

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA Cry1A(c) EN EL TRACTO DIGESTIVO DE  
*Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) ALIMENTADOS CON  
VAINAS DE SOJA BT**

**por**

**Giulliana DE SOUZA ALMIRÓN  
Luciano Daniel IRIGOYEN JUARÉZ**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2019**

Tesis aprobada por:

Director:

.....  
Ing. Agr. Horacio Silva

.....  
Ing. Agr. Silvana Abbate

.....  
Ing. Agr. Adela Ribeiro

Fecha: 6 de mayo de 2019

Autores:

.....  
Giulliana De Souza Almirón

.....  
Luciano Daniel Irigoyen Juárez

## AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría mostrar agradecimiento a nuestros padres por el apoyo incondicional a lo largo de la carrera y a todas las personas que, de una u otra forma nos han ayudado para la realización de este trabajo.

A nuestros tutores la Ing. Agr. Silvana Abbate y el Ing. Agr. Horacio Silva por su dedicación de tiempo, su apoyo, motivación y ayuda permanente.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancur por sus aportes al procesamiento estadístico.

A la Ing. Agr. Agustina Armand Pilon por la ayuda brindada en el laboratorio de entomología.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	2
2.1. SOJA DESDE UNA PERSPECTIVA GLOBAL, REGIONAL Y LOCAL.....	2
2.2. SOJA TRANSGÉNICA BT PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA.....	2
2.2.1. <u>Superficie y evolución de la soja Bt en Uruguay</u> .....	2
2.2.2. <u>Espectro de acción de la proteína Cry1A(c)</u> .....	3
2.2.3. <u>Modo de acción de la proteína Cry1A(c)</u> .....	3
2.2.4. <u>Posible impacto de Cry1A(c) en organismos no objetivo</u> .....	4
2.3. <u>PIEZODORUS GUILDINII (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)</u> .....	4
2.3.1. <u>Daños e importancia económica de <i>Piezodorus guildinii</i></u> .....	5
2.3.2. <u>Descripción del aparato digestivo de los hemípteros</u> .....	6
2.3.3. <u>Anatomía externa de <i>Piezodorus guildinii</i></u> .....	7
2.3.4. <u>Posible impacto de Cry1A(c) sobre hemípteros</u> .....	8
2.4. HIPÓTESIS.....	10
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	11
3.1. OBTENCIÓN DE INDIVIDUOS EXPERIMENTALES DE <i>Piezodorus guildinii</i> .....	11
3.2. OBTENCIÓN DE LAS VAINAS BT Y NO BT PARA LA ALIMENTACIÓN DE <i>Piezodorus guildinii</i> .....	11
3.3. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO PARA LA DETECCIÓN DE Cry1A(c) EN <i>Piezodorus guildinii</i> .....	12
3.4. DETECCIÓN DE LA PROTEINA Cry1A(c).....	14
3.5. DISECCIÓN DE ADULTOS DE <i>Piezodorus guildinii</i> .....	12

3.6.MÉTODO ESTADÍSTICO.....	16
3.6.1. <u>Variables evaluadas</u> .....	16
3.6.2. <u>Intervalo de confianza para la verdadera proporción por el método de Wilson Score</u> .....	16
4. <u>RESULTADOS</u> .....	17
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	19
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	23
7. <u>RESUMEN</u> .....	24
8. <u>SUMMARY</u> .....	25
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	26
10. <u>ANEXOS</u> .....	35

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Muestras por repetición para cada una de las variables evaluadas .....	13
2. Detección de la proteína Cry1A(c) en los tejidos del cuerpo, heces y posturas, y cálculo del intervalo de confianza para la verdadera proporción por el método de Wilson Score para los individuos alimentados con vainas Bt .....	18

### Figura No.

1. Anatomía interna de pentatómido ( <i>Graphosoma lineatum</i> ) .....	7
2. Anatomía externa de <i>P. guildinii</i> .....	8
3. Recipientes individualizados con su respectivo adulto de <i>P. guildinii</i> .....	12
4. Pasos a seguir en la disección de adultos de <i>P. guildinii</i> .....	14
5. Resultados de la detección de la presencia de proteína Cry1A(c) en el aparato digestivo de <i>P. guildinii</i> en el tratamiento bt y no bt .....	17

## 1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, la superficie sembrada con el cultivo de soja (*Glycine max*) (L.) Merrill ha evolucionado de forma creciente y de manera casi constante a lo largo de los últimos 20 años, pasando de 10.000 ha en la zafra 1998/1999 a un máximo de 1.334.000 ha en 2014/2015, sin presentar grandes variaciones a partir de la zafra 2015/2016 en 1.140.000 ha (MGAP. DIEA, 2017).

En 2012 se aprobó la siembra de variedades de soja Bt (MGAP, 2019b) que codifican la endoproteína Cry1A(c) específica para el control de lepidópteros plaga. Ante el incremento de la adopción de esta tecnología en el país, se abre la interrogante del posible impacto sobre organismos no objetivo presentes frecuentemente en el cultivo de soja, como el complejo de chinches fitófagas.

Diferentes especies conforman el complejo de chinches fitófagas (Hemiptera: Pentatomidae), entre las cuales *Piezodorus guildinii* (chinche pequeña de la soja o chinche verde pequeña) es considerada la principal especie plaga del cultivo de soja en Uruguay, en virtud de su frecuencia y su alta capacidad de daño (Bentancourt y Scatoni, 2009b).

El objetivo general fue evaluar la posible transferencia de Cry1A(c) a través del proceso de alimentación de *P. guildinii*, con el fin de contribuir a un manejo sustentable de plagas en soja

El objetivo específico fue detectar en adultos de *P. guildinii* alimentados con soja Bt en condiciones controladas, la presencia de la proteína Cry1A(c) en: tracto digestivo, cuerpo (luego de extraerle extremidades, cabeza y aparato digestivo), heces y en posturas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. SOJA DESDE UNA PERSPECTIVA GLOBAL, REGIONAL Y LOCAL

La producción de granos de soja en el mundo ha crecido notablemente en las últimas dos décadas, con un incremento del 109%, y pasando de 160 millones de toneladas en 1998 a 334 millones de toneladas en 2016 (FAO, 2017). Este fenómeno se relaciona con la demanda creciente de los países en desarrollo por el consumo de carnes producidas en base a un alto porcentaje de subproducto de soja, y al incremento en el uso de aceite vegetales para el consumo humano (OEA, 2009).

Los principales países productores de soja son: Estados Unidos, Brasil y Argentina, con producciones de 117, 96 y 58 millones de toneladas de grano, respectivamente, en el año 2016 (FAO, 2017). Sudamérica es la región con mayor producción de soja, y participa con el 50% de la producción mundial (FAO, 2017).

La superficie agrícola destinada a soja en Uruguay tuvo un fuerte crecimiento en los últimos 20 años, pasando de 10.000 ha en 1998 (MGAP, 2019a) a 1.140.000 ha en 2016 (MGAP. DIEA, 2017). Según MGAP. DIEA (2018), la superficie sembrada en la actualidad -zafra 2017/2018-, no presenta grandes variaciones con respecto al año agrícola 2016/2017, y es de aproximadamente 1,1 millones de hectáreas. Este proceso de masiva expansión fue resultado de buenos precios internacionales y de una macroeconomía favorable para el ingreso de inversores procedentes del exterior, en su mayoría argentinos (Blum et al. 2008, Arbeletche et al. 2012).

### 2.2. SOJA TRANSGÉNICA BT PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA

#### 2.2.1. Superficie y evolución de la soja Bt en Uruguay

En Uruguay, a partir de la aprobación del evento MON87701 en 2012, se comenzó a sembrar soja transgénica (Bt) resistente a insectos lepidópteros con un gen que codifica la endoproteína Cry1A(c). En las zafra 2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017 la superficie sembrada fue de 227, 171 y 279 mil hectáreas respectivamente, representando un 17, 14 y 24% del área total destinada a la siembra de este cultivo en el país (ISAAA, 2018).

### 2.2.2. Espectro de acción de la proteína Cry1A(c)

Los materiales empleados en la actualidad poseen el evento MON87701 (INTACTA®), cuentan con una endoproteína altamente específica para el control de lepidópteros plaga como: *A. gemmatalis*, *R. nu*, *C. includens*, *C. aporema* y *H. gelotopoeon*. Además tienen efectividad sobre insectos que actualmente no son de importancia en Uruguay y entre ellos se encuentran *Colias lesbia*, *Heliothis virescens*, *Spilosoma virginica* y *Loxostege bifidalis*. Sin embargo, presentan menor eficacia de control sobre *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* (Monsanto, 2018), especies de frecuencia esporádica y que no generan pérdidas económicas relevantes. Asimismo, presenta baja efectividad para el control de *Elasmopalpus lignosellus*, insecto plaga que tiene potencialidad de producir pérdidas a nivel económico, pero que es infrecuente (Bentancourt y Scatoni, 2009b) por el microambiente generado por la siembra directa (Gassen, 1996).

La endoproteína Cry1A(c) presenta gran especificidad para los insectos nombrados y según Soberón y Bravo (2007), son inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco. Monsanto (2018) señala que el evento MON87701 no presenta capacidad de supresión sobre *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridaina*, *Agrotis ipsilon* y tampoco tiene efecto sobre los pentatómidos fitófagos del orden Hemiptera (chinchas).

### 2.2.3. Modo de acción de la proteína Cry1A(c)

La endoproteína Cry1A(c) presente en los materiales transgénicos es producida por *Bacillus thuringiensis*, una bacteria gram positiva, ubicua que habita el suelo y otros sustratos. Esta proteína es un cuerpo paraesporal o cristal que se caracteriza por ser tóxico para insectos lepidópteros. En el vegetal se encuentra como una protoxina que al entrar en contacto con las enzimas proteasas contenidas en el intestino de organismos blanco adquiere poder insecticida (Soberón y Bravo, 2007). Este proceso consta de varias etapas: primero las proteínas deben ser ingeridas por el insecto, luego se solubiliza en el medio alcalino del intestino medio en donde intervienen las enzimas proteasas y se liberan fragmentos tóxicos que se unen a receptores específicos de la membrana intestinal, generando poros líticos que originan desbalances osmóticos en las células epiteliales, determinando que el insecto cese su alimentación, ocurra una parálisis del intestino seguida de una parálisis total y la posterior muerte del insecto (Schünemann et al., 2014).

#### 2.2.4. Posible impacto de Cry1A(c) en organismos no objetivo

La adopción de la tecnología Bt determina una modificación en el agroecosistema, con posibles efectos sobre los insectos integrantes de la comunidad.

Los cultivos de soja Bt permiten disminuir el número de aplicaciones de insecticidas, mitigando los impactos que estos últimos manifiestan sobre los controladores biológicos de insectos plaga (Römeis et al., 2006), pero la continua exposición a Cry1A(c) puede tener consecuencias negativas directas sobre los organismos benéficos, cuando es adquirida, debido a su toxicidad. Esta proteína puede ser obtenida por los organismos benéficos directamente del vegetal o a través del hospedero/presa. También puede llegar a tener efectos negativos indirectos debido a la menor cantidad o calidad de hospederos/presas de los que se alimentan (Naranjo, 2009). Los enemigos naturales resultan más abundantes con la utilización de esta tecnología que en cultivos convencionales con insecticidas de amplio espectro (Fontes et al., 2002, Marvier et al. 2007). Sin embargo, la disminución de las presas puede implicar una caída en las poblaciones de enemigos naturales en relación a chacras sin aplicaciones (Naranjo 2005, Zwahlen y Andow 2005).

#### 2.3. *PIEZODORUS GUILDINII* (WESTWOOD) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

La especie *P. guildinii* pertenece al Orden Hemiptera (Heteroptera) y a la familia Pentatomidae. Su distribución abarca desde el sur de América del Norte hasta Argentina. En América del Sur es considerada una plaga importante del cultivo de soja (Temple, 2011).

En Uruguay es la principal especie plaga de soja dentro del orden Hemiptera, en virtud de su elevada frecuencia y su alta capacidad de daño (Ribeiro et al., 2008b). Su mayor frecuencia en relación a otros hemípteros como *Dichelops furcatus* y *Nezara viridula*, puede ser explicada por un sistema agrícola más intenso en el uso de soja (Castiglioni, 2004) y un complejo de controladores biológicos ineficientes (Ribeiro y Castiglioni, 2008a). El alto índice de daño en relación a las demás especies de hemípteros plaga, puede ser explicado por la etapa del ciclo de soja de la cual se alimenta, el comportamiento de alimentación y las particularidades de la saliva introducida (Sosa-Gómez y Moscardi 1995, Corrêa-Ferreira y Azevedo 2002).

### 2.3.1. Daños e importancia económica de *Piezodorus guildinii*

En el cultivo de soja, los pentatómidos son las plagas que por lo general tienen mayor trascendencia económica, por causar daños que influyen directamente sobre el rendimiento en grano y la calidad de semilla, además de tener la capacidad de transmitir enfermedades y provocar retención foliar (Belorte et al., 2003). Dentro de esta familia, *P. guildinii*, es la especie que presenta mayor dificultades para su control químico eficaz, debido a que existe un rango muy limitado de insecticidas efectivos y a que requiere altas dosis en la mayoría de los casos. Además, esta especie es plaga de varias leguminosas, fundamentalmente de los semilleros de forrajeras (Zerbino y Alzugaray, 2010).

*P. guildinii* perfora los tejidos vegetales (semillas) con el estilete e inyecta saliva con enzimas que disuelven y destruyen células, facilitando la remoción del contenido y produciendo vaciamiento parcial o total de los granos (Todd y Turniseed, 1974). Debido al proceso de alimentación, existe un deterioro en la calidad del grano, asociado a menor poder germinativo y a la variación del tenor de aceite y proteína (Sosa Gómez y Moscardi 1995, Zerbino y Alzugaray 2010). La magnitud del daño generado está vinculado con el tamaño de la población de *P. guildinii*, la etapa de desarrollo del cultivo afectada (Zerbino y Alzugaray, 2010) y la duración del ataque (Corrêa-Ferreira y Azevedo, 2002).

El descenso en el rendimiento ocasionado por *P. guildinii* se debe a que provoca vainas vanas y granos picados e inviabilizados. Tanto las vainas vanas como los granos picados aumentan en forma directamente proporcional al aumento de la población de chinches. Las vainas vanas se producen cuando el ataque se da en R4 y los granos picados y deformes cuando se da en R5-R6 (Corrêa-Ferreira y Azevedo 2002, Corrêa-Ferreira 2005).

Además, esta especie se caracteriza por ser una de las que genera el síntoma conocido como “soja loca”, que ocasiona un rezago en la maduración y retención foliar. La etapa del cultivo en que se genera este síntoma es de R3 a R5.5 (Boethel et al., 2000). Otros daños provocados por *P. guildinii* es la presencia de toxinas en la saliva y la transmisión de hongos (Corrêa-Ferreira y Azevedo, 2002).

### 2.3.2. Descripción del aparato digestivo de los hemípteros

El aparato digestivo de los hemípteros es un tubo largo que comienza en el aparato bucal y se extiende hasta el ano, su función es digerir, absorber y eliminar las heces (Amutkan et al., 2015).

Bentancourt y Scatoni (2009b) señalan que los hemípteros fitófagos se caracterizan por presentar un aparato bucal pico-suctor adaptado para perforar tejidos vegetales. En este orden de insectos, las mandíbulas y maxilas se pliegan y prolongan formando los denominados estiletos, estos contienen internamente dos canales, uno tiene como función inyectar saliva y el otro aspirar los contenidos líquidos (Chapman, 1998).

De acuerdo con Chapman (1998), el aparato digestivo de los hemípteros está constituido por tres regiones, el intestino anterior derivado del estomodeo, el medio procedente del endodermo y el posterior proveniente del proctodeo. A su vez, el intestino medio está dividido en varias secciones denominados ventrículos (Panizzi y Parra, 1991).

El intestino anterior está compuesto por la faringe, esófago y el proventrículo, este último es una válvula que regula el ingreso del alimento al intestino medio (Agosin et al. 1974, Amutkan et al. 2015). El aparato digestivo en su totalidad exhibe movimientos peristálticos que mezclan los contenidos, pero solo en el intestino medio y posterior es donde tiene lugar la digestión y absorción de nutrientes. Estas dos secciones (intestino medio y posterior) están separadas por la válvula pilórica (Figura No. 1).

Bentancourt et al. (2009a) señalan que las células de la pared del intestino medio secretan enzimas hacia la luz intestinal, la composición de estas varía con la especie, un ejemplo son proteasas o peptidasas que son primordiales para la digestión, además se encuentran las lipasas, entre otras. En simultáneo se da otro proceso, el de absorción de agua y nutrientes, estos pasan por difusión o modo activo al hemocele. Por otra parte, el intestino posterior sirve para recuperar sustancias útiles antes de ser perdidas por las heces (Amutkan et al., 2015).

El medio interno del intestino medio presenta un pH específico y que cambia con el orden del insecto; en los hemípteros, el pH ventricular posterior es ácido, muy diferente al de los lepidópteros donde el pH es alcalino (Chapman, 1998). Hay dos pares de túbulos de Malpighi en la unión del intestino medio y posterior (Figura No. 1), los cuales cumplen la función excretora (Amutkan et al., 2015).

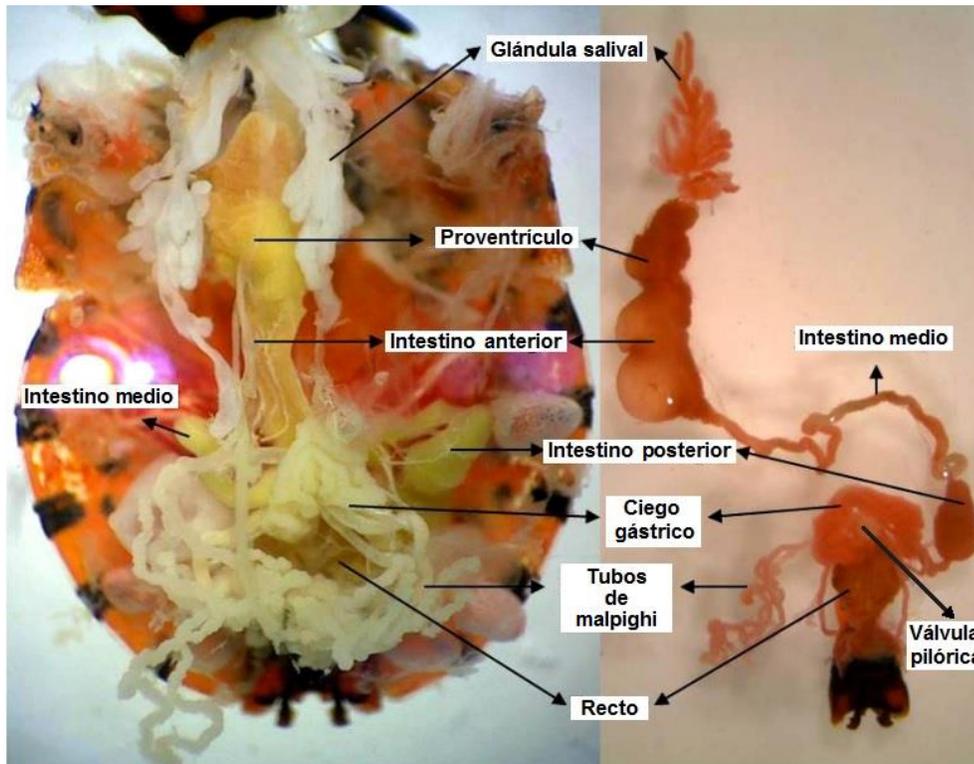


Figura No. 1. Anatomía interna de pentatómido (*Graphosoma lineatum*) Fuente: adaptado de Amutkan et al. (2015)

### 2.3.3. Anatomía externa de *Piezodorus guildinii*

Es relevante conocer la anatomía externa de esta especie, ya que permite ubicar las regiones clave para poder realizar el procedimiento de disección con éxito. Los adultos de *P. guildinii* miden de 11 a 9 mm (Grazia et al., 1980). Presenta un color verde claro o amarillento, con una banda roja o marrón en el pronoto dependiendo del sexo (Igarzábal et al., 2015). La cabeza tiene una disposición opistognata y es de tamaño pequeño Bentancourt y Scatoni (2009b). Las antenas son pequeñas y están compuestas por tres a cinco segmentos. Las patas son cursoras, adaptadas para caminar. Presentan un pronoto bien desarrollado, detrás está el mesoescutelo de estructura triangular, siendo estas junto con el conexivo lateral las regiones claves a identificar. Las alas anteriores son hemiélitros con una región coriácea basal y una membranácea apical, las alas posteriores son membranáceas. El abdomen está compuesto por 9 a 10 segmentos (Bentancourt y Scatoni, 2009b).

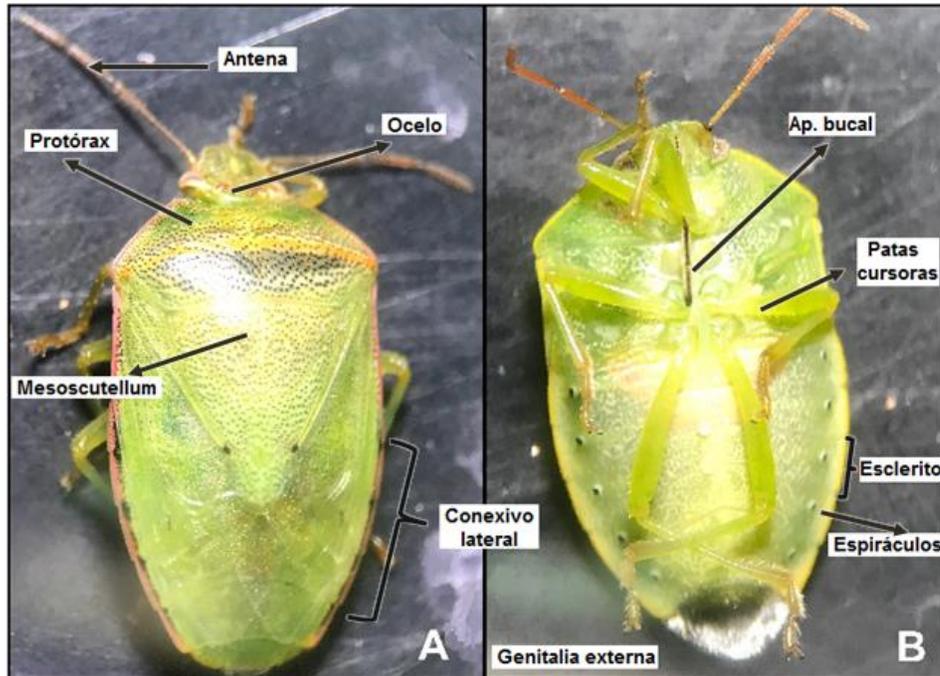


Figura No. 2. Anatomía externa de *P. guildinii*

#### 2.3.4. Posible impacto de Cry1A(c) sobre hemípteros

Ante el progresivo uso de los cultivos Bt para el control de lepidópteros plaga, surge la interrogante de cuál es el impacto de esta tecnología sobre los organismos no blanco. En este sentido, es muy limitada la información sobre los efectos de proteína Cry1A(c) en estos organismos, en especial en pentatómidos del orden Hemiptera.

Las endoproteínas Cry son producidas por *B. thuringiensis* y su actividad está relacionada con el pH y las condiciones reductoras del intestino medio. Estas proteínas requieren de un medio alcalino y condiciones reductoras para ser liberadas y posteriormente adquirir propiedad tóxica por la acción de enzimas proteasas circundantes. Por consiguiente, esto determinaría la susceptibilidad de los distintos órdenes de insectos a la endoproteína, como por ejemplo lepidópteros, dípteros y algunos coleópteros que pueden llegar a ser susceptibles por compartir las características antes mencionadas (Schünemann et al., 2014). La especificidad propiamente dicha, es establecida por la compatibilidad entre la toxina y el sitio de unión presente en las

microvellosidades de las células columnares del intestino medio (Soberón y Bravo, 2007). Esto último determina que la proteína Cry1A(c) presente un rango limitado de especies blanco.

Diversos investigadores han evaluado cómo interactúa la proteína Cry1A(c) en hemípteros. Entre ellos Brandt et al. (2004) realizaron estudios sobre *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) alimentado con una dieta artificial que contenía la endoproteína y constataron la presencia de Cry1A(c) en la hemolinfa. Asimismo, se demostró que la mayor proporción de la endoproteína fue excretada y la concentración en el organismo fue muy baja.

Yu et al. (2014), estudiaron el nivel de exposición de diferentes especies de artrópodos a la proteína Cry1A(c) en campos de soja Bt y caracterizaron las especies no objetivo con mayor probabilidad de riesgo de contraer la proteína. Determinaron que el fitófago *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentado con soja Bt ingirió la proteína Cry1A(c), pero pulgones de la especie *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphidae) expuestos al mismo alimento no lo hicieron. Además, estos investigadores encontraron que insectos predadores como larvas de *Chrysoperla spp* (Neuroptera: Chrysopidae) y *Geocoris spp* (Hemiptera: Lygaeidae) nutridos con diferentes presas provenientes de soja Bt, presentaban concentraciones detectables de proteína en el cuerpo.

Según da Cunha et al. (2012), la biología de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) no se vio afectada al ser alimentado desde su segundo estadio con larvas de *S. frugiperda* provenientes de cultivos de algodón Bt. Sin embargo, al realizar un estudio a nivel digestivo, se observó una desorganización en la membrana perimicrovilar de *P. nigrispinus*, diversos cambios ultraestructurales en las células digestivas y alteraciones del patrón de distribución de glucógeno, lípidos y calcio, afectando la capacidad depredadora de este insecto. Estos autores concluyeron que especies no blanco como *S. frugiperda* que ingieren la endoproteína Cry1A(c) y no mueren, pueden llegar a convertirse en una vía de transmisión efectiva de la proteína hacia los enemigos naturales.

Investigaciones en áfidos (Hemiptera: Aphidae) (Torres et al. 2006, Burgio et al. 2011, Römeis y Meissle 2011, Zhang et al. 2012) expuestos a una dieta conteniendo la proteína Cry1A(c), determinaron que la adquisición de la misma por este grupo de insectos es muy variable, dado que del total de individuos en estudio solo en un bajo porcentaje se detectó la proteína. Estos resultados pueden llegar a ser explicados por diferencias en características relacionadas a la ingestión, degradación y excreción (Paula y Andow, 2016).

## 2.4. HIPÓTESIS

Las hipótesis biológicas del trabajo fueron:

1. Los adultos de *P. guildinii* alimentados con vainas de soja Bt, son capaces de ingerir la proteína Cry1A(c), esta se encuentra en el aparato digestivo, pasa a la hemolinfa, se distribuye por todo el cuerpo y es excretada.

2. La proteína Cry1A(c) está presente en los huevos de hembras adultas alimentadas con soja Bt.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”, Facultad de Agronomía (Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay), en los Laboratorios de Entomología, en los meses de abril y mayo.

#### 3.1. OBTENCIÓN DE INDIVIDUOS EXPERIMENTALES DE *Piezodorus guildinii*

Se recolectaron adultos de *P. guildinii* de chacras comerciales y experimentales de alfalfa (*Medicago sativa*) utilizando la red entomológica. Los adultos fueron llevados al laboratorio y colocados en recipientes de plástico (25 cm por 30 cm de base y 60 cm de altura) con un tejido por encima para evitar su fuga y al mismo tiempo facilitar el ingreso de oxígeno. Los recipientes se mantuvieron a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$  y en una fotofase de 14 horas (Peres y Correa-Ferreira, 2004). Los insectos permanecieron en esta situación durante una semana aproximadamente, hasta que fue instalado el experimento para la detección de la proteína Cry1A(c).

#### 3.2. OBTENCIÓN DE LAS VAINAS BT Y NO BT PARA LA ALIMENTACIÓN DE *Piezodorus guildinii*

Para la alimentación de los adultos de *P. guildinii* del experimento se recolectaron vainas en el estado R 5.5 en plantas cultivadas en sombráculo, de los cultivares Don Mario 5958i RR PRO correspondientes a un cultivar Bt y Don Mario 59i RR cultivar no Bt. Ambos cultivares se sometieron a un manejo agronómico idéntico hasta la cosecha.

Luego de la cosecha las vainas se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto, posteriormente fueron lavadas con abundante agua destilada y colocadas a secar a la sombra, al aire libre y se almacenaron en la heladera hasta su utilización.

### 3.3. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO PARA LA DETECCIÓN DE Cry1A(c) EN *Piezodorus guildinii*

La instalación del experimento se llevó a cabo el 3 de abril de 2018. Los adultos de *P. guildinii*, se colocaron en recipientes individuales 5 cm de diámetro de base por 3,5 cm de altura que contenían papel Tissue en la base (Figura No. 3). Se suministró agua mediante un recipiente pequeño con algodón húmedo y el alimento que correspondió a su tratamiento. El alimento se renovó cada 3 días. Las condiciones ambientales fueron las mismas que las de la cría (temperatura  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y fotofase de 14 horas). Fue necesario contar con 60 individuos en cada tratamiento en un diseño experimental completamente al azar (DCA). Los tratamientos fueron alimentación con vainas de soja Bt o no Bt por un período de 10 días, procurando que siempre tuvieran alimento fresco disponible.

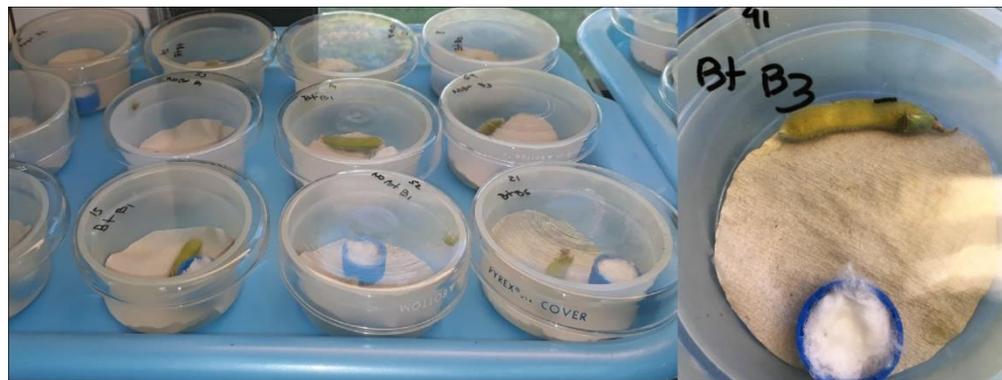


Figura No. 3. Recipientes individualizados con su respectivo adulto de *P. guildinii*

### 3.4. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA Cry1A(c)

La detección de la proteína Cry1A(c) se realizó utilizando el test de detección rápido (Quickstix, EnviroLogix, Portland, ME), que se basa en la técnica Elisa, esta mediante un anticuerpo ligado a una enzima tiene la capacidad de detectar un antígeno (Ochoa, 2012), en este experimento fue la proteína Cry1A(c). Este test permite detectar la proteína expresada por el cultivar de soja del evento MON 87701, el resultado es considerado positivo (se detecta la proteína) si la muestra contiene un valor mayor o igual al 0,3% de concentración de la proteína Cry1A(c, ENVIROLOGIX, 2013).

Se efectuaron dos evaluaciones en adultos de *P. guildinii*, una en tracto digestivo y otra en el resto del cuerpo (sin tracto digestivo, cabeza ni extremidades). También se realizaron evaluaciones sobre posturas y heces de adultos de *P. giuldinii* (Bt y no Bt).

En todos los ensayos se procedió vertiendo los contenidos de tejidos, heces y posturas del insecto en un tubo eppendorf esterilizado a los cuales se le agregó una solución de extracción que permite solubilizar la proteína, mejorando los resultados de la medición. Posteriormente se homogeneizó la muestra en un vórtex por 2 minutos y finalmente fue colocada la banda de prueba, observando el resultado. Para evitar la contaminación fueron separados los utensilios por tratamiento (Bt y no Bt). Asimismo, cada vez que fue realizado un ensayo dentro de un mismo tratamiento se esterilizaban los utensilios con alcohol etílico.

Cuadro No. 1. Muestras por repetición para cada una de las variables evaluadas

Determinación	Muestras por repetición	Repeticiones (n)
Tracto digestivo	10 tractos digestivos	6
Resto del cuerpo	5 tejidos del resto del cuerpo	5
Heces	0,15 gramos (heces + papel tissue)	5
Postura	15 huevos	5

Se realizaron ensayos específicos para verificar la presencia de la proteína Cry1A(c) en el tracto digestivo de *P. guildinii*, para cada tratamiento fueron necesarios 60 tractos digestivos (Bt y no Bt).

Se ejecutó una prueba específica del resto del cuerpo con los tejidos de 5 adultos para cada repetición, sin la presencia del tracto digestivo, cabeza ni extremidades. Para realizar esta determinación fueron necesarios 25 restos del cuerpo por tratamiento.

Se realizó un ensayo para verificar la presencia de la proteína Cry1A(c) en los residuos fecales de *P.giuldinii*, para ello se retiraron las secciones del papel Tissue que contenía heces luego de transcurridos los 10 días de tratamiento. Se realizó un ensayo control para constatar que el papel utilizado no contenga trazas de la proteína.

Se llevaron a cabo ensayos específicos para verificar si las posturas de hembras alimentadas con Cry1A(c) contenían dicha proteína. Se extrajeron de los tratamientos Bt y no Bt las posturas. En este caso, se utilizó como unidad experimental 15 huevos, los cuales fueron colocados en un tubo eppendorf esterilizado y fue necesario macerarlos para liberar los contenidos.

### 3.5. DISECCIÓN DE LOS ADULTOS DE *Piezodorus guildinii*

La extracción de los órganos constituyentes del aparato digestivo y los tejidos del insecto en estudio (*P. guildinii*), requirió de lupa binocular de 40X (Olympus SZ40), agujas entomológicas, tijeras tipo Castroviejo rectas y curvas, además de cajas de petri con parafina negra. Estos artefactos son imprescindibles para separar los tejidos, ya que permiten una mejor visualización e identificación de los mismos clave para la obtención de cortes de alta precisión. Para evitar la contaminación fue necesario contar con agujas entomológicas, tijeras tipo Castroviejo y cajas de petri para cada tratamiento (Bt y no Bt).

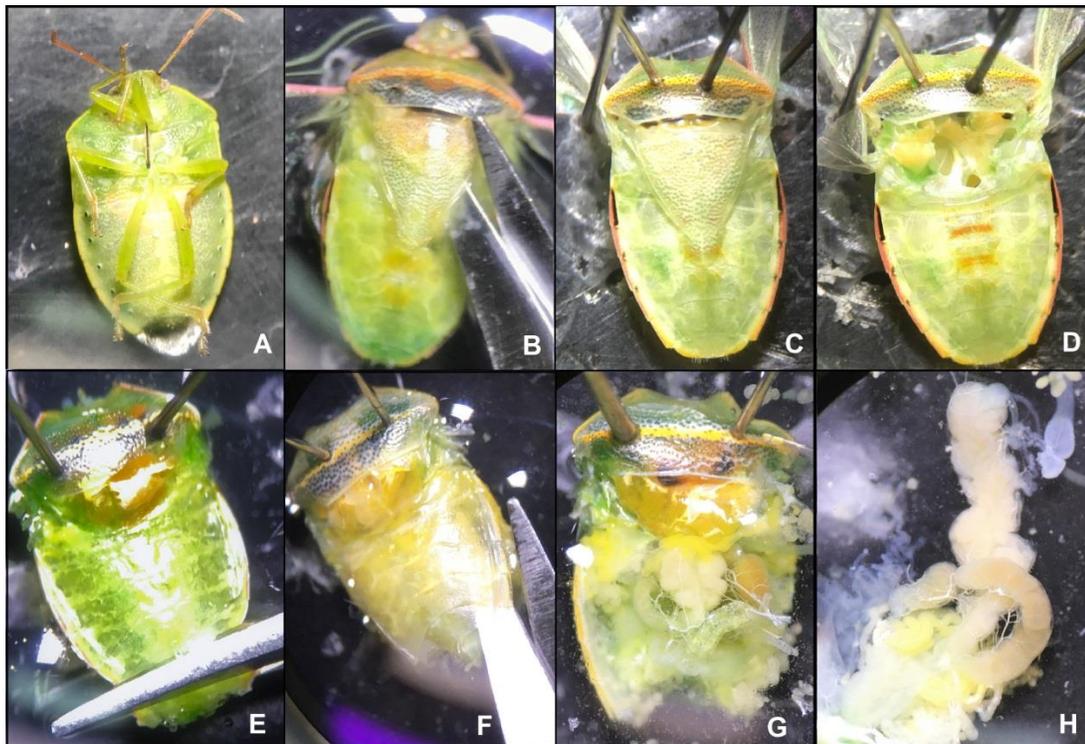


Figura No. 4. Pasos a seguir en la disección de adultos de *P. guildinii*

La finalidad de esta práctica fue separar el aparato digestivo del resto del cuerpo, eliminando la cabeza y extremidades para no entorpecer el procedimiento.<sup>1</sup> El proceso constó de 5 etapas:

1. muerte del insecto, utilizando temperaturas bajo cero por unos minutos (freezer).
2. Separación de cabeza y patas del resto del cuerpo mediante tijera Castroviejo.
3. Colocación del insecto con el abdomen hacia abajo en una caja de petri con parafina negra, (se utiliza este material por el contraste, lo que permite diferenciar mejor entre partes del cuerpo). Se realizaron incisiones en cada vértice contiguo al protórax del mesoescutelo y este se retiró desde un extremo y se desechó. Posteriormente, se ubicaron agujas entomológicas en el protórax, traspasándolo, y otras en las alas de forma de contener el espécimen inmóvil. Se vertió agua destilada para facilitar el manejo.
4. En el último segmento del abdomen se efectuó un corte trasversal al cuerpo, quitando la genitalia externa, para posteriormente ejecutar un corte siguiendo el conxivo lateral comenzando desde el primer segmento abdominal hasta el final. Esto permitió retirar los escleritos del abdomen.
5. El proceso finalizó cuando se separan los tejidos del aparato digestivo del resto del cuerpo (Figura No. 4). Para la variable evaluada tracto digestivo fueron necesarios 60 tractos digestivos por tratamiento, ya que cada repetición contó con 10 tractos digestivos (6 repeticiones).

---

<sup>1</sup> Panizzi, A. 2018. Com. personal.

### 3.6. MÉTODO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el intervalo de confianza para la verdadera proporción por el método de Wilson Score, tomándose como unidad experimental la muestra contenida en el eppendorf de los diferentes ensayos y se determinó el número de éxitos en “n” número de individuos. Fue utilizado este método debido a que se considera el apropiado para estudiar resultados binarios: presencia o ausencia de la proteína Cry1A(c), valores 1 y 0 respectivamente (Cepeda Cuervo et al., 2008).

#### 3.6.1. Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron: detección de Cry1A(c) en tracto digestivo, detección de Cry1A(c) en el resto del cuerpo (sin tracto digestivo, cabeza ni extremidades), detección de Cry1A(c) en heces contenidas en papel Tissue y detección de Cry1A(c) en posturas.

#### 3.6.2. Intervalo de confianza para la verdadera proporción por el método de Wilson Score

$$L_I^S = \hat{p} + \frac{z^2}{2n} \pm z \frac{\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} + \frac{z^2}{4n^2}}}{1 + \frac{z^2}{n}}$$

Dónde:

$\hat{p}$  Proporción muestral.

$z$  Percentil de distribución normal N (0,1).

$n$  Tamaño de la muestra.

#### 4. RESULTADOS

Previo a la instalación del experimento se confirmó la presencia de la proteína Cry1A(c) en las vainas de soja con el test de detección rápido, donde se constató que las vainas Bt contenían efectivamente la proteína y que las vainas no Bt no presentaban la proteína.

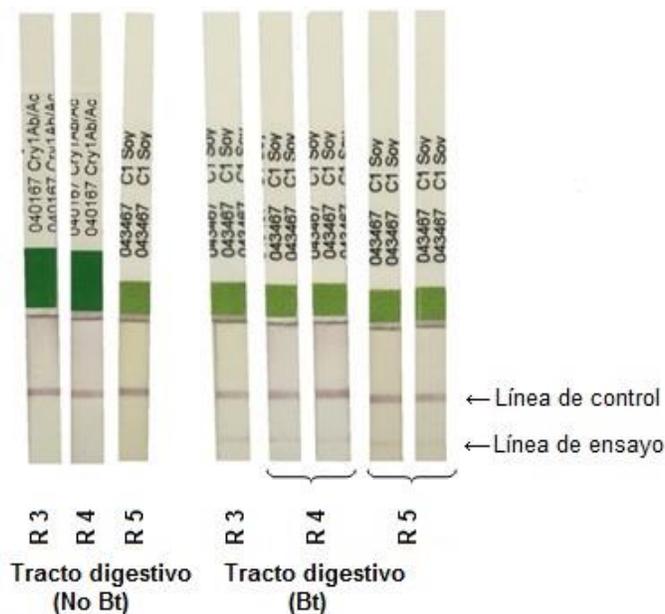


Figura No. 5. Resultados de la detección de la presencia de proteína Cry1A(c) en el aparato digestivo de *P. guildinii* en el tratamiento bt y no bt

La proteína Cry1A(c) se encontró en el tracto digestivo de chinches alimentadas con vainas de soja Bt y no se encontró en las alimentadas con vainas no Bt (Figura No. 5).

En los tejidos del cuerpo, sin extremidades, cabeza, ni tracto digestivo, no se detectó la endoproteína en ninguno de los dos tratamientos, Bt y no Bt (Anexo No. 1).

En el tratamiento Bt, se halló la presencia de la proteína Cry1A(c) en los residuos fecales (Anexo No. 2) y no se detectaron en las heces de adultos alimentados con vainas no Bt.

En las posturas de hembras adultas de *P. guildinii* alimentadas con vainas de soja Bt y no Bt, no se detectó la proteína Cry1A(C) para ninguno de los dos tratamientos (Anexo No. 3).

Cuadro No. 2. Detección de la proteína Cry1A(c) en los tejidos del cuerpo, heces y posturas, y cálculo del intervalo de confianza para la verdadera proporción por el método de Wilson Score para los individuos alimentados con vainas Bt

Determinación	Repeticiones (n)	Resultado (dieta Bt)	Resultado (dieta No Bt)	Intervalo de confianza <sup>*****</sup>	 ***** *
Tracto digestivo	6 <sup>*</sup>	+	-	[0,6-1]	1
Resto del cuerpo	5 <sup>**</sup>	-	-	[0-0,4344]	0
Heces	5 <sup>***</sup>	+	-	[0,5655-1]	1
Postura	5 <sup>****</sup>	-	-	[0-0,4344]	0

Con confianza de 95%. (\*\*\*\*\*) El intervalo de confianza y (\*\*\*\*\*) el p valor estimado se realizó para el tratamiento (alimentación Bt).

\* 10 tractos digestivos/ repetición

\*\* 5 individuos/ repetición

\*\*\* 0,15 gramos/repetición

\*\*\*\* 15 huevos/repetición

## 5. DISCUSIÓN

Existe muy limitada información a nivel internacional en relación al efecto de la adopción de la tecnología Bt en soja sobre organismos no blanco como el grupo de los hemípteros plaga. En particular, en relación a *Piezodorus guildinii* principal plaga de soja en Uruguay y otras regiones del mundo, la información es nula.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede deducir que la proteína Cry1A(c) es efectivamente ingerida por adultos de *P. guildinii* alimentados con vainas de soja Bt, ya que la misma es encontrada en el aparato digestivo de dicha especie. Asimismo, la presencia de la proteína en heces indica que el insecto tiene la capacidad de excretarla, lo cual confirma la hipótesis biológica de este trabajo. Por el contrario, la proteína no se encontró en las restantes partes del cuerpo (sin incluir extremidades, aparato bucal y digestivo) rechazando la hipótesis que planteaba que la proteína Cry1A(c) pasa a la hemolinfa y se distribuye por todo el cuerpo.

La presencia de la proteína Cry1A(c) en el tracto digestivo de *P. guildinii* coincide con lo encontrado por Brandt et al. (2004) para *L. hesperus* (Hemiptera: Miridae) y Yu et al. (2014) para *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae). Estos autores señalan que estos fitófagos expuestos a Cry1A(c), tienen la capacidad de ingerir la proteína y esta se encuentra en el aparato digestivo.

En áfidos (Hemiptera: Aphididae), los resultados obtenidos en estudios de cuantificación de la proteína Cry1A(c) (límite de detección 0,022ng y 0,5 ppb), se indicó la presencia de la proteína en algunos especímenes y su ausencia en otros (Torres et al. 2006, Römeis y Meissle 2011, Paula y Andow 2016). Estos autores explican la variación encontrada por diferentes motivos, uno de ellos, es que los insectos se alimentan del floema donde se encuentran bajas o nulas concentraciones de Cry1A(c) y el otro, relacionado a diferencias en ingestión, degradación y excreción entre cada especie de áfido.

El estudio de la presencia de la proteína Cry1A(c) en el resto del cuerpo de *P. guildinii*, indicaría que la misma no pasa a la hemolinfa, en virtud de que no se detectó en el resto del cuerpo. En contraposición con lo hallado en este trabajo, Brandt et al. (2004) encontraron que en el caso del fitófago *L. hesperus* la toxina Cry1A(c) es ingerida, parcialmente absorbida, encontrándose esta en la hemolinfa, siendo el resto excretado en heces. La disparidad entre los resultados obtenidos y los publicados por estos autores, podría ser explicada entre otros, por dos factores, el primero referido al proceso de digestión y absorción por parte del insecto y el segundo en lo que concierne a la metodología utilizada para la detección.

En relación a la metodología utilizada, en el presente trabajo se utilizó el test ELISA de detección, que permite detectar la presencia de la proteína en concentraciones mayores o iguales 0,3 % de la muestra (ENVIROLOGIX, 2013). Otros trabajos, utilizan el test de ELISA de cuantificación (Yu et al., 2014) utilizando un límite de detección de 0,02 µg/g de peso seco, lo cual implica una mayor sensibilidad de detección (0,000002%) en comparación al detectado en estos ensayos. En otros trabajos (Brandt et al., 2004) se utilizan técnicas analíticas de identificación de proteínas mediante electroforesis en gel (Western blot y SDS-PAGE), lo cual permite detectar y cuantificar la proteína Cry1Ac y también sus productos de degradación. Otro factor a considerar es que en este trabajo los insectos fueron expuestos a la alimentación con la proteína durante 10 días, lo cual pudo haber sido un período insuficiente para generar concentraciones detectables en la hemolinfa y en las posturas.

En relación a la constitución de las proteínas Cry1, se ha demostrado que dicho grupo presenta una elevada cantidad de aminoácidos básicos, lo que hace que los cristales se solubilizan en un medio alcalino (Portela et al., 2013), proceso necesario para ejercer su acción insecticida, romper las células epiteliales y pasar a la hemolinfa. Este medio es característico de insectos lepidópteros, que presentan un pH de 8 a 12. Por el contrario, en los hemípteros el pH ventricular posterior varía de 4,5 a 5 (Panizzi y Parra 1991, Chapman 1998) lo que podría explicar la falta de detección de la endoproteína en el resto del cuerpo de *P. guildinii* en el presente trabajo. Sin embargo, los resultados en otros hemípteros (Brandt et al., 2004), en los cuales se ha detectado la endoproteína en la hemolinfa, llevaría a la interrogante de si existe algún mecanismo alternativo de absorción o activación de la endoproteína.

Para que las proteínas Cry expresen su poder insecticida, luego de su solubilización en un medio alcalino, deben ser activadas por las proteasas y posteriormente reconocidas por receptores específicos de las microvellosidades del intestino medio (Soberón y Bravo, 2007). Es de esperar en este sentido que *P. guildinii* no presente el medio para la solubilización y/o activación, o no posea los receptores específicos, determinando la imposibilidad de que la proteína pase a la hemolinfa.

La detección de la toxina Cry1A(c) en las heces de *P. guildinii*, indicaría que luego de ser ingerida por la chinche, la proteína (al no ser solubilizada y/o activada o no presentar receptores específicos en el intestino medio), continúa su recorrido por el tracto digestivo hasta ser expulsada. Este hallazgo guarda relación con lo mencionado por Brandt et al. (2004), Yu et al. (2014) para *L. hesperus*, puesto que dichos estudios una alta proporción de la proteína ingerida fue también detectada en la heces.

Visto que, en los resultados obtenidos tanto en el presente como en trabajos realizados por otros investigadores, la proteína Cry1A(c) fue detectada

en el aparato digestivo, y que, además, en ciertos casos también fue detectada en la hemolinfa, se plantea la interrogante en relación a posibles efectos subletales de la tecnología en el desarrollo y/o la reproducción de estos organismos no blanco. Estudios realizados<sup>2</sup> demostraron que *P. guildinii* expuesto a una dieta Bt no presentaba modificaciones a nivel biológico ni reproductivo, dado que los individuos no registraron diferencias en el desarrollo ninfal, porcentaje de sobrevivencia acumulada, número de huevos totales por hembra ni viabilidad de los mismos. Esto coincide con lo encontrado por Silva et al. (2014), quienes determinaron que la proteína Cry1A(c) en *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) no alteró el peso adulto, el desarrollo ninfal, ni el número de posturas por hembra.

En referencia a la última hipótesis biológica de trabajo planteada, donde se postula la presencia de Cry1A(c) en los huevos de hembras adultas de *P. guildinii*, los resultados generados en el experimento, permiten concluir que la proteína Cry1A(c) no se transfiere hacia las posturas. Esto podría estar explicado porque *P. guildinii* no presenta el medio apropiado ni los receptores específicos en el intestino medio para que la proteína sea absorbida como nutriente y pase a la hemolinfa. Este hallazgo no es menor, ya que implicaría que controladores biológicos como lo son los parasitoides de huevos no tengan exposición con la proteína. No se encontraron otros trabajos de detección de proteínas transgénicas en posturas de hemípteros, pero en evaluaciones indirectas con el parasitoide oófago, *Trichogramma atopovirilia* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), criado sobre posturas de *S. frugiperda* procedentes de larvas alimentadas con Maíz Bt (MON810), no presentaron cambios o alteraciones biológicas o morfológicas por Cry1Ab (Fernandes, 2003). Asimismo, Silva et al. (2014) afirman que en áreas con soja Bt la capacidad del parasitoide de huevo *Telenomus podisi* (Ashmead) para controlar el fitófago *E. heros* no fue alterado. En ambos estudios, uno de los motivos que probablemente explique los resultados es que la proteína no estaba presente en las posturas a las que eran expuestos los parasitoides, aunque esto no fue determinado.

Teniendo en cuenta los estudios precedentes<sup>2</sup> que indican que *P. guildinii* no muere al ingerir la proteína Cry1A(c), pero confirmando que el insecto es capaz de ingerir la proteína y que la misma se encuentra en el aparato digestivo, se genera la incertidumbre sobre el nivel de exposición de Cry1A(c) a través de la cadena trófica y en particular su posible transferencia

---

<sup>2</sup> Abbate, S.; Silva, H.; Armand Pilón, A.; Bentancur, O.; Altier, N.; Pons, X. 2018. La soja bt no afecta el desarrollo ni la reproducción de *Piezodorus guildinii* Hemiptera: Pentatomidae (sin publicar).

hacia al tercer nivel trófico, en el cual se encuentran los controladores naturales, en particular los predadores. En este sentido, los huéspedes o presas podrían ser una vía de transferencia de la proteína Cry1A(c) a los enemigos naturales. Dado que los predadores se alimentan de presas vivas, es más elevada la probabilidad de exposición mediante organismos fitófagos que no mueren al ingerir la proteína Bt (Borsani et al., 2010).

Sin bien la mayoría de los estudios a nivel de campo y laboratorio han mostrado efectos menores de los cultivos Bt sobre enemigos naturales (Pons y Starý 2003, De la Poza et al. 2005, Römeis et al. 2006, Sisterson et al. 2007, Li et al. 2008, Li et al. 2011, Lumbierres et al. 2011, 2012, Li et al. 2014a, 2014b, Zhang et al. 2014, Comas et al. 2014, Wang et al. 2017, Pellegrino et al. 2018), existen trabajos donde se indican efectos negativos, mayormente sobre parasitoides de larvas (Baur y Boethel, 2003) y sobre predadores (Bell et al. 2003, Da Cunha et al. 2012), ambos expuestos exclusivamente a huéspedes o presas alimentados/as con dieta Bt en laboratorio. En este tipo de investigaciones la exposición forzada podría no reflejar lo que ocurre en condiciones naturales de campo, a diferencia de la metodología utilizada en este trabajo, donde a pesar de haberse realizado en condiciones controladas, las chinches fueron alimentadas con vainas de soja, que es el hospedero preferido (Zerbino et al., 2016).

## 6. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primero en estudiar la dinámica alimenticia de la proteína Cry1A(c) en *Piezodorus guildinii*, pentatómido no objetivo de la tecnología Bt. En el mismo se encuentra por primera vez que los adultos de dicha especie son capaces de ingerir la proteína, pero no de absorberla, es decir, que esta no pasa hacia la hemolinfa, sino que es directamente excretada. Estos resultados permiten fundamentar porque *P. guildinii* no se ve afectada por Cry1A(c) en parámetros como desarrollo y crecimiento, como se menciona en trabajos previos. Este argumento, de igual manera, es útil para sustentar por qué los parasitoides de huevos no se ven afectados por la tecnología Bt, en virtud de que si la proteína no pasa a la hemolinfa como nutriente, no es posible que esté presente en las posturas.

A partir de los resultados obtenidos se puede también concluir que cuando *P. guildinii* es expuesto a hospederos que expresen la tecnología Bt, Cry1A(c) se encuentra en el tracto digestivo y esto representaría una vía de exposición de la proteína con el tercer nivel trófico (enemigos naturales), lo cual puede tener consecuencias negativas que deben ser estudiadas.

Se considera de interés que futuras líneas de investigación se orienten a estudiar el impacto de esta tecnología sobre la cadena trófica, específicamente exponiendo a predadores como *Orius* spp. (Hemiptera: Heteroptera) a ninfas de *P. guildinii* (no objetivos de la tecnología Bt) alimentados con soja Bt.

## 7. RESUMEN

En Uruguay *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) es una importante plaga de soja. Este insecto puede provocar grandes pérdidas de rendimiento y disminución de calidad de semilla. Desde la aprobación de la soja Bt (*Glycine max* (L.) Merr.) y su adopción en diversos países, han surgido preguntas sobre el posible impacto sobre organismos no blanco. La proteína Cry1Ac que expresa la soja resistente a lepidópteros defoliadores (Bt) no presenta eficacia de control sobre *P. guildinii*. Se desconoce si esta especie es capaz de adquirir la proteína lo cual podría afectar la performance de la chinche e impactar indirectamente sobre sus controladores naturales. Con el objetivo de aportar al conocimiento en el manejo integrado de plagas, se evaluó, en ensayos laboratorio, si *P. guildinii* es capaz de ingerir la proteína Cry1A(c) y se encuentra en la hemolinfa y las posturas. Se alimentaron adultos de *P. guildinii* con vainas de soja Don Mario 59iPRO (RR/Bt) y Don Mario 59i (RR) en condiciones controladas para constatar la presencia de la proteína en el tracto digestivo, en el resto del cuerpo (sin tracto digestivo, cabeza ni extremidades), en las heces y en posturas. Se utilizó el Test de ELISA de detección rápido (Quickstix, EnviroLogix, Portland y ME). La proteína Cry1A(c) fue detectada en el *P. guildinii*; Cry1A(c); tracto digestivo y en las heces de los individuos alimentados con RR/Bt, indicando que la proteína Cry1A(c) es efectivamente ingerida y excretada por *P. guildinii*. Esta proteína no fue detectada en el cuerpo (sin tracto digestivo, cabeza ni extremidades), ni en las posturas, lo que señalaría que *P. guildinii* no es capaz de absorberla. La importancia de este trabajo radica en que es el primero en estudiar la dinámica alimenticia de Cry1A(c) en *P. guildinii*. Se comprobó que esta especie ingiere la proteína Cry1A(c), pero probablemente por no poseer los receptores específicos de las microvellosidades del intestino delgado, no es capaz de absorberla, y finalmente logra expulsarla. Estos resultados permiten explicar por qué Cry1A(c) no afecta a *P. guildinii* en parámetros como crecimiento y desarrollo. Además, se demuestra que los parasitoides de huevos no tienen probabilidad de verse afectados por la tecnología Bt. La proteína Cry1A(c), sin embargo, se encontró en el tracto digestivo lo que puede indicar un riesgo de exposición del tercer nivel trófico (enemigos naturales de ninfas o adultos).

Palabras clave: Endoproteína; Organismos no objetivo; Manejo integrado de plagas.

## 8. SUMMARY

In Uruguay, *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) is an important soybean pest. This insect can cause large yield losses and decrease in seed quality. Since the approval of Bt soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) And its adoption in several countries, questions have been raised about the possible impact on non-target organisms. The Cry1A(c) protein that expresses soybeans resistant to lepidoptera defoliators (Bt) does not have control efficacy on *P. guildinii*. It is unknown if this species is able to acquire the protein which could affect the performance of the bug and indirectly impact on its natural controllers. In order to contribute to knowledge in the integrated management of pests, it was evaluated, in laboratory tests, if *P. guildinii* is able to ingest the Cry1A(c) protein and is found in the hemolymph and the postures. Adults of *P. guildinii* were fed with Don Mario 59iPRO soybeans (RR / Bt) and Don Mario 59i (RR) under controlled conditions to verify the presence of the protein in the digestive tract, in the rest of the body (without digestive tract, head or limbs), in the stool and in postures. The Rapid Detection ELISA Test (Quickstix, EnviroLogix, Portland and ME) was used. The Cry1A(c) protein was detected in *P. guildinii*; Cry1A(c); digestive tract and in the feces of individuals fed with RR/Bt, indicating that the Cry1A(c) protein is effectively ingested and excreted by *P. guildinii*. This protein was not detected in the body (without digestive tract, head or extremities), or in the postures, which would indicate that *P. guildinii* is able to absorb it. The importance of this work is that it is the first one to study the alimentary dynamics of Cry1A(c) in *P. guildinii*. In addition it was found that this species ingests the Cry1A(c) protein, but probably because it does not possess the specific receptors of the microvilli of the small intestine is not able to absorb it, and finally manages to expel it. These results explain why Cry1A(c) does not affect *P. guildinii* in parameters such as growth and development. In addition, It is demonstrated that egg parasitoids are not likely to be affected by Bt technology. The Cry1A(c) protein, however, was found in the digestive tract which may indicate a risk of exposure of the third trophic level (natural enemies of nymphs or adults).

Keywords: Endoprotein; Non-target organisms; Integrated pest management.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agosin, M.; Arnold, J. W.; Florkin, M.; Granados, R. R.; Grégoire, C.; House, H. L.; Jeuniaux, C.; Jones, J. C.; Miller, T. S.; Pery, A. S.; Shapiro, M.; Shaw, J.; Stobbart, R. H.; Whitcomb, R. F. 1974. The physiology of insecta. In: Rockstein, M. ed. The physiology of insect. 2<sup>nd</sup>. ed. Miami, Academic Press. v.5, cap. 2, pp. 63-111.
2. Amutkan, D.; Suldudere, Z.; Candan, S. 2015. Ultrastructure of digestive canal of *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae). J. Entomol. Res. Soc. 17(3):75-96.
3. Arbeletche, P.; Coppola, M.; Paladino, C. 2012. Análisis del agro-negocio como forma de gestión empresarial en América del Sur: el caso de Uruguay. (en línea). Agrociencia (Uruguay). 16(2):110-119 Consultado ene. 2019 Disponible en [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2301-15482012000200013](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000200013)
4. Baur, M. E.; Boethel, D. J. 2003. Effect of bt -cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two *hymenopteran* parasitoids (*Braconidae*, *Encyrtidae*) in the laboratory. Biological Control. 26:325-332.
5. Bell, H. A.; Down, R. E.; Fitches, E. C.; Edwards, J. P.; Gatehouse, A. M. R. 2003. Impact of genetically modified potato expressing plant-derived insect resistance genes on the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Biocontrol Science and Technology. 13(8):729-741.
6. Belorte, L. C.; Ramiro, Z. A.; Faria, A. M.; Marino, C. A. B. 2003. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo.70(2):169-175.
7. Bentancourt, C.; Scatoni, I. B.; Morelli, E. 2009a. Insectos del Uruguay. Montevideo, UdelaR. 657 p.
8. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 2009b. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo, Hemisferio Sur. 582 p.

9. Blum, A.; Narbondo, I.; Oyhantcabal, G. 2008. ¿Dónde nos lleva el camino de la soja? Sojización a la uruguaya: principales impactos socioambientales. (en línea) In: Cárcamo, M. ed. Sojización en Uruguay. Montevideo, RAP-AL. pp.12-16. Consultado ene. 2019. Disponible en [http://www.w.rapaluruaguay.org/transgenicos/Soja/El\\_camino\\_de\\_la\\_soja.pdf](http://www.w.rapaluruaguay.org/transgenicos/Soja/El_camino_de_la_soja.pdf)
10. Boethel, D. J.; Russin, J. S.; Wier, A. T.; Layton, M. B.; Mink, J. S.; Boyd, M. L. 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
11. Borsani, O.; Castiglioni, E.; Chiappe, M.; Ferenczi, B.; García, M.; Pritsch, C.; Speranza, P. 2010. Biotecnología moderna, cultivos transgénicos y proceso de adopción en Uruguay. Intensificación agrícola: oportunidades y amenazas para un país productivo y natural. In: García Préchac, F.; Ernst, O.; Arbeletche, P.; Bidegain, P. M.; Pritsch, M.; Ferenczi, A.; Rivas, M. eds. Intensificación agrícola: oportunidades y amenazas para un país productivo y natural. s.n.t. pp. 29-66.
12. Brandt, S. L.; Coudron, T. A.; Habibi, J.; Brown, G. R.; Ilagan, O. M.; Wagner, R. M.; Wright, M. K.; Backus, E. A.; Huesing, J. E. 2004. Interaction of two bacillus thuringiensis -endotoxins with the digestive system of *lygus hesperus*. *New York Current Microbiology*. 48:1-9.
13. Burgio, G.; Dinelli, G.; Marotti, I.; Zurla, M.; Bosi, S.; Lanzoni, A. 2011. Bt-toxin uptake by the non-target herbivore, *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae), feeding on transgenic oilseed rape in laboratory conditions. *Bulletin of Entomological Research*. 101:241-247.
14. Castiglioni, E. 2004. La soja avanza sobre el paisaje y la chinche avanza sobre la soja. *Cangüé*. no. 26: 2-6.
15. Cepeda Cuervo, E.; Aguilar, W.; Cervantes, V.; Corrales, M.; Díaz, I.; Rodríguez, D. 2008. Intervalos de confianza e intervalos de credibilidad para una proporción. *Revista Colombiana de Estadística*. 31(1):211-228.

16. Chapman, R. F. 1998. The insect: structure and function. Alimentary canal, digestion and absorption. In: Simpson, S.; Douglas, A. eds. Alimentary canal, digestion and absorption. 4<sup>th</sup>. ed. Cambridge, UK, Cambridge University. cap. 3, pp. 38-68.
17. Comas, C.; Lumbierres, B.; Pons, X.; Albajes, R. 2014. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on non-target organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. Transgenic Research. 23: 135–143.
18. Corrêa-Ferreira, B.; Azevedo, J. 2002. Soybean seed damage by different species of stink bugs. Agricultural and Forest Entomology. 4(2):145-150.
19. \_\_\_\_\_. 2005. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 40(11):1067-1072.
20. Da Cunha, F. M.; Caetano, F. H.; Teixeira, W. V.; Torres, J. B.; Teixeira, Á. A. C.; Alves, L. C. 2012. Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on bt-cotton. Micon. 43:245-250.
21. De La Poza, M.; Pons, X.; Farinós, G. P.; López, C.; Ortego, F.; Eizaguirre, M.; Castañera, P.; Albajes, R. 2005. Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. Crop Protection. 24(7): 677-684.
22. ENVIROLOGIX. 2013. QuickStik kit for quickscan cry1a(c) soy bulk soybean. (en línea). Portland, USA. 11 p. Consultado ene. 2019. Disponible en <https://www.envirologix.com/wp-content/uploads/2018/04/AS075-STC-WS3-Cry1-1F-CP4-V3-021914.pdf>
23. FAO (Food and Agriculture Organisation, IT). 2017. FAOSTAT. (en línea). Rome s.p. Consultado ago. 2018. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>
24. Fernandes, O. D. 2003. Effect of genetically modified corn (MON810) on *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1997) and on egg parasitoid *Trichogramma spp.* Tesis de Doctorado. Sao Pablo, Brasil.

Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. s.p.

25. Fontes, E. M. G.; Pires, C. S. S.; Sujii, E. R.; Panizzi, A. R. 2002. The Environmental Effects of Genetically Modified Crops Resistant to Insects. *Neotropical Entomology*. 31(4):497-513.
26. Gassen, D. 1996. Manejo de pragas associadas a cultura do milho. Passo Fundo, Aldea Norte. 127 p.
27. Grazia, J.; Vecchio, M. C.; Balstieri, F. M. P.; Ramiro, Z. A. 1980. Study of the nymphs of the pentatomids (Heteroptera) that live on soybean (*Glycine max*(L.) Merrill): I-*Euchistus heros*(Fabricius, 1798) and *Piezodorus guildinii*(Westwood, 1837). *Revista de Entomologia de Brasil*. 9 (1):39-51.
28. Igarzábal, D.; Galvez, M.; Aldrey, M.; Peralta, C.; Cacciavillani, J.; Gassen, D. 2015. Chinchas principales especies en el cultivo de soja en Argentina. Orugas y chinchas en soja. In: Igarzábal, D. ed. Orugas y chinchas en soja. Buenos Aires, Argentina, Dupont y Summit Agro. s.p.
29. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, US). 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. (en línea). Ithaca, NY. s.p. (Brief no. 52.) Consultado ago. 2018 Disponible en <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>
30. Li, Y. H; Meissle, M.; Römeis, J. 2008. Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae ). *PLOS ONE*. 3(8):s.p.
31. \_\_\_\_\_; Römeis, J.; Wang, P.; Peng, Y. F.; Shelton, A. M. 2011. A comprehensive assessment of the effects of Bt cotton on *Coleomegilla maculata* demonstrates no detrimental effects by Cry1Ac and Cry2Ab. *PLOS ONE*. 6(10):s.p.
32. \_\_\_\_\_; Chen, X. D.; Hu, L.; Römeis, J.; Peng, Y. F. 2014a. Bt rice producing Cry1C protein does not have direct detrimental effects on the green lacewing *Chrysoperla sinica* (Tjeder). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33:1391-1397.

33. \_\_\_\_\_.; Hu, L.; Römeis, J.; Wang, Y.; Han, L.; Chen, X. D.; Peng, Y. F. 2014b. Use of an artificial diet system to study the toxicity of gut-active insecticidal compounds on larvae of the green lacewing *Chrysoperla sinica*. *Biological Control*. 69:45-51.
34. Lumbierres, B.; Starý, P.; Pons, X. 2011. Effect of Bt maize on the plant-aphid-parasitoid tritrophic relationships. *BioControl*. 56:133–143.
35. \_\_\_\_\_. Albajes, X.; Pons, X. 2012. Positive effect of Cry1Ab-expressing Bt maize on the development and reproduction of the predator *Orius majusculus* under laboratory conditions. *Biological Control*. 63:150-155.
36. Marvier M, McCreedy C, Regetz J, Kareiva P. 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on non-target invertebrates. *Science*. 316:1475–1477.
37. MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, UY.) 2019a. Estadísticas agropecuarias. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado ene. 2019. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-series-historicas,O,es,0>.
38. \_\_\_\_\_. Sistema nacional de bioseguridad. 2019b. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado may. 2019. Disponible en <http://www.sistemanacionaldebioseguridad.gub.uy/unidad-organizativa/bioseguridad/eventos-autorizados-y-en-proceso-de-analisis>
39. \_\_\_\_\_. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY.) 2017. Anuario estadístico agropecuario. (en línea). Montevideo. 214 p. Consultado ene. 2019. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>
40. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2018. Encuesta agrícola invierno 2018. (en línea). Montevideo. 34 p. (Serie Encuestas no. 353.) Consultado ene. 2019. Disponible en [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/publicacion\\_inv2018-cf.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/publicacion_inv2018-cf.pdf)

41. Monsanto. 2018. Intacta RR PRO. (en línea). Buenos Aires. s.p.  
Consultado ago. 2018. Disponible en  
<http://www.intactarr2pro.com.ar/control-plagas>
42. Naranjo S. 2005. Long-Term Assessment of the Effects of Transgenic Bt Cotton on the Abundance of Nontarget Arthropod Natural Enemies. *Environmental Entomology*. 34(5): 1193-1210.
43. \_\_\_\_\_. 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. (en línea). *Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*. 4(11):s.p.  
Consultado ene. 2019 Disponible en  
[https://www.researchgate.net/profile/Steven\\_Naranjo/publication/50382095\\_Impacts\\_of\\_Bt\\_crops\\_on\\_non-target\\_organisms\\_and\\_insecticide\\_use\\_patterns/links/0c960529f499ca0fe2000000/Impacts-of-Bt-crops-on-non-targetorganisms-and-insecticide-use-patterns.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/Steven_Naranjo/publication/50382095_Impacts_of_Bt_crops_on_non-target_organisms_and_insecticide_use_patterns/links/0c960529f499ca0fe2000000/Impacts-of-Bt-crops-on-non-targetorganisms-and-insecticide-use-patterns.pdf?origin=publication_detail)
44. OEA (Organización de Estados Americanos, US). 2009. Evaluación regional del impacto en la sostenibilidad de la cadena productiva de la soja: Argentina - Paraguay – Uruguay. Washington, D. C. 310 p.
45. Ochoa, R. F. 2012. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. In: Ochoa, R. F. ed. *Inmunoensayos enzimáticos: generalidades*. La Habana, Finlay. cap. 6, pp. 1-2.
46. Panizzi, A. R.; Parra, J. 1991. *Ecología nutricional de insectos e suas implicacoes no manjo de plagas*. Sao Pablo, Manole. 200 p.
47. Paula, D. P.; Andow, D. A. 2016. Differential Cry toxin detection and effect on *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* feeding on artificial diet. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 159:54-60.
48. Pellegrino, E.; Bedini. S.; Nuti, M.; Ercoli, L. 2018. Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data. *Nature. Scientific reports*. 8(1):s.p.

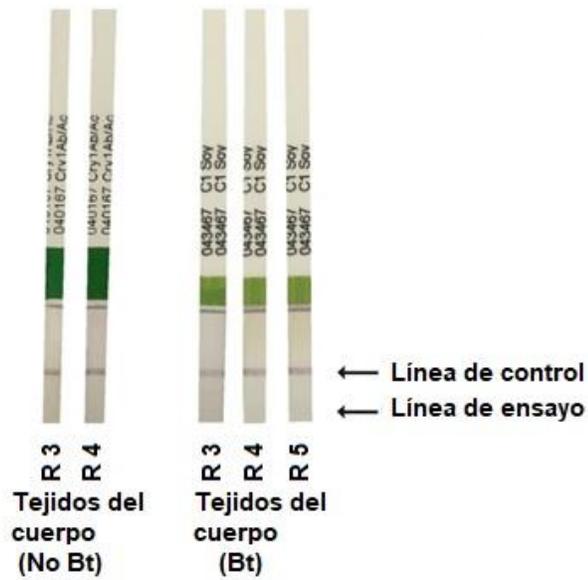
49. Peres, W.; Correa-Ferreira, B. 2004. Metodologia de multiplicação massal de *Telenomus podisi* Ash. e *Trissolcus basal* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae) em ovos de *Euschistus heros* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology. 33 (4): 457-462.
50. Pons, X.; Starý, P. 2003. Spring aphid-parasitoid (Hom., *Aphididae*, Hym., *Braconidae*) associations and interactions in a Mediterranean arable crop ecosystem, including Bt maize. Pest Science. 76:133-138.
51. Portela, D. D.; Chaparro, A.; López, S. A. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Nova. 11(20):87-96.
52. Ribeiro, A.; Castiglioni, E. 2008a. Caracterización de las poblaciones de enemigos naturales de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). Agrociencia (Uruguay). 12:48-56.
53. \_\_\_\_\_; Castiglioni, E.; Silva, H. 2008b. Insectos de la soja en Uruguay. Manual ilustrado de reconocimiento de plagas y enemigos naturales. Montevideo, Hemisferio Sur. 75 p.
54. Römeis, J.; Meissle, M.; Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nature Biotechnology. 24:63-71.
55. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 2011. Non-target risk assessment of Bt crop- cry protein uptake by aphid. Journal of Applied Entomology. 135:1-6.
56. Schünemann, R.; Knaak, N.; Fiuza, L. 2014. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. ISRN Microbiology. 2014: p. irr.
57. Silva, G. V.; Pasini, A.; Bueno, A. D. F.; Bortolotto, O. C.; Barbosa, G. C.; Cruz, Y. K. S. 2014. No impact of Bt soybean that express Cry1Ac protein on biological traits of *Euschistus heros* (Hemiptera, Pentatomidae) and its egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). Revista Brasileira de Entomologia. 58(3): 285-290.

58. Sisterson, M. S.; Carrière, Y.; Dennehy, T. J.; Tabashnik, B. E. 2007. Effects of the transgenic cotton on insecticide use and abundance of two generalist predators. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 124:305-311.
59. Soberón, M.; Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. (en línea). *Biotecnología*. 14:303-313. Consultado ago. 2018. Disponible en [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_27.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf)
60. Sosa-Gómez, D. R.; Moscardi, F. 1995. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24(2):401-404.
61. Temple, J. H. 2011. Redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood): Pest status, control strategies, and management in Louisiana soybean. (en línea). PhD. Diss. Baton Rouge, USA. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. s.p. Consultado ago. 2018. Disponible en [https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4690&context=gradschool\\_dissertations](https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4690&context=gradschool_dissertations)
62. Todd, J. W.; Turnipseed, S. M. 1974. Effects of southern green stink bug damage on yield and quality of soybeans. *Journy Economic Entomology*. 67:421-426.
63. Torres, J. B.; Ruberson, J. R.; Adang, M. J. 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1A protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agricultural and Forest Entomology*. 8:191-202.
64. Wang, Z.; Li, Y.; He, K. L.; Bai, S. X.; Zhang, T. T.; Cal, W. Z.; Wang, Z. Y. 2017. Does Bt maize expressing Cry1Ac protein have adverse effects on the parasitoid *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Science*. 24(4):599-612.
65. Yu, H.; Romeis, J.; Li, Y.; Li, X.; Wu, K. 2014. Acquisition of Cry1Ac Protein by Non-Target Arthropods in Bt Soybean Fields. *PLOS ONE*. 9(8):1-8.

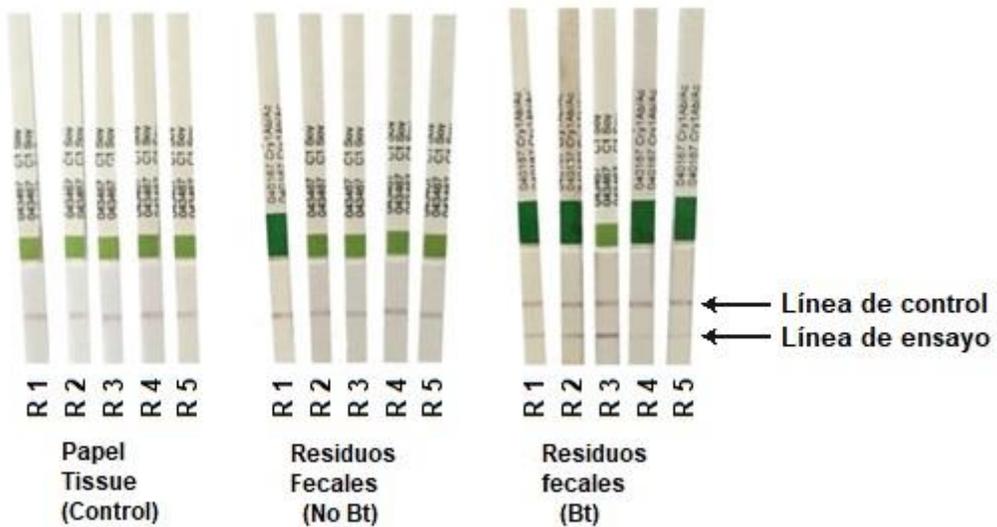
66. Zenner, I.; Álvarez, G. 2008. Analysis of the influence on the main main beneficial fauna by two transgenic cultivars, cotton and corn, at El Espinal (Tolima). *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*. 11(1):s.p.
67. Zerbino, S.; Alzugaray, R. 2010. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. *Piezodorus guildinii* (Westwood). In: Bentancourt, C.; Scatoni, I. eds. *Piezodorus guildinii* (Westwood). 3<sup>a</sup> ed. Montevideo, Hemisferio Sur. pp.141-142.
68. \_\_\_\_\_.; Altier, N. A.; Panizzi, A. R. 2016. Performance of nymph and adult of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cultivated legumes. *Neotropical Entomology*. 2:114-122.
69. Zhang, J. H.; Guo, J. Y.; Xia, J. Y.; Wan, F. H. 2012. Long-term effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton on the non-target *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) maintained for multiple generations. *African Journal of Biotechnology* 11:9873-9880.
70. Zwahlen, C.; Andow, D. A. 2005. Field evidence for the exposure of ground beetles to Cry1Ab from transgenic corn. *Environmental Biosafety Research*. 4: 113–117.

## 10. ANEXOS

Anexo No.1. Resultado de la verificación de la presencia de Cry1A(c) en los tejidos del resto del cuerpo de *Piezodorus guildinii*



Anexo No.2. Resultado de la verificación de la presencia de Cry1A(c) en los residuos fecales de *Piezodorus guildinii*



Anexo No.3. Resultado de la verificación de la presencia de Cry1A(c) en posturas de hembras de *Piezodorus guildinii* alimentadas con vainas Bt

