizados en invierno en esta especie vegetal necesitó utilizar el marco de hierro, porque los adultos se encontraban protegidos en el suelo y era imposible realizar la colecta con red entomológica. Esta diferencia indicaría que durante la diapausa el insecto en el Noroeste es más activo.

En el contexto del manejo de plagas, el conocimiento de la ecología del paisaje agrícola tiene como objetivo entender cómo poblaciones de insectos plaga y enemigos naturales utilizan los parches adyacentes como hábitat, y de esta manera poder idear estrategias de manejo a nivel del paisaje o de predios (Ehler, 2000). Para ello es necesario conocer, entre otras cosas, la dispersión local. Durante muchos años, hasta que se ajustó la técnica de inmunomarcado (Jones *et al.*, 2006), la dispersión de los pentatómidos fitófagos entre cultivos se dedujo por muestreos repetidos y análisis espacio-temporales (Ehler, 2000).

La dispersión local de *P. guildinii* en un paisaje agrícola mixto (soja-alfalfa) se estudió por medio de la técnica de inmunomarcado. Este método, que permite el marcado de los insectos silvestres, se caracteriza por ser sensible, económico y ecológicamente seguro (Jones *et al.*, 2006). Tiene como inconveniente que las condiciones ambientales, fundamentalmente viento y precipitaciones afecta los resultados. Las precipitaciones disminuyen la residualidad de los marcadores de proteínas en el campo (Boina *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006). En las seis semanas de duración de este experimento, no se registraron precipitaciones entre el momento de

aplicación de las proteínas y la ejecución del segundo muestreo a las 48 horas. Por lo que en este estudio no hubo interferencias ambientales en la determinación de las proteínas. La durabilidad en el campo de las proteínas utilizadas como marcadores no se analizó en este trabajo, sin embargo, ha sido reportado que los marcadores leche bovina y leche de soja podrían ser detectados hasta 30 y 20 días después de la aplicación, respectivamente (Boina *et al.*, 2009).

Es la primera vez que en nuestro país se realiza un estudio que evidencia el movimiento de este insecto. La técnica de inmunomarcado probó ser una herramienta con gran potencial de uso en estudios de movimientos de hemípteros a nivel de paisaje y de predio. Los valores de eficiencia de marcado obtenidos concuerdan con los reportados en otros estudios que consideraron otras especies vegetales y otros insectos (Blaauw *et al.* 2016, Bastola *et al.* 2014, Huang 2012, Boina *et al.* 2009, Jones *et al.* 2006). La especie vegetal demostró tener efectos en la eficiencia de marcado. Si bien esto puede ser debido a la arquitectura de las plantas, es necesario profundizar sobre este aspecto en futuros estudios.

Los adultos de *P. guildinii* entre los cultivos de soja y alfalfa tienen tres patrones de movimiento: bidireccionales, unidireccionales y aquellos que permanecen en la especie vegetal que colonizan inicialmente. Con el objetivo de determinar el movimiento de colonización hacia el cultivo de soja, durante el período de estudio no se realizaron cortes en la alfalfa, por lo que permaneció siempre en el estado de fructificación. De esta manera la variabilidad fenológica solamente estuvo dada desde el cultivo de soja. Contrariamente a lo esperado, la inmigración total fue significativamente mayor desde la soja a la alfalfa. Los adultos registraron una mínima distancia de dispersión promedio de 17,4 m. Este valor es semejante al establecido por Huang (2012) en Estados Unidos para la misma especie.

En Uruguay *P. guildinii* dispone de alimento todo el año dado que en los sistemas agrícola-pastoriles conviven las leguminosas forrajeras y el cultivo de soja (Zerbino *et al.*, 2015). El conocimiento de la ecología del paisaje de los hemípteros fitófagos es importante para comprender el rol temporal y espacial que tienen las plantas huéspedes en la historia de vida del insecto (Zerbino *et al.* 2015, Zerbino 2014,

Pilkay 2013, Huang 2012, Panizzi y Parra 2009, Panizzi y Silva 2009, Panizzi 2007, 2000, 1997, Ehler 2000). Los resultados de esta tesis y los obtenidos por Zerbino *et al.* (2016, 2015) indican que en nuestro país la alfalfa es la principal planta huésped de *P. guildinii*. En el Noroeste y Suroeste, en esta especie vegetal los adultos residen prácticamente todo el año y desarrollan poblaciones de gran magnitud (Miguel 2017, Zerbino *et al.* 2016, 2015). Las vainas inmaduras de alfalfa tienen una adecuada aptitud nutricional para el desarrollo de *P. guildinii*. Las ninfas se desarrollan y su mortalidad es menor que en otras leguminosas forrajeras, y la longevidad de los adultos y su desempeño reproductivo es similar a los que se alimentan con vainas inmaduras de soja (Zerbino *et al.*, 2016). Por lo anteriormente expuesto, la alfalfa es la especie vegetal en la cual se deben realizar los estudios que tengan por objetivo desarrollar tácticas de manejo que eviten o disminuyan la colonización de la soja.

Zerbino (2014) estableció que a efectos de reducir el daño ocasionado por *P. guildinii* en el cultivo de soja, es necesario implementar un manejo del insecto que incluya tácticas que minimicen el movimiento de los individuos entre cultivos adyacentes. Para ello es imprescindible planificar los paisajes agrícolas, de modo de evitar que especies vegetales que favorezcan el desarrollo de poblaciones importantes sean vecinas, o de lo contrario utilizar estas especies vegetales como trampa para realizar controles localizados. La información obtenida en el estudio de dispersión sugiere que cultivar una franja de alfalfa que permanezca en estado de fructificación durante el período reproductivo de la soja a una distancia menor a 17 m, minimizaría la colonización del insecto a la soja, pero es imprescindible confirmar los resultados obtenidos. Al mismo tiempo es necesario establecer si las ninfas de cuarto y quinto estadio tienen el mismo patrón de movimiento que los adultos.

#### 4.1. CONCLUSIONES

La información obtenida en esta tesis es una contribución para el desarrollo de un programa de manejo holístico, eficiente y ecológicamente compatible de *P. guildinii*.

En la región Noroeste de Uruguay, desde fines de otoño y durante el invierno, los adultos que se desplazan hacia plantas asociadas u ocupan sitios de hibernación, se encuentran en estado de diapausa, mostrando características particulares como la acumulación de reservas energéticas (lípidos), órganos reproductivos inmaduros, menor tamaño del cuerpo y coloraciones más claras del conectivo en ambos sexos y de la banda del pronoto en las hembras particularmente.

Los adultos de *P. guildinii* mostraron tres patrones de movimiento: bidireccionales, unidireccionales y los que permanecen en la especie vegetal que colonizan inicialmente. La técnica de inmunomarcado por su sensibilidad y sencillez probó ser adecuada para el estudio de los movimientos de insectos a nivel de paisaje agrícola y de predio.

Se confirmó que en nuestro país la alfalfa es la principal planta huésped del insecto, por lo que debe ser la especie vegetal en la cual habría que concentrar esfuerzos para desarrollar tácticas de control que impidan o disminuyan la colonización de la soja. La presencia de una faja de alfalfa en estado de fructificación próxima a un cultivo de soja (17 m) durante el período reproductivo del cultivo es una táctica que permitiría disminuir la colonización de los adultos de *P. guildinii* en la soja.

## 5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Albuquerque GS. 1993. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. *Crop Protection*, 12 (8): 627 – 630.
- Albuquerque GS. 1989. Ecologia de populações, biologia e estratégias da história de vida de *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae). Tesis de Maestría. Porto Alegre, Brasil. UFRGS. 309 p.
- Ali M, Ewiess MA. 1977. Photoperiodic and temperature effects on rate of development and diapause in the green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 84 (1-4): 256 – 264.
- Alzugaray R, Ribeiro A. 2000. Insectos en pasturas. En: Zerbino MS, Ribeiro AR. (Eds.). Manejo de plagas en pasturas y cultivos. INIA. La Estanzuela. Serie Técnica, 112: 13 – 30.
- Baigorri EJ, Giorda LM. 1997. El cultivo de la soja en Argentina. INTA Centro Regional Córdoba, 448 p.
- Batistella MP, Dal'Col A. 2014. Pentatomids associated with blackberry. *Ciência e Agrotecnologia*, 38 (3): 256 – 261.
- Bastola A, Parajulee MN, Porter RP, Shrestha RB, Chen FJ, Carroll SC. 2014. Intercrop movement of convergent lady beetle *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), between adjacent cotton and alfalfa. *Insect Science*, 00: 1 – 12.
- Beck SD. 1980. *Insect photoperiodism*. New York: Academic Press. 387 p.
- Belorte LC, Ramiro ZA, Faria AM. 2003. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill 1917] no município de Araçatuba, SP. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, 70 (2): 169 – 175.

- Blaauw BR, Jones VP, Nielsen AL. 2016. Utilizing immunomarking techniques to track *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) movement and distribution within a peach orchard. San Diego y Londres: PeerJ. 17p.
- Boethel DJ, Russin JS, Wier AT, Layton M B, Mink JS, Boyd ML. 2000. Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. *Journal of Economic Entomology*, 93 (3): 707 – 712.
- Boina DR, Meyer WL, Onagbola E.O, Stelinski LL. 2009. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology*, 38: 1250 – 1258.
- Bourokhovitch M, Morey CM. 1981. Aspectos sanitarios del cultivo de la soja. *Revista de la Asociación de Ingenieros Agrónomos del Uruguay*, 20: 9 – 17.
- Castiglioni E. 2004. La soja avanza sobre el paisaje y la chinche avanza sobre la soja. *Paysandú: Cangüé*, 26: 2 – 6.
- Castiglioni E, Ribeiro A, Alzugaray R, Silva H, Ávila I, Loiácono M. 2010. Prospección de parasitoides de huevos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en el litoral oeste de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 14 (2): 22 – 25.
- Chiaradia LA. 2010. Artropodofauna associada à erva-mate em Chapecó, SC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 9 (2): 134 – 142.
- Chocorosqui VR, Panizzi AR. 2003. Photoperiodic influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63 (4): 655 – 664.
- Corrêa-Ferreira BS. 2005. Susceptibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (11): 1067 – 1072.

- Corrêa-Ferreira BS, Azevedo J. 2002. Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agricultural and Forest Entomology*, 4 (2): 145 – 150.
- Corrêa- Ferreira BS, Panizzi AR. 1982. Percevejos pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. Londrina: *Annais II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja*, 2: 140 – 151.
- Corso I, Gazzoni D. 1998. Sodium Chloride: an insecticide enhancer for controlling pentatomids on soybeans. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33 (10): 1563 – 1571.
- Costa EC, Borgoni PC, Bellomo VH. 1995. Percevejos coletados em copas de diferentes espécies florestais. *Pentatomidae-1. Ciencia Florestal Santa Maria*, 5 (1): 123 – 128.
- Costa EC, Link D. 1982. Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, 12 (1): 51 – 57.
- Crowther JR. 2001. *The ELISA guidebook*. Totowa: Humana Press. 421p.
- Danks HV. 1987. *Insect dormancy: an ecological perspective*. Canadá: Biological Survey of Canada (Terrestrial arthropods) Monographs series No 1. 439 p.
- DeGrandi-Hoffman G, Hagler J. 2000. The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux*, 47: 302 – 306.
- Denlinger DL. 1986. Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology*, 31: 239 – 364.
- Depieri RA, Panizzi AR. 2011. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 40: 197 – 203.
- Ehler LE. 2000. *Farmscape ecology of stink bugs in Northern California*. Thomas Say Publications: Memoirs. Entomological Society of America. 59p.

- Esquivel JF. 2009. Stages of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae): improved visualization. *Annals of the Entomological Society of America*, 102 (2): 303 – 309.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS. 1971. Stage of development description for soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Crop Science*, 11 (6): 929 – 931.
- Fraga CP, Ochoa LH. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). Buenos Aires: IDIA-Suplemento (Revista del INTA información sobre investigación y desarrollo agropecuario), 28: 103 – 117.
- Gamundi JC, Sosa MA. 2008. Caracterización de daños de chinches en soja y criterios para la toma de decisiones de manejo. En: Trumper EV, Edelstein JD. (Eds.). *Chinches fitófagas en soja. Revisión y avances en el estudio de su ecología y manejo*. Manfredi: Ediciones INTA. 129 – 148.
- Garlet J, Roman M, Corrêa Costa E. 2010. Pentatomídeos (Hemiptera) asociados a espécies nativas em Itaara, RS, Brasil. *Revista Biotemas*, 23: 91 – 96.
- Gazzoni DL. 2012. Perspectivas do manejo de pragas. En: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Eds.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Brasília DF: Embrapa. 791 – 829.
- Giese RL, Peart RM, Huber RT. 1975. Pest management: a pilot project exemplifies new ways of dealing with important agricultural pests. *Science*, 187: 1045 – 1052
- Grazia J, Vecchio MCD, Balestieri FMP, Ramiro ZA. 1980. Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: I. *Euchistus heros* (Fabricius, 1798) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837). *Anais de Sociedade Entomológica do Brasil*, 9 (1): 39 – 51.
- Hagler JR. 1997. Field retention of a novel mark-release-recapture method. *Environmental Entomology*, 26: 1079 – 1086.



- Hagler JR, Naranjo SE, Machtley SA, Blackmer F. 2014. Development of a standardized protein immunomarking protocol for insect mark–capture dispersal research. *Journal of Applied Entomology*, 138: 772 – 782.
- Hagler JR, Jones VP. 2010. A protein-based approach to mark arthropods for mark–capture type research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135: 177 – 192
- Hagler JR, Miller E. 2002. An alternative to conventional insect marking procedures: detection of a protein mark on pink bollworm by ELISA. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 1 – 9.
- Hagler JR, Jackson CG. 2001 Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology*, 46: 511 – 543.
- Hagler JR, Jackson CG. 1998. An immuno-marking technique for labeling minute parasitoids. *Environmental Entomology*, 27: 1010 – 1016.
- Hagler JR, Cohen AC, Bradley-Dunlop D, Enriquez FJ. 1992. New approach to mark insects for feeding and dispersal studies. *Environmental Entomology*, 21: 20 – 25.
- Higuchi H. 1994. Photoperiodic induction of diapause hibernation and voltinism in *Piezodorus hybneri* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*, 29 (4): 585 – 592.
- Hodek I. 2002. Controversial aspects of diapauses development. *European Journal of Entomology*, 99 (2): 163 – 173.
- Hodek I, Hodková M. 1993. Role of temperature and photoperiod in diapause regulation in Czech populations of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *European Journal of Entomology*, 90 (1): 95 – 98.
- Horton DR, Jones VP, Unruh TR. 2009. Use of a new immunomarking method to assess movement by generalist predators between a cover crop and tree canopy in a pear orchard. *American Entomologist*, 55 (1): 49 – 56.

- Huang TI. 2012. Local dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in mixed agricultural landscape of the coastal plain. Tesis de Doctorado. Athens, Georgia, United States. University of Georgia. 129p.
- Huang TI, Toews MD. 2012. Feeding preference and movement of *Nezara viridula* and *Euschistus serous* (Hemiptera: Pentatomidae) on individual cotton plants. *Journal of Economic Entomology*, 105 (3): 847 – 853.
- Iannone N. 2005. Chinchas en soja: niveles de decisión para su control según especies y estados del cultivo [en línea]. 18 ene. 2005. Disponible en <http://www.elsitioagricola.com/plagas/intapergamino/20050118ChinchasSoja.asp> Tomado de: Ribeiro A. 2007. Fluctuaciones de poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) y caracterización de sus enemigos naturales en soja y alfalfa. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 64p.
- Ichimori JW, Ohtomo R, Suzuki K, Kurihara M. 1990. Specific protein related to adult diapauses in the leaf beetle *Gastrophysa atrocynaea*. *Journal of Insect Physiology*, 36 (2): 85 – 91.
- Irvin NA, Hagler JR, Hoodle MS. 2012. Laboratory investigation of triple marking the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* with a fluorescent dye and two animal proteins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143: 1 – 12.
- Ito K. 1985. Seasonal changes of lipid content in adult *Cletus punctiger*. *Applied Entomology and Zoology*, 20 (3): 350 – 351.
- Jones VP, Hagler JR, Brunner JF, Baker CC, Wilburn TD. 2006. An inexpensive immunomarking technique for studying movement patterns of naturally occurring insect populations. *Environmental Entomology*, 35(4): 827 – 836.
- Kamminga KL, Davis JA, Stock SP, Richter AR. 2012. First report of a mermithid nematode infecting *Piezodorus guildinii* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) in the United States. *Florida Entomologist*, 95 (1): 214 – 217.

- Kiritani K. 1963. The change in reproductive system of the southern green stink bug, *Nezara viridula*, and its application to forecasting of the seasonal history. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 7 (4): 327 – 337.
- Kobayashi S, Numata H. 1995. Effects of temperature and photoperiod on the induction of diapauses and the determination of body coloration in the bean bug, *Riptortus clavatus*. Zoological Science, 12 (3): 343 – 348.
- Koštal V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapauses. Journal of Insect Physiology, 52 (2): 113 – 127.
- Kuss-Roggia RCR. 2009. Distribuição espacial e temporal de percevejos da soja e comportamento de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Heteroptera: Pentatomidae) na soja (*Glycine max*) (L.) Merrill) ao longo do dia. Tesis de Doctorado. Santa Maria, Brasil. Universidade Federal de Santa Maria, 130p.
- Massoni F, Frana J. 2007. Ciclo biológico de la chinche de la alfalfa (*Piezodorus guildinii*) en el cultivo de soja. Campañas 2004/05, 2005/06 y 2006/07. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea, 108: 153 – 161.
- Massoni F, Frana J. 2005. Si no es en soja ¿las chinches dónde están? INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2005. Rafaela: Publicación Miscelánea, 104: 100 – 102.
- McPherson JE. 1974. Photoperiodic effects in a southern Illinois population of the *Euschistus tristigmus* complex (Hemiptera: Pentatomidae). Annals of the Entomological Society of America, 67 (6): 943 – 952.
- Medrano EG, Esquivel JF, Bell AA. 2007. Transmission of cotton seed and boll rotting bacteria by the southern green stink bug (*Nezara viridula* L.). Journal of Applied Microbiology, 103: 436 – 444.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2016. Encuesta Agrícola “Primavera 2015”. Montevideo: MGAP. 32p.

- Miguel L. 2017. Ocurrencia estacional de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en el Noroeste de Uruguay. En: Ocurrencia estacional y dispersión de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 90p.
- Mourão APM, Panizzi AR. 2002. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1978) (Hemiptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 62 (2): 231 – 238.
- Musolin DL. 2012. Surviving winter: diapause syndrome in the southern green stink bug *Nezara viridula* in the laboratory, in the field, and under climate change conditions. *Physiological Entomology*, 37 (1): 1 – 14.
- Musolin DL, Numata H. 2003. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and color change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiological Entomology*, 28 (2): 65 – 74.
- Nakamura K, Numata H. 1997. Seasonal life cycle of *Aelia fieberii* (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to the phenology of its host plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 90 (5): 625 – 630.
- Niva CC, Takeda M. 2003. Effects of photoperiod, temperature and melatonin on nymphal development, polyphenism and reproduction in *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zoological Science*, 20 (8): 963 – 970.
- Panizzi AR. 2013. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, 42 (2): 119 – 127.
- Panizzi AR. 2007. Nutritional ecology of plant feeding arthropods and IPM. En: Kogan M, Jepson P. (Eds.). *Perspectives in ecological theory and pest management*. London: Cambridge University Press. 170 – 222.
- Panizzi AR. 2000. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29 (1): 1 – 12.

- Panizzi AR. 1997. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42: 99 – 122.
- Panizzi AR. 1992. Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of Indigofera legumes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63 (3): 221 – 228.
- Panizzi AR. 1987. Impacto de leguminosas na biologia de ninfas e efeito da troca de alimento no desempenho de adultos de *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira Biologia*, 47 (4): 585 – 591.
- Panizzi AR. 1985. *Sesbania aculeata*: nova planta hospedeira de *Piezodorus guildinii* no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 20 (10): 1237 – 1238.
- Panizzi AR, Parra JRP. 2012. Introduction to Insect Bioecology and nutrition for integrated pest management (IPM). En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.). *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. Boca Raton: CRC Press. 3 – 11.
- Panizzi AR, Bueno AF, Silva FAC. 2012. Insetos que atacam vagens e grãos. En: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Eds.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Brasília DF: Embrapa. 335 – 420.
- Panizzi AR, Parra JRP. 2009. A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas*. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. 1107 – 1139.
- Panizzi AR, Silva FAC. 2009. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). En: Panizzi AR, Parra JRP. (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas*. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. 465 - 522.
- Panizzi AR, Cardoso SR, Chocorosqui VR. 2002. Nymph and adult performance of the small green stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood) on lanceleaf crotolaria and soybean. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (1): 53 – 58.

- Panizzi AR, Grazia J. 2001. Stinks bugs (Heteroptera, Pentatomidae) and an unique host plant in the Brazilian subtropics. *Iheringia, Série Zoologia*, 90: 21 – 25.
- Panizzi AR, Cardoso SR, Oliveira EDM. 2000a. Status of pigeonpea as an alternative host of *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), a pest of soybean. *Florida Entomologist*, 83 (3): 334 – 342.
- Panizzi AR, McPherson DG, Javahery JM, McPherson RM. 2000b. Stink bugs (Pentatomidae). En: Schaefer CW, Panizzi AR. (Eds.). *Heteroptera of Economic Importance*. Boca Raton: CRC Press. 421 – 474.
- Panizzi AR, Corrêa-Ferreira BS. 1997. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends in Entomology*, 1: 72 – 88.
- Panizzi AR, Hirose E. 1995. Seasonal body weight, lipid content, and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezara viridula* and *Euchistus heros*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76 (3): 247 – 253.
- Panizzi AR, Slansky F Jr. 1985a. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 14 (3): 237 – 242.
- Panizzi AR, Slansky F Jr. 1985b. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomologist*, 68 (1): 184 – 214.
- Panizzi AR, Slansky F Jr. 1985c. New host plant record for the stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 68(1): 215 – 216.
- Panizzi AR, Galileo MHM, Gastal HAO, Toledo JFF, Wild DCH. 1980. Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybeans. *Environmental Entomology*, 9 (3): 293 – 297.

- Panizzi AR, Smith JG. 1977. Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex-ratio, and longevity. *Annals of the Entomological Society of America*, 70 (1): 35 – 39.
- Pilkay G. 2013. Ecology and Management of Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in Southeastern Farmscapes. Tesis de Doctorado. Clemson, EEUU. Clemson University. 229 pp.
- Reynolds DR, Riley JR, Armes NJ, Cooter RJ, Tucker MR. 1997. Techniques for quantifying insect migration. En: Dent DR, Walton MP (Eds.) *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*, Cambridge, CAB Int: 111 – 145.
- Ribeiro A. 2007. Fluctuaciones de poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) y caracterización de sus enemigos naturales en soja y alfalfa. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 64p.
- Ribeiro A. 2004. Características de las poblaciones de insectos en los sistemas agrícolas- pastoriles. *Paysandú: Cangüé*, 26: 11 – 14.
- Ribeiro A, Castiglioni E. 2009. Fluctuaciones de poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) en soja y alfalfa en Paysandú, Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 23 (2): 32 – 36.
- Ribeiro A, Castiglioni E, Silva H, Bartaburu S. 2009. Fluctuaciones poblacionales de pentatómidos (Hemiptera: Pentatomidae) en soja (*Glycine max*) y lotus (*Lotus corniculatus*). *La Rioja: Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 35: 429 – 438.
- Russin JS, Orr DB, Layton MB, Boethel DJ. 1988. Incidence of microorganisms in soybean seeds damaged by stink bug feeding. *Phytopathology*, 78 (3): 306 – 310.
- Saluso A, Ermácora O, Anglada M, Toledo C, Borguesan C. 2007. Principales invertebrados plagas de la soja y técnicas utilizadas en la toma de decisiones (Campaña agrícola 2006-2007). *Revista Científica Agropecuaria*, 11: 153 – 158.

- Sanders CJ, Carpenter S. 2014. Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of *Culicoides* biting midges. *Infection, Genetics and Evolution*, 28: 583 – 587.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. Cary: SAS Institute. 16p.
- Saulich AKH, Musolin DL. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomological Review*, 92 (1): 1 – 26.
- Serra GV, La Porta NC. 2001. Aspectos biológicos y reproductivos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pentatomidae) en condiciones de laboratorio. *Agriscientia*, 23: 51 – 57.
- Shrestha RB, Parajulee MN, Carroll SC, Bastola A. 2009. Evaluation of intercrop movement of *Lygus* between cotton and roadside alfalfa. San Antonio: Beltwide Cotton Conferences. 873 – 881.
- Silva FAC, Panizzi AR. 2010. Análise morfométrica de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae) coletados em diferentes localidades do Brasil, Argentina e Uruguai. En: Congresso Brasileiro de Entomologia. (XXIII, Natal, Brasil) Póster 266. 1CD.
- Smaniotta LS, Panizzi AR. 2015. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. *Florida Entomologist*, 98 (1): 7 – 17.
- Sosa MA, Gamundi JC. 2007. Caracterización de daños de chinches en soja y criterios para la toma de decisiones de manejo. En: Trumper EV, Edelstein JD (Eds.). *Chinches fitófagas en soja. Revisión y avances en el estudio de su ecología y manejo*. Manfredi, Ediciones INTA. 1 – 19.
- Sosa-Gómez DR, Moscardi F. 1995. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 24 (2): 401 – 404.



- Souza-Bunde PR, Grazia J, Mendonça MS Jr., Schwertner CF, Silva EJE, Garcia ÉN. 2010. Pentatomidade (Hemiptera: Heteroptera) of the Pampa biome: Serra do Sudeste and Parque de Espinilho da Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brazil. *Biota Neotropical*, 10 (3): 83 – 88.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. Seasonal adaptations of insects. New York: Oxford University Press. 411p.
- Tillman PG. 2006. Sorghum as a trap crop for *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) in cotton. *Environmental Entomology*, 35: 771 – 783.
- Tillman PG, Northfield TD, Mizell RF, Riddle TC. 2009. Spatiotemporal patterns and dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in peanut-cotton farmscapes. *Environmental Entomology*, 38: 1038 – 1052.
- Tindall KV, Fothergill K. 2011. First Records of *Piezodorus guildinii* in Missouri. *Southwestern Entomologist*, 36 (2): 203 – 205.
- Todd JW, Herzog DC. 1980. Sampling phytophagous Pentatomidae in soybean. En: Kogan M, Herzog DC (Eds.). *Sampling methods in soybean Entomology*. New Cork: Springer Verlag. 438 – 478.
- Villas Bõas GL, Gazzoni DL, de Oliveira MC, Pereira da Costa N, Roessing AC, de Barros França Neto J, Assis Henning A. 1990. Efeito de diferentes populações de percevejos sobre o rendimento e seus componentes, características agronômicas e qualidade de semente de soja. Londrina. EMBRAPA - CNPSo. 43p.
- Villas Bõas GL, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Corso IC, Panizzi AR. 1985. Indicações do manejo de pragas para percevejos. Londrina EMBRAPA-CNPSo, Doc. 9. 15p.
- Zerbino MS. 2014. Adaptaciones y respuestas inducidas de de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) a las variaciones del ambiente. Efecto del fotoperíodo, de la temperatura y del alimento en la biología, fisiología y fenología. Tesis de Doctorado. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 222p.

- Zerbino MS. 2010. Manejo de chinches en soja. Montevideo: Revista INIA, 23: 24 – 27.
- Zerbino MS. 2009. Avances en el control químico de chinches en soja. En: Jornada de Cultivos de Verano, 2009, Colonia. Serie Actividades de Difusión, 583: 1-8.
- Zerbino MS. 2007. Avances en el control químico de insectos en soja. En: Jornada de Cultivos de Verano. Dolores: Serie Actividades de Difusión, 505: 23 – 32.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2016. Performance of nymph and adult of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cultivated legumes. Neotropical entomology, 45 (2): 114 – 122.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2015. Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes. Journal of Pest Science, 88: 495 – 505.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014. Phenological and physiological changes in adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) due to variation in photoperiod and temperature. Florida Entomologist, 97 (2): 734 – 743.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2013. Effect of photoperiod and temperature on nymphal development and adult reproduction of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). Florida Entomologist, 96 (2): 572 – 582.
- Zerbino MS, Alzugaray R. 2003. *Piezodorus guildinii* (Westwood). En: Bentancourt CM, Scatoni IB. (Eds.) Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. CD-Rom, Versión 1,2 para Windows. Montevideo, Facultad de Agronomía.

## 6. ANEXOS

Cuadro 6.1. Plantas cultivadas y no cultivadas asociadas con *Piezodorus guildinii* (Westwood) en el Neotrópico. Los números entre paréntesis indican referencias bibliográficas al final de la tabla.

Plantas (Familia/Especies)	Planta huésped	Registro incidental	Bibliografía
<b>Amaranthaceae</b>			
<i>Hebanthe eriantha</i> (Poir.) Pederson		x	(2)
<b>Anacardiaceae</b>			
<i>Lithraea molleoides</i> (Vell.) Engl.		x	(1)
<b>Apiaceae</b>			
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.		x	(2)
<b>Aquifoliaceae</b>			
<i>Illex paraguariensis</i> A.St.-Hil.		x	(5)
<b>Asteraceae</b>			
<i>Bidens pilosa</i> L.		x	(2)
<i>Gochnatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera		x	(6)
<i>Helianthus annuus</i> L.		x	(2)
<b>Bignoniaceae</b>			
<i>Adenocalymma comosum</i> (Cham.) DC.		x	(2)
<i>Catalpa bignonioides</i> Walter		x	(4)
<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers		x	(2)
<b>Brassicaceae</b>			
<i>Brassica napus</i> L.		x	(2)
<i>Raphanus sativus</i> L.		x	(2)
<b>Cactaceae</b>			
<i>Peireskia aculeata</i> Mill.		x	(2)
<b>Cucurbitaceae</b>			
<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.		x	(2)
<b>Euphorbiaceae</b>			
<i>Ricinus communis</i> L.		x	(2)

Plantas (Familia/Especies)	Planta huésped	Registro incidental	Bibliografía
<b>Fabaceae</b>			
<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.	x		(4)
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	x		(2)
<i>Crotalaria brevidens</i> Benth.	x		(10)
<i>Crotalaria lanceolata</i> E. Mey.	x		(2)
<i>Crotalaria pallida</i> Aiton	x		(10)
<i>Desmodium intortum</i> Mill. Urb		x	(2)
<i>Desmodium uncinatum</i> Jacq. DC.		x	(2)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	x		(1, 2, 4)
<i>Indigofera hirsuta</i> L.	x		(2)
<i>Indigofera endecaphylla</i> Jacq.	x		(2)
<i>Indigofera suffruticosa</i> Philip Miller	x		(2)
<i>Indigofera truxillensis</i> Kunth	x		(2)
<i>Lablab purpureus</i> L. (Sweet)	x		(11)
<i>Lens culinaris</i> Medikus	x		(2)
<i>Lotononis bainesii</i> Baker	x		(2)
<i>Lotus corniculatus</i> L.	x		(1, 2, 4)
<i>Lupinus albus</i> L.	x		(2)
<i>Lupinus angustifolius</i> L.	x		(2)
<i>Lupinus luteus</i> L.	x		(2)
<i>Medicago polymorpha</i> L.	x		(2)
<i>Medicago sativa</i> L.	x		(1, 2, 4)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	x		(2)
<i>Pisum sativum</i> L.	x		(2)
<i>Sesbania aculeata</i> (Willd.) Pers.	x		(8)
<i>Trifolium pratense</i> L.	x		(1, 2, 4)
<i>Trifolium repens</i> L.	x		(1, 2, 4)
<i>Vicia</i> sp.	x		(2)
<i>Vicia sativa</i> L.	x		(2)
<i>Vigna unguiculada</i> (L.) Walp.	x		(11)

Plantas (Familia/Especies)	Planta huésped	Registro incidental	Bibliografía
<b>Fagaceae</b>			
<i>Quercus ilex</i> L.		x	(1)
<i>Quercus robur</i> L.		x	(1)
<i>Quercus suber</i> L.		x	(1)
<b>Lauraceae</b>			
<i>Nectandria</i> sp.		x	(2)
<b>Linaceae</b>			
<i>Linum usitatissimum</i> L.		x	(2)
<b>Malvaceae</b>			
<i>Gossypium hirsutum</i> L.		x	(2)
<b>Melastomataceae</b>			
<i>Micanea cinerascens</i> Miq.		x	(6)
<b>Myrtaceae</b>			
<i>Eucalyptus</i> sp.		x	(1, 4)
<i>Eugenia uniflora</i> L.		x	(1, 2, 4, 6)
<i>Eugenia pungens</i> O. Berg		x	(4)
<i>Myrciaria tenella</i> (D. C.) O. Berg		x	(2)
<i>Psidium</i> sp. L.		x	(4)
<b>Nyctaginaceae</b>			
<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy		x	(2)
<b>Oleaceae</b>			
<i>Ligustrum lucidum</i> Ait.		x	(2, 4)
<i>Ligustrum</i> sp.		x	(1)
<b>Phytolaccaceae</b>			
<i>Phytolacca dioica</i> L.		x	(2)
<b>Pittosporaceae</b>			
<i>Pittosporum undulatum</i> Vent.		x	(1, 4)
<b>Poaceae</b>			
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.		x	(1, 4)
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.		x	(4)

Plantas (Familia/Especies)	Planta huésped	Registro incidental	Bibliografía
<b>Poaceae Cont.</b>			
<i>Phylllostachys</i> sp.		x	(1, 4)
<i>Sorghum bicolor</i> L. (Moench)		x	(4)
<i>Zea mays</i> L.		x	(4)
<b>Proteaceae</b>			
<i>Grevillea robusta</i> A. Cunn		x	(4)
<b>Rosaceae</b>			
<i>Cotoneaster lacteus</i> Franch.		x	(4)
<i>Cotoneaster pannosus</i> Franch.		x	(1)
<i>Cotoneaster salicifolia</i> Franch.		x	(1)
<i>Fragaria ananassa</i> Duch.		x	(2)
<i>Rubus</i> sp.		x	(3)
<b>Rubiaceae</b>			
<i>Coffea arabica</i> L. (1)		x	(9)
<b>Sapindaceae</b>			
<i>Serjania fuscifolia</i> Radlk.		x	(2)
<b>Solanaceae</b>			
<i>Solanum mauritianum</i> Scop.		x	(6)
<i>Solanum viarum</i> Dunal		x	(7)
<b>Sapotaceae</b>			
<i>Pouteria salicifolia</i> Spreng. (Radlk.)		x	(1)
<b>Violaceae</b>			
<i>Anchietea salutarens</i> A. St. Hil.		x	(2)
<i>Hybanthus atropurpureus</i> A. St. Hill.		x	(2)

(1) Miguel 2017, (2) Smamiotto y Panizzi 2015, (3) Batistela y Dal'Col 2014, (4) Zerbino 2014, (5) Chiaradia 2010, (6) Garlet *et al.* 2010, (7) Souza-Bunde *et al.* 2010, (8) Panizzi 1985, (9) Panizzi y Slansky 1985b, (10) Panizzi y Slansky 1985 c, (11) Fraga y Ochoa 1972