

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**ADAPTACIONES Y RESPUESTAS INDUCIDAS DE *PIEZODORUS*
GUILDINII (WESTWOOD, 1837) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) A
LAS VARIACIONES ESTACIONALES DEL AMBIENTE
Efecto del fotoperíodo, de la temperatura y del alimento en la biología,
fisiología y fenología**

por

Ing. Agr. (M.Sc.) María Stella Zerbino

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Doctora en
Ciencias Agrarias

MONTEVIDEO
URUGUAY
Octubre 2014

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Lic. Enrique Morelli, Dr. Ing. Agr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Ph.D. Trevor Jackson, Dr. Ing. Agr. Enrique Castiglioni, el 30 de octubre de 2014. Autor/a: Ing. Agr. M.Sc. María S. Zerbino. Director Ph.D. Ing. Agr. Antônio Ricardo Panizzi, Co-directora Ph.D. Ing. Agr. Nora Altier

Dedico este trabajo a mi familia

Nuestras horas son minutos
cuando esperamos saber,
y siglos cuando sabemos
lo que se puede aprender

(Antonio Machado)

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

Mis orientadores Ph.D. Ing. Agr. Antônio Panizzi y Ph.D. Ing. Agr. Nora Altier por su constante disposición y apoyo, orientación, invaluable consejos y sincera amistad. Particularmente, a Nora porque fue la persona que me propuso e impulsó a aceptar este desafío que de otra manera nunca lo hubiera realizado, y a Antonio por su generosidad en aceptar la orientación de esta tesis, por su permanente disposición a compartir sus conocimientos y transmitir su entusiasmo sobre la bioecología y nutrición de insectos.

Los integrantes del Comité de Seguimiento Dr. Ing. Agr. Enrique Castiglioni y Dra. Flávia A.C. Silva por dedicar tiempo para realizar contribuciones sustanciales durante la ejecución de esta tesis.

Los integrantes del tribunal Dr. Lic. Enrique Morelli, Dr. Ing. Agr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Ph.D. Trevor Jackson, y Dr. Ing. Agr. Enrique Castiglioni por su disposición a revisar, corregir y realizar aportes para mejorar la presentación de este trabajo.

La Facultad de Agronomía de la Universidad de la República por que me brindó la oportunidad de realizar esta actividad y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, particularmente a los Directores de los Programas de Producción Sustentabilidad y Ambiente Ph.D. Ing. Agr. José Terra y de Cultivos de Secano Ph.D. Ing. Agr. Jorge Sawchik, por haber apoyado la realización de esta tesis.

Mis colaboradores Mabel Pessio y Eduardo García por su invaluable ayuda y asistencia permanente en los trabajos de campo y de laboratorio.

La Lic. Lucía Miguel y la Ing. Agr. M.Sc. Noelia Casco por haber colaborado desinteresadamente en la ejecución de los experimentos de esta tesis.

Al Téc. Agr. Wilfredo Ibañez, por su asesoramiento en lo análisis estadísticos.

A la Ph.D. Ing. Agr. Isabel Sans por su disposición y dedicación a la corrección del formato de la tesis.

A la Ing. Agr. Elisabeth Carrega por su permanente disposición y gentileza para colaborar en todo lo referente a trámites administrativos.

Mis compañeras de INIA, Ph.D. Ing. Agr. Carolina Leoni y Ph.D. Ing. Agr. Silvia Pereyra, por su amistad, apoyo constante e invalorables consejos durante la ejecución de este trabajo.

A mi familia, particularmente a mi esposo Néstor por su constante cariño, permanente apoyo, ánimo y paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	IV
SUMMARY	XIII
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2. HIPÓTESIS	3
1.3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	3
1.4. ESQUEMA GENERAL DE LA TESIS.....	4
2. <u>OCURRENCIA ESTACIONAL DE <i>PIEZODORUS GUILDINII</i> EN DIFERENTES ESPECIES VEGETALES Y SITIOS DE HIBERNACIÓN</u>	6
2.1. RESUMEN	6
2.2. ABSTRACT.....	7
2.3. INTRODUCCIÓN.....	8
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.5. RESULTADOS	11
2.5.1 <u>Prospección de <i>Piezodorus guildinii</i> en diferentes ambientes: especies y sitios de hibernación</u>	11
2.5.1. <u>Ocurrencia estacional de ninfas y adultos en las principales especies vegetales y en los sitios de hibernación preferidos</u>	13
2.6. DISCUSIÓN.....	16
2.7. CONCLUSIONES.....	19
2.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

3. <u>ROL DE LAS PRINCIPALES ESPECIES VEGETALES EN LA BIOLOGÍA (NINFAS Y ADULTOS) Y COMPORTAMIENTO ALIMENTAR (ADULTOS) DE <i>PIEZODORUS GUILDINII</i></u>	24
3.1. RESUMEN	24
3.2. ABSTRACT	25
3.3. INTRODUCCIÓN.....	26
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.4.1. <u>Rutina de mantenimiento de la cría de insectos</u>	28
3.4.2. <u>Biología de ninfas</u>	29
3.4.3. <u>Biología de adultos</u>	29
3.4.4. <u>Preferencia alimentaria</u>	30
3.4.5. <u>Análisis de datos</u>	31
3.5. RESULTADOS	32
3.5.1. <u>Biología de ninfas</u>	32
3.5.1.1. Supervivencia y mortalidad total.....	32
3.5.1.2. Tiempo de desarrollo.....	35
3.5.1.3. Peso fresco en la emergencia de los adultos	35
3.5.2. <u>Biología de adultos</u>	36
3.5.2.1. Supervivencia y longevidad	36
3.5.2.2. Desempeño reproductivo.....	38
3.5.2.3. Ganancia de peso.....	39
3.5.3. <u>Preferencia alimentaria de adultos</u>	42
3.6. DISCUSIÓN.....	42
3.6.1. <u>Biología de ninfas</u>	43
3.6.2. <u>Biología de adultos</u>	45
3.6.3. <u>Preferencia alimentaria</u>	48

3.7. CONCLUSIONES.....	49
3.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
4. <u>EFFECTO DE LOS FACTORES ABIÓTICOS (TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO) EN LA BIOLOGÍA DE <i>PIEZODORUS GUILDINII</i></u>	55
4.1. RESUMEN	55
4.2. ABSTRACT.....	56
4.3. INTRODUCCIÓN	57
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	58
4.4.1. <u>Rutina de mantenimiento de la cría de insectos</u>	58
4.4.2. <u>Biología de huevos y ninfas</u>	59
4.4.3. <u>Biología de adultos</u>	60
4.4.4. <u>Análisis de datos</u>	61
4.5. RESULTADOS	62
4.5.1. <u>Biología de huevos</u>	62
4.5.2. <u>Biología de ninfas</u>	64
4.5.2.1. Supervivencia y mortalidad total.....	64
4.5.2.2. Tiempo de desarrollo.....	65
4.5.2.3. Peso fresco de los adultos en la emergencia	66
4.5.3. <u>Biología de adultos</u>	67
4.5.3.1. Supervivencia y longevidad	67
4.5.3.2. Desempeño reproductivo.....	69
4.5.3.3. Ganancia de peso.....	71
4.6. DISCUSIÓN.....	72
4.6.1. <u>Biología de huevos</u>	73
4.6.2. <u>Biología de ninfas</u>	74
4.6.3. <u>Biología de adultos</u>	77

5.5.1.4. Actividad alimentaria	104
5.5.2. <u>Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos de adultos colectados en el campo</u>	105
5.5.2.1. Tamaño y coloración del cuerpo	105
5.5.2.2. Contenido de lípidos.....	110
5.5.2.3. Desarrollo de los órganos reproductivos.....	111
5.6. DISCUSIÓN.....	114
5.6.1. <u>Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfología y fisiología de adultos</u>	114
5.6.2. <u>Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos de adultos colectados en el campo</u>	119
5.7. CONCLUSIONES.....	121
5.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
6. <u>DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	127
6.1. DISCUSIÓN GENERAL	127
6.2. CONCLUSIONES.....	133
6.3. PERSPECTIVAS	134
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	136
8. <u>ANEXOS</u>	148
8.1. EFFECT OF PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE ON NYMPHAL DEVELOPMENT AND ADULT REPRODUCTION OF <i>PIEZODORUS GUILDINII</i> (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)	148
8.2. PHENOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN ADULT <i>PIEZODORUS GUILDINII</i> (HEMIPTERA:	

PENTATOMIDAE) DUE TO VARIATION IN PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE	159
8.3. SEASONAL OCCURRENCE OF <i>PIEZODORUS GUILDINII</i> ON DIFFERENT PLANTS INCLUDING MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES.....	169

RESUMEN

Piezodorus guildinii (Westwood, 1837) es el hemíptero fitófago que causa las mayores pérdidas económicas en el cultivo de soja en Uruguay, porque es la especie más abundante, y la que causa los mayores daños. Para implementar programas de manejo holísticos es necesario comprender como los factores bióticos y abióticos determinan la estacionalidad de los insectos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos del fotoperíodo, de la temperatura y de distintos alimentos en la biología y en el desarrollo de adaptaciones y respuestas inducidas de *P. guildinii*. Los resultados indican que el alimento (disponibilidad y calidad), y las condiciones de la fotoperíodo y temperatura son fundamentales en la regulación de su estacionalidad. Entre 33° 55' y 34° 17' de Latitud S se registró su presencia en 15 especies vegetales y cinco sitios de hibernación. En leguminosas forrajeras fueron colectados adultos y ninfas, mientras que en plantas perennes y sitios de hibernación sólo adultos. En alfalfa los adultos estuvieron presentes casi todo el año. Este insecto alimentado con vainas inmaduras de alfalfa tuvo mejor desempeño (menor mortalidad de ninfas, adultos más longevos y ♀ con un rendimiento reproductivo superior) que en las otras leguminosas forrajeras, lo que demuestra que es una planta huésped importante en la historia de la vida. Los resultados de los ensayos de laboratorio y del relevamiento de campo indican que cuando la fotofase es ≤ 12 h y la temperatura se encuentra por debajo de 20 °C, un alto porcentaje de adultos se encuentra en estado de diapausa reproductiva, con acumulación de reserva energéticas, órganos reproductivos inmaduros, tamaño del cuerpo más pequeño, con menor frecuencia en la actividad alimentaria, y ♀ con coloración de la banda del pronoto y del conectivo más clara. En la región de estudio, la alfalfa es el cultivo en el que se deben concentrar los esfuerzos para desarrollar tácticas de manejo eficientes a ser aplicadas durante la primavera, de modo de impedir el desarrollo de la población que coloniza la soja.

Palabras clave: *Piezodorus guildinii*, alimento, fotoperíodo, temperatura, diapausa

SUMMARY

ADAPTATION AND INDUCED RESPONSE OF *PIEZODORUS GUILDINII* (Westwood, 1837) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TO SEASONAL VARIATIONS: Effect of the photoperiod, temperature and food on the biology, physiology and phenology

Piezodorus guildinii (Westwood) is the hemipteran phytophagous that may cause major economic losses in the soybean crop in Uruguay, because it is the most abundant species, and causing major damage. To implement holistic pest management programs, it is necessary to understand how the biotic and abiotic factors influence on the seasonality of this insect. This research had as objective to evaluate the effects of photoperiod, temperature, and different foods in the biology and in the development of adaptations and induced responses of *P. guildinii*. Results allowed to establish that the food (availability and quality), and the photoperiod and temperature conditions are critical in regulating the seasonality of *P. guildinii*. Between 33 ° 55 'and 34 ° 17' S latitude, *P. guildinii* was recorded on 15 plants species and on five niches of hibernation. In forage legumes adults and nymphs were collected, while in perennial plantas and winterniches only adults were captured. In alfalfa adults were present almost the entire year. This insect fed on immature pods alfalfa had better performance (lower nymphs' mortality, higher adult longevity, and ♀ with reproductive performance) than other forage legumes, demonstrating that alfalfa is an important host in life history. Laboratory results and field survey indicate that when photophase is ≤ 12 h and the temperature is below 20 °C, a high percentage of adult enters in reproductive diapause; they accumulate energy reserves, show immature reproductive organs and smaller body size, present less frequent food activity, and ♀ show clear coloration of the pronotum band and of the connexivum. Results suggest that alfalfa is the crop on which efforts should be concentrated in order to develop efficient management tactics to be applied during spring; this should prevent the development of stink bug populations that will colonize the soybean. Keywords: *Piezodorus guildinii*, food, photoperiod, temperature, diapause

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. JUSTIFICACIÓN

El complejo de hemípteros fitófagos, conocido vulgarmente como chinches, es el grupo de insectos que tiene el mayor potencial de causar pérdidas económicas en el cultivo de soja en el Uruguay. Los daños que producen en los tejidos vegetales resultan de la frecuencia de introducción de los estiletes y de la duración del período de alimentación, asociados a las secreciones salivales que producen durante el período de alimentación las cuales pueden ser tóxicas y causar necrosis (Panizzi, 2000). Como resultado de su alimentación, pueden inutilizar las semillas, o reducir su viabilidad dando origen a plántulas de escaso vigor, también afectan la producción de grano, pueden alterar el contenido de aceite y proteína, y afectar el metabolismo de las plantas impidiendo una maduración adecuada (Panizzi, 2000). En nuestro país, las especies presentes en este cultivo son *Piezodorus guildinii* (Westwood), *Nezara viridula* (L.), *Dichelops furcatus* (Fabr.) y *Edessa mediatubunda* (Fabr.). De todas ellas, la de mayor importancia económica es *P. guildinii*, porque es la más abundante (Zerbino, 2007, 2009, 2010; Zerbino *et al.*, 2010) y la que causa los mayores daños en la superficie y profundidad de los granos (Depieri y Panizzi, 2011).

Los hemípteros fitófagos presentes en el cultivo de soja tienen algunas características que dificultan su manejo. Causan daños económicos aún en bajas densidades. Como consecuencia de la dispersión de adultos se puede producir un aumento rápido de las poblaciones, por lo que es frecuente la necesidad de realizar aplicaciones adicionales de insecticidas para mantener las poblaciones debajo de los niveles de daño. A estas características se suma su tolerancia intrínseca a los principios activos que son comúnmente utilizados, por lo que las opciones con probada eficiencia son escasas (Corso y Gazzoni, 1998; Gazzoni, 2012; Panizzi, 2013).

Estos insectos, exploran 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. En primavera-verano, se alimentan y crían en plantas cultivadas. Posteriormente, durante el otoño, a medida que los cultivos de soja maduran y son cosechados, se dispersan hacia plantas hospederas que pueden ser cultivadas o silvestres, en las cuales pueden o no alimentarse y reproducirse. Finalmente, en el invierno cuando el ambiente es desfavorable pueden permanecer en ellas o ir a ocupar otros sitios de hibernación (Panizzi y Parra, 2009).

Para poder implementar programas de manejo, holísticos, eficientes y ecológicamente compatibles, es necesario comprender los factores bióticos y abióticos involucrados en la estacionalidad de estos insectos. Es necesario conocer las plantas que utilizan para el desarrollo de las distintas generaciones y la secuencia en que las 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. Los parámetros biológicos como la duración del estado de ninfa, la supervivencia, la longevidad de los adultos y producción de huevos son extremadamente variables con las distintas especies vegetales, por lo que indican diferencias en la calidad del alimento ingerido (Panizzi, 1997; Panizzi y Parra, 2009). Como consecuencia de la distribución geográfica de las especies vegetales, las poblaciones locales de hemípteros tienen hábitos de alimento específicos, razón por la cual información validada para determinada localidad puede ser inadecuada para otra (Panizzi, 1997). Por ello que es necesario realizar estudios locales para conocer los huéspedes alternativos y establecer las secuencias de plantas huéspedes utilizadas por cada especie de hemípteros en una localidad determinada, que debe ser totalmente comprendida considerando los factores abióticos como régimen pluviométrico, el fotoperíodo y el rango de temperaturas favorables que permita la reproducción (Panizzi y Parra, 2009). Con estos estudios se puede establecer cuál es la especie vegetal más importante en la historia de vida del insecto, de manera de concentrar en los esfuerzos para desarrollar tácticas de manejo que mitiguen el impacto de las chinches en los cultivos de soja.

El conocimiento sobre la ecología de *P. guildinii* a nivel internacional (Antônio Panizzi, 2010 com. pers.) y nacional es reducido (Ribeiro *et al.*, 2009; Zerbino *et al.*, 2010). Se desconoce la estrategia de sobrevivencia durante el período de ausencia del hospedero preferido y cuando los factores abióticos son desfavorables (Castiglioni *et al.*, 2008; Zerbino *et al.*, 2010). Por lo que es necesario realizar estudios que proporcionen información para responder preguntas tales como: en qué momento los adultos se dispersan desde y hacia las cultivadas; cuál es la performance de las ninfas y los adultos cuando se alimentan de plantas hospederas alternativas y que estrategia utilizan para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables.

1.2. HIPÓTESIS

El fotoperíodo, la temperatura y el tipo de alimento afectan la biología de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) y determinan el desarrollo de adaptaciones y respuestas inducidas

1.3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

El propósito de este trabajo es obtener información que contribuya al desarrollo de tácticas de manejo para el período de la entezafra. Para ellos se planteó como objetivo general: evaluar los efectos del fotoperíodo, de la temperatura y de distintos alimentos en la biología y en el desarrollo de adaptaciones y respuestas inducidas de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837); y como objetivos específicos:

1. Determinar las plantas hospederas alternativas y/o sitios de hibernación más importantes que *Piezodorus guildinii* habita durante la ausencia del cultivo de soja.
2. Determinar el rol que cumplen las principales especies vegetales donde fue encontrada *Piezodorus guildinii* durante la entre zafra. Evaluar el desarrollo de las ninfas, longevidad de los adultos, ganancia de peso, performance reproductiva, cambios fenológicos en distintos alimentos y preferencia alimentar (alfalfa, trébol rojo y lotus, etc.).

3. Evaluar el efecto del fotoperíodo y de la temperatura en el desarrollo de las ninfas, longevidad de los adultos, ganancia de peso, performance reproductiva, actividad alimentaria y cambios morfológicos y fisiológicos de *Piezodorus guildinii*.
4. Verificar en campo la información generada en el laboratorio sobre los cambios morfológicos y fisiológicos de adultos de *Piezodorus guildinii*.

1.4. ESQUEMA GENERAL DE LA TESIS

Esta tesis fue organizada en seis capítulos. En cuatro de ellos (capítulos 2, 3, 4 y 5) se presentan los resultados de los experimentos realizados para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto de investigación. Las normas utilizadas para su redacción son las que establece la Revista Agrociencia Uruguay.

La información generada en esta tesis permitió elaborar cuatro artículos científicos para revistas arbitradas. Dos de ellos ya fueron publicados.

En el año 2013 fue aceptado y publicado en el Florida Entomologist [96 (2): 572 – 58] el artículo “Effect of photoperiod and temperature on nymphal development and adult reproduction of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae)”, cuyos autores fueron Zerbino, M.S.; Altier, N.A. y Panizzi, A.R. En este trabajo se presenta la información generada en los experimentos descritos en el Capítulo 4, en los que se evaluó el efecto del fotoperíodo y la temperatura en la biología de ninfas y adultos

El segundo trabajo que fue aceptado y publicado en Florida Entomologist [97(2): 734 – 743] en el año 2014, se tituló “Phenological and physiological changes in adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) due to variation in photoperiod and temperature”, y los autores fueron Zerbino, M.S.; Altier, N.A. y Panizzi, A.R. Este artículo fue elaborado con la información obtenida en los distintos experimentos de laboratorio que se describen en el Capítulo 5, y que tuvieron por objetivo establecer los cambios morfológicos y fisiológicos en adultos de *Piezodorus guildinii* que se producen como consecuencia de las variaciones en el fotoperíodo y la temperatura.

El tercer artículo cuyos autores son Zerbino, M.S.; Altier, N.A. y Panizzi, A.R., se titula “Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes”, fue aceptado para publicar el 29/10/2014 en el Journal of Pest Science (DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2). Este trabajo fue elaborado a partir de la información obtenida en el relevamiento de campo realizado durante dos años en diferentes especies vegetales y sitios de hibernación, y que se presenta en los Capítulos 2 y 5.

El cuarto trabajo está en proceso de redacción. En él se van a publicar los resultados obtenidos en la biología comparada con diferentes alimentos, los cuales están presentados en el Capítulo 3.

2. OCURRENCIA ESTACIONAL DE *PIEZODORUS GUILDINII* EN DIFERENTES ESPECIES VEGETALES Y SITIOS DE HIBERNACIÓN

2.1. RESUMEN

Piezodorus guildinii (Westwood), es un pentatómido que habita desde el sur de Estados Unidos hasta el Cono Sur de América del Sur. Durante dos años fueron realizados muestreos semanales con el objetivo de identificar algunas de las plantas huéspedes potenciales, y sitios de hibernación, así como también conocer la ocurrencia estacional de adultos y ninfas. En el primer año de muestreo, el insecto fue colectado en 12 especies vegetales y cinco sitios de hibernación. *Medicago sativa* L., *Trifolium pratense* L., *Lotus corniculatus* L. (Leguminosae), *Pittosporum undulatum* Ventenat (Pittosporaceae), *Ligustrum lucidum* Aiton (Oleaceae), y *Phyllostachys* sp. (Poacea), y hojarasca de *Eucaliptus* sp. (Myrtaceae) fueron los ambientes donde el insecto fue observado con mayor frecuencia y durante períodos más prolongados. Por ello, fueron las especies vegetales y sitios de hibernación donde se repitieron los muestreos en el segundo año. Los resultados obtenidos indican que entre las Latitudes S 33° 55' y 34° 17', durante la primavera-verano en leguminosas cultivadas ocurren al menos dos generaciones. Mientras que en las leguminosas forrajeras fueron colectados adultos y ninfas, en las plantas perennes y sitios de hibernación sólo fueron observados adultos. El período de actividad en las leguminosas forrajeras fue entre la primavera y el otoño. En alfalfa la abundancia de ninfas y adultos fue mayor que en las otras especies leguminosas y los adultos fueron colectados casi todo el año. En *P. undulatum*, *L. lucidum*, y *Phyllostachys* sp., los adultos fueron interceptados en mayor cantidad entre el comienzo y la mitad del otoño (abril y mayo), disminuyendo posteriormente, y no fueron recuperados durante el final de la primavera y los meses de verano. Los adultos fueron encontrados debajo de la hojarasca de eucaliptus durante otoño e invierno, con un máximo en julio. Los resultados indican que la alfalfa es el huésped alternativo preferido, y es el principal enlace antes y después del cultivo de soja.

Palabras clave: *Piezodorus guildinii*, plantas huéspedes, sitios de hibernación, ocurrencia estacional

2.2. ABSTRACT

Piezodorus guildinii (Westwood) is a pentatomid found from southern United States to the South Cone of South America. In order to identify potential host plants and overwintering niches, and to know the seasonal occurrence of adults and nymphs, different plants species and overwintering niches were sampled weekly during two years. In the first year of sampling insects were collected on 12 different plant species and five overwintering niches. *Medicago sativa* L., *Trifolium pratense* L., *Lotus corniculatus* L. (Leguminosae), *Pittosporum undulatum* Ventenat (Pittosporaceae), *Ligustrum lucidum* Aiton (Oleaceae), and *Phyllostachys* sp. (Poacea), and leaf litter of *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) were the environments where the insect was observed more frequently and during a larger period. For these reasons these plant species and overwintering niche were sampled for a second year. The results obtained indicate that at least two generations occur in cultivated legumes during spring-summer at the Latitude S between 33° 55' and 34° 17'. While adults and nymphs were caught in legumes; in shrubs, bamboo and eucalyptus litter, only adults were observed. The period of activity in forage legumes was from spring to autumn. Alfalfa was the species on which adults were collected for almost a year. Abundance of nymphs and adults on this plant was greater compared with other forage legumes. In *P. undulatum*, *L. lucidum*, and *Phyllostachys* sp., adults were intercepted in greater numbers during early and middle autumn (April and May), decreasing thereafter, and they were not recovered during late spring and summer months. Adults were found underneath eucalyptus litter during autumn and winter, with a maximum in July. The results suggest that alfalfa is the preferred alternative host among the three forage legumes, so that it would be the main link before and after soybean cultivation.

Key words: *Piezodorus guildinii*, host plants, overwintering sites, seasonal occurrence

2.3. INTRODUCCIÓN

La variación intra-anual de los factores abióticos y bióticos determina que los insectos sólo tengan condiciones adecuadas para el crecimiento, desarrollo y reproducción en algunas estaciones. La disponibilidad de alimento, el fotoperíodo y la temperatura son los principales factores que regulan la dinámica estacional de los hemípteros fitófagos (Panizzi y Silva, 2009). El conocimiento de la estacionalidad de los insectos plaga y de los factores involucrados en la misma, son fundamentales para implementar programas de manejo de insectos holísticos, eficientes y ecológicamente compatibles (Giese *et al.*, 1975; Panizzi, 1997; Panizzi y Parra, 2009).

La abundancia y disponibilidad de semillas son factores fundamentales en la regulación de las dinámicas poblacionales de los hemípteros fitófagos en los diversos ecosistemas. Cuando la planta preferida es un cultivo anual, que es una fuente nutricional efímera, necesitan una sucesión de plantas huéspedes para el desarrollo de las sucesivas generaciones durante la estación de crecimiento (Panizzi, 1997; Panizzi y Silva, 2009).

Las especies que causan daños en soja comienzan a colonizar el cultivo cuando se inicia la formación de vainas y lo abandonan en el momento de la cosecha (Panizzi *et al.*, 1980; Costa y Link, 1982; Panizzi, 2000; Panizzi y Silva, 2009; Zerbino *et al.*, 2010). Los adultos se pueden desplazar a otras plantas huéspedes donde se reproducen y desarrollan, y/o dispersar a plantas alternativas, las cuales son utilizadas como abrigo y eventualmente como fuente de nutrientes y agua, pero donde generalmente no se reproducen. También se pueden trasladar a sitios de hibernación, como los rastrojos de cultivos, la hojarasca o la corteza de los árboles, que son utilizados como refugios (Panizzi, 1997; Panizzi, 2000; Panizzi y Silva, 2009). Estos tres tipos de estrategias, plantas huéspedes y alternativas, y sitios de hibernación, son eslabones esenciales en la intrincada historia de vida de los hemípteros, los cuales generalmente han sido subestimados (Panizzi, 2000).

Existe una asociación estrecha entre las plantas hospederas y los distintos hemípteros fitófagos. *Piezodorus guildinii*, es la especie menos polífaga y su ciclo

transcurre exclusivamente en leguminosas (Panizzi, 1997). Además de la soja, la lista de plantas en las que se alimenta incluye otras de importancia económica como arveja *Pisum sativum* L., poroto *Phaseolus vulgaris* L., lenteja *Lens culinaris* Medik., y leguminosas forrajeras (alfalfa *Medicago sativa* L., lotus *Lotus corniculatus* L. y Trébol rojo *Trifolium pratense* L.) (Panizzi *et al.*, 2000b; Ribeiro y Castiglioni, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009; Castiglioni *et al.*, 2010). La presencia de este insecto también ha sido reportada en muchas especies vegetales no leguminosas, las cuales probablemente sean utilizadas como abrigo (Lopes *et al.*, 1974; Ferreira y Panizzi, 1982; Panizzi y Slansky, 1985b; Costa *et al.*, 1995; Panizzi, 1997; Panizzi y Grazia, 2001; Bunde *et al.*, 2010; Garlet *et al.*, 2010).

Los movimientos de *P. guildinii* desde y hacia la soja y la secuencia de plantas hospederas utilizadas fueron estudiados en el estado de Paraná en Brasil (Panizzi, 1997). En la entrefra del cultivo de soja, el insecto coloniza leguminosas silvestres como *Crotalaria* sp., *Cajanus cajan* (L.) Mills., y distintas especies del género *Indigofera*, en las cuales se alimenta. Las poblaciones locales de hemípteros fitófagos tienen hábitos de alimento específicos, como consecuencia de la distribución geográfica de las especies vegetales, por lo que es necesario determinar la sucesión de plantas huéspedes en cada localidad. Ésta debe ser comprendida considerando los factores abióticos como régimen pluviométrico, rango de temperaturas favorables y condiciones del fotoperíodo que permitan la reproducción (Panizzi y Parra, 2009). En Uruguay, la secuencia de plantas que utiliza este insecto durante el año, es poco conocida (Ribeiro y Castiglioni, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009, Zerbino *et al.*, 2010). El objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento sobre las especies vegetales y/o los hábitats donde *P. guildinii* se encuentra en el período de la entrefra, estudiar la estacionalidad del insecto y determinar la secuencia de plantas que son utilizadas por las diferentes generaciones.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante dos años, entre mayo del 2011 y abril del 2013, fueron realizados muestreos en cuatro localidades del Departamento de Colonia: La Estanzuela, San

Pedro, Nueva Helvecia y Ombúes de Lavalle. (Latitud S entre 33° 55' y 34° 17'; Longitud W entre 57° 13' y 57° 46'), con el propósito de identificar potenciales plantas huéspedes y de estudiar la estacionalidad del insecto. En el primer año los muestreos tuvieron como objetivo realizar una prospección de especies vegetales donde *P. guildinii* está presente.

Las situaciones consideradas fueron:

- Leguminosas forrajeras: alfalfa – *M. sativa*, lotus- *L. corniculatus*, trébol rojo- *T. pratense*.
- Restos culturales de soja y sorgo y áreas linderas
- Corteza de árboles
- Hojarasca en montes
- Distintos arbustos

Fue necesario utilizar diferentes métodos de muestreo de acuerdo al tipo de vegetación, y particularmente en las leguminosas forrajeras según el momento del año en que fueron realizados los muestreos. En los arbustos, sobre un paño blanco de 1m² se golpeó el follaje de las plantas, 10 veces en cada especie vegetal. En leguminosas forrajeras, en cinco sitios de muestreo de cada especie, desde fines del invierno (setiembre) a fines de otoño (junio) los muestreos fueron realizados con una red entomológica de 38 cm de diámetro, dando 100 segadas en cada sitio de muestreo. Entre junio y setiembre, cuando los adultos se encuentran en la superficie del suelo, fue colocado un marco de hierro de 1 m² en un área seleccionada al azar, donde se retiró la vegetación y los residuos y fueron buscados los insectos; este procedimiento fue repetido 10 veces, lo que totaliza 10m² en cada sitio de muestreo. En los restos culturales de soja y sorgo, y en las áreas linderas de estos cultivos, así como también en la hojarasca de montes de eucaliptus, se utilizó el método del marco de hierro, el cual también se repitió 10 veces en cada lugar de muestreo. En el caso de la corteza de árboles, en cada sitio de muestreo en 20 árboles de cada especie se desprendió la misma y se observó la presencia de adultos. Los adultos y ninfas colectados fueron identificados por su origen, con la fecha de colecta y la especie

vegetal y/o hábitats, y en el laboratorio fueron muertos por congelamiento. Estos muestreos fueron repetidos semanalmente.

Con la información obtenida en el primer año, y a los efectos de completar los dos años de muestreo para realizar el estudio de la estacionalidad, fueron seleccionados las especies vegetales y los hábitat donde *P. guildinii* fue más abundante y observado durante un período prolongado. De acuerdo a estos criterios, en el segundo año los muestreos fueron continuados en alfalfa *M. sativa*, trébol rojo *T. pratense*, lotus *L. corniculatus* (Leguminosae), azarero *Pittosporum undulatum* Ventenat (Pittosporaceae), ligustro *Ligustrum lucidum* Aiton (Oleaceae), cañas *Phyllostachys* sp. (Poacea); y hojarasca de *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) (Cuadro 2.1). Para cada una de estas especies vegetales se calculó el porcentaje de constancia (C%) = N° de muestreos donde los insectos estuvieron presentes/N° total de muestreos realizados en cada situación (especie vegetal y/o hojarasca).

2.5. RESULTADOS

Prospección de *Piezodorus guildinii* en diferentes ambientes: especies y sitios de hibernación

Durante el primer año de muestreo *P. guildinii* fue observado en 12 especies vegetales y cinco ambientes; posteriormente en el segundo año de muestreo fue registrado en otras tres especies (Cuadro 2.1). De todos ellos, alfalfa, trébol rojo, lotus, azarero, ligustro, cañas, y hojarasca de *Eucalyptus* sp. fueron las especies y los hábitats donde fue más frecuente y se le registró durante un período más prolongado de tiempo. En siete situaciones, su presencia sólo se registró en un único muestreo; y el número de insectos observados varió de uno (raigrás *Lolium multiflorum* Lam. y catalpa *Catalpa bignonioides* Walter) a tres (gramilla *Cynodon dactylon* (L.) Pers., al borde de cultivos de soja).

Cuadro 2.1. Resultados de la prospección de *Piezodorus guildinii* en el período 2011-2012. Especies vegetales/ambientes y número de muestreos en los que fueron colectados insectos, y período de colecta.

Espece Vegetal/ ambiente	Familia	Total de adultos	Total de ninfas	Nº de muestreos con colecta	Período
<i>Medicago sativa</i>	Leguminosae	725	1829	101	set-jul
<i>Lotus corniculatus</i>	Leguminosae	140	94	32	dic-jul
<i>Trifolium pratense</i>	Leguminosae	90	28	20	nov-jun
<i>Pittosporum undulatum</i>	Pittosporaceae	38	0	19	mar-oct
<i>Ligustrum lucidum</i>	Oleaceae	24	0	11	abr-set
Hojarasca <i>Eucalyptus</i>		24	0	11	abr-set
<i>Phyllostachys sp.</i>	Poaceae	19	0	8	may-jun
Corteza <i>Eucalyptus</i>		13	0	8	jul-oct
<i>Myrcianthes pungens</i>	Myrtaceae	31	0	5	may-jun
<i>Zea mays</i>	Poaceae	50	0	4	may-jul
Rastrojo soja		10	0	4	abr-may
<i>Psidium sp.</i>	Myrtaceae	7	0	1	may-jul
<i>Cynodon dactylon</i>		3	0	1	abr
<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtaceae	2	0	1	may
Rastrojo sorgo		2	0	1	jul
<i>Lolium multiflorun</i>	Poaceae	1	0	1	set
<i>Catalpa bignonioides</i>	Bignoniaceae	1	0	1	abr
<i>Grevillea robusta</i>	Proteaceae	32	0	11	mar-oct*
<i>Cotoneaster lacteus</i>	Rosaceae	33	0	10	abr-set*
<i>Acacia melanoxylon</i>	Leguminosae	17	0	6	may-oct*

*Especies donde se registró la presencia del insecto en el segundo año de muestreo

2.5.1. Ocurrencia estacional de ninfas y adultos en las principales especies vegetales y en los sitios de hibernación preferidos

Durante los dos años de muestreos fueron colectados 4470 insectos. Aproximadamente, la mitad de ellos fueron adultos (2246), y ambos sexos estuvieron representados en similar proporción (1125 machos y 1121 hembras) (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Número total de adultos y ninfas de *Piezodorus guildinii* colectados en los diferentes meses de año en el suroeste del departamento de Colonia, Uruguay (2011-2013).

Meses	Año 1			Año 2		
	Machos	Hembras	Ninfas	Machos	Hembras	Ninfas
Octubre	17	20	0	30	35	0
Noviembre	28	20	6	21	25	1
Diciembre	21	25	32	21	46	4
Enero	150	122	1432	38	54	6
Febrero	74	69	110	120	119	187
Marzo	64	65	163	31	49	74
Abril	148	115	82	38	52	119
Mayo	66	67	4	138	129	4
Junio	8	6	0	40	30	0
Julio	19	25	0	22	28	0
Agosto	6	2	0	13	10	0
Setiembre	4	4	0	8	4	0
Total	605	540	1829	520	581	395

En la Figura 2.1 se presenta la ocurrencia estacional de adultos y ninfas en las diferentes plantas y sitios de hibernación. En las leguminosas forrajeras fueron colectados adultos y ninfas, mientras que en el azarero, el ligustro, las cañas, y la hojarasca de eucaliptus sólo fueron interceptados adultos. En alfalfa, los adultos de

Cuadro 2.3. Porcentaje de constancia, número total y porcentaje de adultos y ninfas de *Piezodorus guildinii* colectados en diferentes plantas y sitios de hibernación en el suroeste del Departamento de Colonia, Uruguay (2011-2013).

Especies vegetales/ Sitios de hibernación	C ¹ %	Adultos		Ninfas	
		Total	%	Total	%
<i>Medicago sativa</i>	55,2	1624	72,3	2073	93,2
<i>Lotus corniculatus</i>	30,8	193	8,6	107	4,8
<i>Trifolium pratense</i>	27,3	145	6,4	44	2,0
<i>Pittosporum undulatum</i>	28,6	143	6,4	-	-
<i>Ligustrum lucidum</i>	18,4	55	2,4	-	-
<i>Phyllostachys sp.</i>	20,4	27	1,2	-	-
Hojarasca <i>Eucalyptus</i> sp.	29,0	59	2,6	-	-

¹Porcentaje de constancia (C) = N° de muestreos donde fueron colectados insectos/N° total de muestreos.

En las leguminosas forrajeras se registraron dos períodos donde la abundancia de adultos y ninfas fueron máximas, que fueron similares en las tres especies (Cuadro 2.3). En particular en alfalfa, la abundancia en el primero fue mayor que en el segundo, fundamentalmente para los registros de ninfas (estos datos no son presentados). En las otras dos leguminosas forrajeras las diferencias en la abundancia de ninfas y adultos, en los dos momentos de máxima colecta, fueron menos notorias.

En los arbustos (azarero y ligustro), los adultos de *P. guildinii* tuvieron una ocurrencia estacional y momento de máxima captura semejantes; fueron colectados desde el final del verano hasta el comienzo de la primavera (marzo a octubre) (Figura 2.1), y en abril la captura fue máxima (Cuadro 2.3). Sin embargo, el porcentaje de constancia y el número total de adultos colectados fueron mayores en el azarero que en el ligustro, esta última fue la especie vegetal en la cual se colectó el menor número de adultos y el porcentaje de constancia fue menor (Cuadro 2.3). En las cañas, los adultos comenzaron a ser observados un mes más tarde (mayo) que en los arbustos, y fueron colectados hasta el inicio de la primavera (octubre) (Figura 2.1). La máxima captura se realizó entre mayo y junio (Cuadro 2.3). En estas tres especies, luego del registro de máxima captura y hasta octubre, el número de insectos colectados disminuyó continuamente, y entre noviembre y marzo los adultos estuvieron ausentes (Figura 2.1).

Los adultos fueron encontrados debajo de la hojarasca de eucaliptus a partir del mes de abril y el máximo poblacional se registró en julio (Figura 2.1, Cuadro 2.3). El porcentaje de constancia obtenido fue similar al de lotus, trébol rojo y azarero (Cuadro 2.3).

2.6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron adquirir mayor conocimiento sobre las principales plantas hospederas y sitios de hibernación que habita *P. guildinii* y de su ocurrencia estacional en el litoral Sur del Uruguay (entre 33° 55' y 34° 17' latitud Sur). Cuando el alimento preferido, la soja, estuvo ausente,

P. guildinii fue encontrado en un total de 15 especies vegetales (12 el primer año y 3 el segundo año) y cinco sitios de hibernación. De todos ellos, alfalfa, trébol rojo, lotus, azarero, ligustro, cañas, y hojarasca de eucaliptus fueron las especies y el hábitat donde el insecto fue más abundante y se le registró durante un período más prolongado de tiempo. En las diferentes prospecciones realizadas en diversas zonas geográficas, que reportan la presencia de este insecto en distintas especies vegetales (Ferreira y Panizzi, 1982; Panizzi y Slansky, 1985b; Costa *et al.*, 1995; Bunde *et al.*, 2010; Garlet *et al.*, 2010), no están mencionadas el azarero (*P. undulatum*), las cañas (*Phyllostachys* sp.), el guaviyú *Myrcianthes pungens* (Berg) Legrand, el roble australiano *Grevillea robusta* A.Cunn., la catalpa *C. bignonioides*, la acacia *Acacia melanoxylon* R.Br., el cotoneaster *Cotoneaster lacteus* W. W. Sm., y el maíz *Zea mays* L. En el estudio de pentatómidos asociados a especies nativas en Itaara (Brasil) realizado por Garlet *et al.* (2010), los autores reportan la colecta de adultos en pitanga (*Eugenia uniflora* L.) al igual que en este estudio, pero no constataron la presencia en arazá (*Psidium* sp.), tal como fue en los muestreos realizados en este trabajo. Esto reafirma la importancia que tiene realizar estudios locales para determinar los huéspedes alternativos (Panizzi y Parra, 2009).

El estudio de la ocurrencia estacional de ninfas y adultos en diferentes plantas y sitios de hibernación demuestra que la disponibilidad de alimento, junto al fotoperíodo y la temperatura, son los factores ambientales fundamentales en la regulación de la estacionalidad de *P. guildinii*. A partir de los resultados obtenidos, para la región Sur Oeste del Uruguay se pudo inferir la sucesión de plantas y de hábitat que son colonizados por las sucesivas generaciones. Al comienzo del otoño, cuando la soja se cosecha, las ninfas mayores y los adultos se dispersan hacia las leguminosas forrajeras, fundamentalmente hacia la alfalfa; asimismo los adultos se pueden movilizar hacia plantas perennes, las cuales probablemente usen como abrigo y también pueden iniciar su traslado hacia los sitios de hibernación. Al finalizar el otoño, los adultos se dispersan desde las leguminosas forrajeras y plantas perennes hacia los sitios de hibernación como la hojarasca de eucaliptus. En ellos permanecerían hasta el fin del invierno. En la siguiente primavera volverían a colonizar las leguminosas forrajeras, principalmente alfalfa, donde desarrollarían la

generación que luego coloniza la soja, al inicio de la fase reproductiva, ninfas mayores y adultos comenzarían a trasladarse desde las leguminosas forrajeras hacia el cultivo. Fraga y Ochoa (1972) y Ferreira y Panizzi (1982) mencionan que durante el invierno los adultos de *P. guildinii* fueron encontrados debajo de la corteza de los árboles o de otros objetos que le ofrecían protección. Ribeiro y Castiglioni (2009) y Ribeiro *et al.* (2009) determinaron que en el litoral Norte del país *P. guildinii* coloniza la alfalfa y el lotus antes que la soja.

La ausencia de ninfas desde el final del otoño hasta el inicio de la primavera (junio a octubre), indica que durante ese período los adultos no se reproducen y que aquellas ninfas que alcanzan el estado adulto en otoño, recién comienzan su reproducción en la primavera siguiente. Por lo tanto durante el otoño y el invierno *P. guildinii* hiberna en estado adulto en diapausa reproductiva, como la mayoría de los hemípteros fitófagos (Saulich y Musolin, 2012; Zerbino *et al.*, 2013; Zerbino *et al.*, 2014a, b).

Los resultados de la ocurrencia estacional, el valor del porcentaje de constancia y la cantidad de ninfas y adultos totales colectados obtenidos para las distintas especies vegetales y sitios de hibernación, indican que la alfalfa es la planta huésped preferida y el principal enlace antes y después del cultivo de soja (Fraga y Ochoa, 1972; Panizzi y Slansky, 1985b). Massoni y Frana (2005) sugieren que los adultos observados entre el final del invierno y comienzo de la primavera (setiembre y octubre) en alfalfa, son sobrevivientes de la generación del otoño. En lotus y el trébol el período de actividad, el porcentaje de ocurrencia y la cantidad de ninfas y adultos colectados fueron considerablemente menores que en alfalfa.

El incremento en la abundancia de adultos registrado en las plantas perennes en otoño podría ser consecuencia de la dispersión de los mismos desde las áreas de soja cuando se realiza la cosecha (Panizzi y Grazia, 2001). Si bien en el azarero y el ligustro el período de colecta de adultos fue similar, los valores mayores de porcentaje de constancia y de número total de adultos colectados registrados en el azarero, indican que *P. guildinii* prefiere como planta alternativa esta especie al ligustro. Panizzi y Grazia (2001) determinaron que en ligustro *P. guildinii* fue

registrado en bajo número.

En la hojarasca de eucaliptus, aunque los adultos comenzaron a ser colectados a partir del mes de abril, el máximo poblacional se registró en julio. En ese momento la población de adultos en las leguminosas forrajeras y plantas perennes (azarero, ligustro y cañas) disminuyó considerablemente, lo que sugiere que los adultos se movilizarían desde las leguminosas forrajeras y de las plantas perennes hacia los sitios de hibernación, donde permanecerían hasta la siguiente primavera, en que comenzarían a colonizar nuevamente las leguminosas forrajeras.

Los dos momentos de máxima captura observados en leguminosas forrajeras durante el verano y el otoño, indicarían que entre los 33° 55' y 34° 17' de Latitud S pueden ocurrir al menos dos generaciones. Esto es sustentado con los resultados obtenidos por Zerbino *et al.* (2013) en el laboratorio cuando estudiaron la biología en condiciones de fotoperíodo y temperatura semejantes a las registradas en verano (14 h de fotofase y 25 °C). Estos autores determinaron que desde huevo hasta la muerte del adulto transcurren aproximadamente 63 días.

2.7. CONCLUSIONES

Con este estudio se adquirió mayor conocimiento sobre las principales plantas huéspedes y sitios de hibernación donde *P. guildinii* se encuentra durante el período de la entrefa del cultivo de soja, y se pudo determinar la sucesión de plantas huéspedes y de hábitats que son utilizados para el desarrollo de las sucesivas generaciones en el litoral Sur del Uruguay. Los resultados obtenidos de la ocurrencia estacional, sugieren que la disponibilidad temporal de distintas especies vegetales, y las condiciones de fotoperíodo y de temperatura, regulan la estacionalidad de *P. guildinii*. Entre los 33° 55' y 34° 17' de Latitud S, adultos y ninfas fueron colectados en leguminosas forrajeras, mientras que en el azarero, el ligustro, las cañas, y la hojarasca de eucaliptus sólo se capturaron adultos. La ausencia de ninfas desde el final del otoño hasta el inicio de la primavera (junio a octubre), indica que durante

ese período los adultos no se reproducen. El cultivo de alfalfa es la planta huésped preferida, por lo que es el principal eslabón antes y después del cultivo de soja.

2.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bunde PRS, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ferreira BSC, Panizzi AR. 1982. Percevejos pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. *Annais II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja* 2: 140 - 151.
- Fraga CP, Ochoa LH. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). Argentina. *IDIA-Suplemento* 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.

- Giese RL, Peart RM, Huber RT. 1975. Pest management: a pilot project exemplifies new ways of dealing with important agricultural pests. *Science* 187(4181): 1045 -1052.
- Lopes OJ, Link D, Basso IV. 1974. Pentatomídeos de Santa Maria—lista preliminar de plantas hospedeiras. *Revista do Centro de Ciências Rurais* 4: 317 - 322.
- Massoni F, Frana J. 2005. Si no es en soja ¿las chinches dónde están? INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2005. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea 104: 100 - 102.
- 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, 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, 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.

* Se utiliza la letra “b” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

- 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, 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.
- 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*). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 35: 429 - 438.
- Saulich A KH, Musolin DL. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomological Review* 92(1): 1 - 26.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014a. Nymph and adult seasonal occurrence on different plants and morphological and physiological changes of adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Uruguay. *Journal of Pest Science*, aceptado para publicar 29/10/2014, DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014b. 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.

* Se utiliza la letra “b” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

Zerbino MS, Silva F.A.C, Panizzi AR. 2010. Avanços recentes sobre a interação plantas hospedeiras/percevejos no Uruguai. En Congresso Brasileiro de Entomologia (XXIII, Natal, Brasil). Poster 968. 1CD.

3. ROL DE LAS PRINCIPALES ESPECIES VEGETALES EN LA BIOLOGÍA
(NINFAS Y ADULTOS) Y COMPORTAMIENTO ALIMENTAR
(ADULTOS) DE *PIEZODORUS GUILDINII*

3.1. RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de distintos alimentos en la biología de ninfas y adultos de *Piezodorus guildinii* (Westwood). Los alimentos considerados fueron: vainas inmaduras de soja (R 5.5 - R6) (VIS), de lotus (VIL), y de alfalfa (VIA) y flores maduras de trébol rojo (FMTR). Las condiciones de los experimentos fueron: 14hL:10O, 25±1 °C y 80±10% HR. Los alimentos tuvieron efectos en diferentes aspectos de la historia de vida del insecto. En la supervivencia de ninfas, las mayores diferencias fueron registradas en el 2do estadio y 3er estadio, los valores registrados en VIS y VIA fueron similares entre sí y superiores a los de VIL y FMTR. La mortalidad total de las ninfas fue de 100%-FMTR; 87,6%-VIL; 54,2%-VIA y 32,6%-VIS. En los tres alimentos que completaron el estado de ninfa, el tiempo de desarrollo fue semejante (20 días). La tasa de supervivencia de adultos para VIL, VIA, y VIS fue similar y superior a FMTR. Los adultos fueron más y menos longevos con VIA y FMTR (62 y 32 días), respectivamente. Las hembras alimentadas con FMTR no ovipusieron. El porcentaje de hembras que depositaron huevos fue superior al 80% para VIS y VIA, y 52,2% para VIL. La fecundidad con VIS y VIA fue similar (9,9-8,5 posturas/♀; 147,8-134,4 huevos/♀, respectivamente) y dos veces superior que con VIL (4,1 posturas/♀ y 60,2 de huevos/♀). En los tres alimentos la fertilidad de los huevos fue similar (58%). Con VIS y VIA los adultos durante 43 días incrementaron su peso, mientras que en ese período con VIL el peso se mantuvo constante y con FMTR perdieron peso. VIS y VIL fueron los alimentos más visitados por los adultos. Los resultados obtenidos indican que VIA es un alimento con excelente aptitud nutricional y destacan la importancia que tiene la alfalfa como huésped alternativo de *P. guildinii* en el Uruguay.

Palabras Clave: *Piezodorus guildinii*, biología, alimentos, preferencia alimentaria

3.2. ABSTRACT

The effect of the food on the biology of nymphs and adults of *Piezodorus guildinii* (Westwood) was studied in the laboratory. Four different food were tested: immature pods of soybean (R5.5 - R6) (VIS), immature pods of birdsfoot trefoil (VIL), immature pods of alfalfa (VIA), and flowers of red clover (FMTR). The conditions of the experiments were 14hL: 10D, 25 ± 1 °C and $80 \pm 10\%$ RH. Food had significant effect in different aspects of the life history of the insect. The major differences in the nymph's survivorship were observed at 2nd and 3th instar, in which the values corresponding to VIS and VIA were similar and higher than values recorded for VIL and FMTR. Total nymph mortality was 100%-FMTR; 87.6%-VIL; 54.2%-VIA and 32.6%-VIS. The development time required to complete the nymphal stage was similar (about 20 days) in the three foods in which the nymphs reached the adult stage (VIS, VIL, VIA). The longevity of adults was highest and lowest with VIA and FMTR (average of females and males, 62 and 32 days, respectively). Females fed on FMTR did not deposit eggs. The percentage of females who deposited eggs was higher than 80% for VIS and VIA, and 52.2% for VIL. Fecundity for VIS and VIA was similar (9.9 and 8.5 egg masses/♀ and 147.8 and 134.4 eggs/♀, respectively) and twice higher than that for VIL (4.1 egg masses/♀ and 60.2 eggs/♀). Egg fertility was similar for the three foods (58%). Adults 43 days old increased body weight with VIS and VIA, while with VIL the body weight was kept constant and with FMTR weight decreased. VIS and VIL were the food most visited by adults. Results obtained indicated that VIA is a suitable food and emphasize the importance that has the alfalfa as alternative host of *P. guildinii* in Uruguay.

Key Words: *Piezodorus guildinii*, biology, food, food preference

3.3. INTRODUCCIÓN

Diferentes aspectos de la biología, el comportamiento, la fisiología y la ecología de los insectos, están insertos de una manera u otra en el contexto de la alimentación. La cantidad, la calidad, y la proporción de nutrientes presentes en el alimento, así como los compuestos secundarios (aleloquímicos), causan un impacto variable en la biología de los insectos determinando su potencial reproductivo (Panizzi y Parra, 2012). Las plantas, como fuente de alimento, se caracterizan por tener variaciones temporales y espaciales en la disponibilidad y en la calidad nutricional (Panizzi y Parra, 2009).

Los hemípteros fitófagos exploran variedad de plantas huéspedes dentro y entre generaciones. Ninfas y adultos se movilizan entre la misma o diferente especie vegetal, las cuales generalmente son colonizadas en secuencia (Panizzi y Parra, 2009; Zerbino *et al.*, 2014a). En general, estos insectos sólo pasan un tercio del año alimentándose de su planta preferida; el resto del tiempo, cuando la misma no está disponible, se encuentran obligados a colonizar otras especies vegetales (Panizzi, 2000). Estas plantas, que pueden ser utilizadas como fuente de alimento o como refugio, son muy importantes porque son las que les permite mantener las poblaciones a lo largo del tiempo (Panizzi, 1997).

Existe una asociación estrecha entre las plantas hospederas alternativas y los distintos hemípteros fitófagos. *Piezodorus guildinii* (Westwood), que es el hemíptero fitófago que causa los mayores daños en el cultivo de soja, es la especie menos polífaga, su ciclo transcurre exclusivamente en leguminosas. Sin embargo, existen variaciones en su desempeño reproductivo, en la longevidad y la sobrevivencia de ninfas y adultos según la especie vegetal de la cual se alimenta, aún dentro de un mismo género (Panizzi, 1985; Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi 1987; Panizzi, 1992; Panizzi, 1997; Panizzi *et al.*, 2000a; Panizzi *et al.*, 2002; Panizzi y Silva, 2009). La longevidad de los adultos de ambos sexos puede ser afectada en forma diferencial de acuerdo al alimento. Los machos de *P. guildinii* son más longevos que las hembras cuando se alimentan de vainas de poroto verde o de soja. Por el contrario, las hembras viven dos veces el tiempo de los machos cuando el alimento

es semillas de soja madura, mientras que cuando el alimento es maní, la longevidad de ambos sexos es similar (Panizzi y Slansky, 1985a).

La lista de plantas que se alimenta *P. guildinii* incluye, además de la soja *Glycine max* (L.) Merrill, otras especies de importancia económica como arveja *Pisum sativum* L., poroto *Phaseolus vulgaris* L., lenteja *Lens culinaris* Medik., y leguminosas forrajeras (alfalfa *Medicago sativa* L., lotus *Lotus corniculatus* L. y Trébol rojo *Trifolium pratense* L.) (Panizzi *et al.*, 2000a; Ribeiro y Castiglioni, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009; Castiglioni *et al.*, 2010). También se alimenta de leguminosas silvestres como *Sesbania aculeata* (Dhaincha), *Indigofera endecaphylla* Jacq., *I. hirsuta* L., *I. suffruticosa* Mill., *I. truxillensis* Kunth, *Cajanus cajan* (L.) Mills., *Crotalaria lanceolata* E. Mey (Panizzi, 1985; Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi 1987; Panizzi, 1992; Panizzi, 1997; Panizzi *et al.* 2000, Panizzi *et al.* 2002; Panizzi y Silva, 2009).

Como consecuencia de la distribución geográfica de las especies vegetales, las poblaciones locales de hemípteros fitófagos tienen hábitos de alimento específicos, por lo que es necesario conocer el rol que cumplen en la biología de ninfas y adultos las plantas huéspedes de cada localidad (Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi, 1997; Panizzi, 2000; Panizzi y Parra, 2009). Con estos estudios se puede establecer en que especies vegetales se deben concentrar los esfuerzos para idear tácticas de manejo para aplicar previo a la colonización de su planta preferida, lo cual permitirá desarrollar un programa de manejo integrado holístico y sustentable que mitigue el impacto del insecto en el o los cultivos que causan daños económicos.

En el relevamiento de campo realizado durante dos años en el suroeste del Uruguay *P. guildinii* pudo ser observado en 15 especies vegetales (Zerbino *et al.*, 2014a, Capítulo 2). De todas ellas, las leguminosas forrajeras alfalfa, trébol rojo y lotus fueron las especies vegetales donde la presencia del insecto se observó durante un período de tiempo más prolongado, y se registraron los mayores valores de abundancia y de porcentaje de constancia. Es objetivo de este estudio determinar el rol que cumplen las principales leguminosas forrajeras cultivadas en la región Suroeste del Uruguay en el desempeño de ninfas y adultos, y estudiar el comportamiento

alimentario de estos últimos. Para ello fueron realizados ensayos de biología de ninfas y de adultos alimentados con frutos inmaduros de leguminosas forrajeras (alfalfa, lotus y trébol rojo) y de soja, y de preferencia alimentaria de adultos con esos alimentos.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Rutina de mantenimiento de la cría de insectos

Al inicio del experimento, fueron colectados adultos de *P. guildinii*, en el campo de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S 34° 20' W 57° 41'), los cuales en el laboratorio fueron colocados en cajas de plástico transparente (25 × 20 × 20 cm) forradas con papel de filtro, el cual fue humedecido diariamente. En la tapa del recipiente fueron colocados hilos de lana sintética de 30 cm de largo para que las hembras realicen la oviposición (Silva y Panizzi, 2008). El alimento que recibieron fue vainas verdes de poroto *Phaseolus vulgaris* L., semillas de soja *G. max* y maní *Arachis hypogaea* L., el cual se reemplazó día por medio. Todos los días se suministró agua destilada por medio de algodón humedecido colocado en un contenedor plástico (1,0 cm Ø). Las condiciones de temperatura y humedad fueron 25 ± 1 °C, $80 \pm 10\%$ RH y un fotoperíodo de 14:10 h L:O (Tres luces TLD 18W/54-765 dispuestas horizontalmente a 20 cm de distancia de los contenedores). Para mantener la humedad, el papel de filtro fue rociado con agua todos los días. Las posturas fueron retiradas, y acondicionadas en placas de Petri de 9,0 de Ø × 1,5 cm, cuyo fondo fue cubierto con papel de filtro y colocadas en estufas. Las posturas fueron mezcladas a fin de evitar efectos maternos y luego llevadas a las cámaras de cría donde se realizaron los experimentos. Las condiciones ambientales en las mismas fueron: 14 h de luz, 25 ± 1 °C de temperatura y $80 \pm 10\%$ de humedad relativa. Cada cámara de cría constó de cuatro luces tipo Day light TLT 20W/54 RS dispuestas verticalmente en la puerta. Las ninfas del primer instar las ninfas fueron mantenidas únicamente con agua destilada. La temperatura y humedad de las cámaras fueron monitoreadas utilizando registradores HOB0® modelo U23-001. Los alimentos evaluados en los tres experimentos (biología de ninfas, de adultos y

preferencia alimentaria) fueron vainas inmaduras de alfalfa (VIA), de lotus (VIL), y de soja en estado R5-6 (VIS), y flores maduras de trébol rojo (FMTR).

3.4.2. Biología de ninfas

Al primer día del segundo instar, más de 50 ninfas de cada tratamiento comenzaron a recibir el alimento de los tratamientos, para ello fueron colocadas individualmente en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) recubiertas de papel de filtro. El alimento fue renovado día por medio y diariamente con un algodón humedecido se les proporcionó agua destilada. Se registró el cambio de estadio, la mortalidad diaria, y al emerger los adultos se determinó el sexo y el peso fresco con una balanza electrónica (OHAUS Pioneer™) (aproximación 0,1 mg). Para cada alimento se calculó la supervivencia en cada estadio ninfal, y la mortalidad total, la duración de cada estadio y el tiempo de desarrollo total del estado. El diseño experimental fue de parcelas completamente al azar y cada individuo fue considerado una réplica. Este experimento fue repetido dos veces y las cámaras de cría fueron reasignadas por sorteo.

3.4.3. Biología de adultos

Grupos de diez ninfas del segundo estadio fueron colocados en cajas de germinación (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) cubiertas de papel de filtro, las cuales recibieron vainas verdes de poroto *P. vulgaris*, semillas de soja *G. max* y maní *A. hypogaea* como alimento. El alimento fue renovado día por medio y diariamente con un algodón humedecido se les suministró agua destilada.

Cuando los adultos emergieron, se formaron un total de 150 parejas (aproximadamente 50 parejas por alimento) y comenzaron a recibir el alimento de los tratamientos. Cada una de ellas fue acondicionada en una cajas plástica (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) recubiertas de papel de filtro. El alimento fue renovado día por medio y diariamente con un algodón humedecido se les proporcionó agua destilada. Cuando murió un integrante de la pareja, el mismo no fue reemplazado.

Todos los días se registró la mortalidad y la oviposición. Para cada alimento se calculó la supervivencia y la longevidad de ambos sexos. El efecto del alimento en la actividad reproductiva se evaluó por medio del porcentaje de hembras que ovipusieron, el período de preoviposición, el total de número de posturas y de huevos por hembra, así como también la viabilidad de los huevos. Con el objetivo de determinar el efecto del alimento en el peso fresco, semanalmente los adultos fueron pesados con una balanza electrónica (OHAUS Pioneer™) (aproximación 0,1 mg) desde el momento de la emergencia hasta que murieron. El diseño experimental fue de parcelas completamente al azar y cada pareja fue considerada una réplica. Este experimento fue repetido dos veces, y las cámaras de cría fueron reasignadas por sorteo.

3.4.4. Preferencia alimentaria

En el momento de la emergencia 15 adultos fueron colocados individualmente en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) recubiertas de papel de filtro, y durante diez días fueron alimentados con vainas verdes de poroto *P. vulgaris*, y maní *A. hypogaea*. Previo al inicio de la prueba de preferencia, fueron sometidos a ayuno durante dos días, donde sólo se les suministró agua destilada.

Antes de comenzar el experimento se realizó el sorteo de la distribución de los alimentos en cada placa y de la ubicación de éstas sobre la mesada. Cada alimento fue colocado en un recipiente plástico (2,8 cm Ø), los cuales fueron dispuestos en forma de cruz en los bordes de placas de Petri (14,5 cm Ø) que estaban forradas con papel de filtro. En el centro de cada placa de Petri se colocó un adulto, al cual previamente se le había determinado el sexo. En ocho momentos, cada una hora, se registró el alimento visitado, con prueba de alimento. Al finalizar cada evaluación, la posición de las placas en la mesada fue modificada, y el alimento sobre el cual se posicionó el insecto fue renovado. Este experimento fue repetido siete veces.

3.4.5. Análisis de datos

Los resultados de las repeticiones de los experimentos de la biología de ninfas y de adultos fueron similares, por lo que los datos fueron combinados en los análisis estadísticos. La supervivencia de ninfas en cada estadio y la mortalidad total fue analizada utilizando modelos lineales generalizados con distribución binomial y función logit (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). La duración de cada estadio (2-5) y el tiempo de desarrollo total de las ninfas fueron analizados mediante modelos lineales generalizados con distribución Poisson y función logarítmica (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). En todos los casos los resultados son presentados como la máxima verosimilitud de la distribución Chi cuadrado.

El peso de los adultos a la emergencia fue analizado con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2), dado que la varianza fue homogénea y no se encontró asociación entre la media y la varianza. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ($P \leq 0,05$). Las diferencias de peso fresco entre sexos fueron comparadas con la prueba t Student ($P \leq 0,05$).

El análisis de la supervivencia de adultos a través del tiempo se realizó realizando regresiones lineales simples para cada tratamiento. Los datos fueron transformados a LN (x+1), de modo de cumplir con los supuestos de la regresión lineal. Las pendientes (b) de las ecuaciones de cada tratamiento fueron comparadas con la prueba t de Student ($P \leq 0,05$).

El porcentaje de oviposición fue analizado por medio de modelos lineales generalizados con distribución binomial y función logit (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Para el análisis de los datos de la longevidad, del período de preoviposición, y del número de posturas y de huevos totales por hembra, debido a que son variables discretas que presentaron una fuerte asociación entre la media y la varianza, se utilizaron modelos lineales generalizados con distribución Poisson o binomial negativa y función logarítmica (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2).

La viabilidad de los huevos fue analizada con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2), dado que la varianza fue homogénea y no se encontró asociación entre la media y la varianza. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ($P \leq 0,05$).

El cambio de peso fresco de los adultos fue analizado con modelos mixtos (PROC MIXED, SAS Institute, versión 9.2), el peso inicial medido en el primer día de adulto fue la co-variable y los pesos subsiguientes fueron considerados como medidas repetidas. La estructura de covarianza que ajustó fue ANTE (1). Para la prueba de heterogeneidad de las pendientes, el modelo incluyó el término de interacción ganancia por tratamiento.

Los datos de frecuencia de visita de los alimentos del ensayo de preferencia fueron analizados por modelos lineales generalizados mixtos (PROC GLIMIX). Los distintos alimentos y el sexo fueron considerados efectos fijos, y efectos aleatorios a las repeticiones y los experimentos.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Biología de ninfas

3.5.1.1. Supervivencia y mortalidad total

Los alimentos tuvieron efectos significativos en la supervivencia de ninfas en los distintos estadios (2do $\chi^2 = 69,8$ gl = 3 $P < 0,0001$; 3er $\chi^2 = 63,0$ gl = 3 $P = < 0,0001$; 4to $\chi^2 = 8,9$ gl = 3 $P = 0,03$; 5to $\chi^2 = 15,6$ gl = 2 $P = 0,0004$). En el 2do estadio y 3er estadio la supervivencia de ninfas alimentadas con VIS y VIA, fue similar y superior a la registrada cuando el alimento fue VIL y FMTR; a su vez, el valor registrado con VIL fue significativamente superior al de FMTR. Ninguna ninfa del tratamiento FMTR completó 4to estadio. En este estadio, las ninfas alimentadas con VIL, VIA y VIS tuvieron una supervivencia similar. En el 5to estadio sólo hubo diferencias entre VIL y VIS (Figura 3.1).

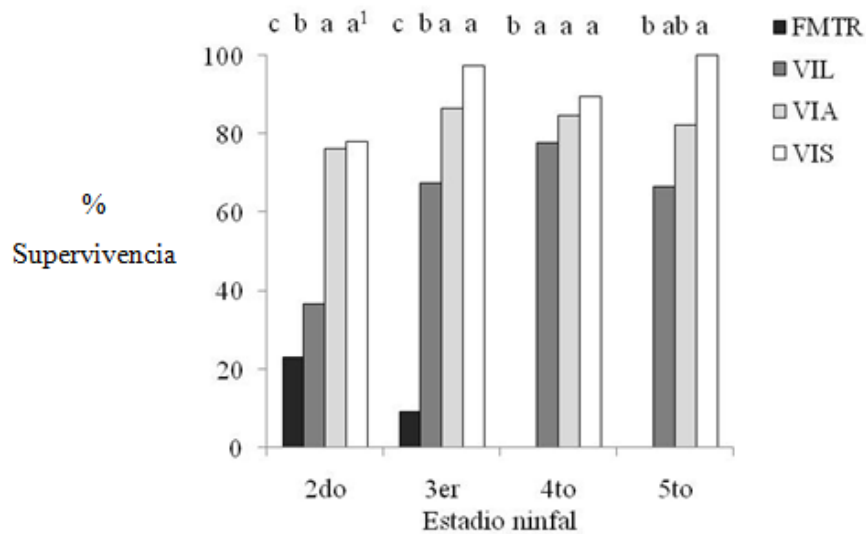


Figura 3.1. Supervivencia en los diferentes estadios de ninfas de *Piezodorus guildinii* alimentadas con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), de alfalfa (VIA) y de soja (VIS). ¹Medias en cada estadio seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

El porcentaje de mortalidad total de ninfas (estadios 2-5) varió en función de los alimentos ($\chi^2 = 151,5 \text{ gl} = 3 \text{ } P < 0,0001$). Los valores registrados para cada alimento fueron diferentes entre sí (Cuadro 3.1). La menor mortalidad se registró con VIS. Sólo un pequeño porcentaje de las ninfas que recibieron VIL alcanzaron el estado adulto (12,4%), mientras que cuando fueron alimentadas con VIA casi la mitad completaron el estado de ninfa (45,8%).

Cuadro 3.1. Tiempo de desarrollo medio (\pm EEM) y porcentaje de mortalidad total de ninfas de *Piezodorus guildinii* (2do-5to) alimentadas con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), de alfalfa (VIA) y de soja (VIS) en condiciones de laboratorio.

Alimento	Nº inicial	Tiempo de desarrollo (días)						Mortalidad Total (%)
		Estadio				Total (Estadio 2-5)		
		2do	3er	4to	5to	Hembras	Machos	
FMTR	96	7,6 \pm 0,6 a ¹ [22] ²	12,5 \pm 4,5 a [2]	-	-	-	-	100,0 a
VIL	109	5,1 \pm 0,4 b [40]	4,3 \pm 0,3 b [27]	6,1 \pm 0,6 a [21]	6,4 \pm 0,3 a [14]	21,3 \pm 0,8a [7]	22,7 \pm 1,0a [7]	87,6 b
VIA	59	5,0 \pm 0,3 b [45]	4,5 \pm 0,3 b [39]	4,6 \pm 0,3 b [33]	6,0 \pm 0,3 a [27]	20,6 \pm 0,5a [20]	19,0 \pm 0,5a [7]	54,2 c
VIS	50	4,6 \pm 0,1 b [38]	3,7 \pm 0,1 b [37]	4,4 \pm 0,1 b [33]	6,7 \pm 0,2 a [33]	19,7 \pm 0,5a [18]	19,3 \pm 0,4a [15]	32,6 d

¹ Medias en cada columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

² Número de ninfas que completaron cada estadio

3.5.1.2. Tiempo de desarrollo

En el 2do ($\chi^2 = 21,8$ gl = 3 $P < 0,0001$), 3ro ($\chi^2 = 23,1$ gl = 3 $P < 0,0001$) y 4to ($\chi^2 = 5,9$ gl = 2 $P = 0,05$) estadio de ninfa, el tiempo de desarrollo varió en función del alimento recibido. La duración del 2do y 3er estadio fue significativamente mayor cuando las ninfas fueron alimentadas con FMTR que cuando recibieron los tres otros alimentos, con los cuales se registró un tiempo de desarrollo similar (Cuadro 3.1). Las ninfas alimentadas con VIL necesitaron más tiempo para completar el 4to estadio que cuando recibieron VIA y VIS (Cuadro 3.1). La duración del 5to estadio fue similar en los tres alimentos (VIL, VIA y VIS) ($\chi^2 = 1,2$ gl = 2 $P = 0,56$). El tiempo de desarrollo total (2do hasta 5to estadio) en ambos sexos fue similar en los tres alimentos que completaron el estado de ninfa (hembras $\chi^2 = 0,7$ gl = 1 $P = 0,70$; machos $\chi^2 = 3,2$ gl = 1 $P = 0,20$) (Cuadro 3.1).

3.5.1.3. Peso fresco en la emergencia de los adultos

El peso fresco de las hembras al momento de la emergencia fue similar en los tres alimentos (tratamiento $F_{2,41} = 0,2$ $P = 0,81$) (Cuadro 3.2). Por el contrario, los machos (tratamiento $F_{2,27} = 3,9$ $P = 0,03$) que recibieron VIS y VIA fueron más y menos pesados, respectivamente (Cuadro 3.2). Las hembras fueron más pesadas que los machos cuando las ninfas fueron alimentadas con VIL y VIA, mientras que el peso de ambos sexos fue semejante cuando el alimento fue VIS (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Peso fresco medio (\pm EEM) de los adultos de *Piezodorus guildinii* en la emergencia cuando las ninfas fueron alimentadas con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), de alfalfa (VIA) y de soja (VIS), en condiciones de laboratorio.

Alimento	Peso fresco (mg)	
	Hembras	Machos
VIL	53,4 \pm 2,3 aA ¹	44,6 \pm 1,4 abB
VIA	52,6 \pm 1,6 aA	43,1 \pm 3,2 bB
VIS	51,2 \pm 2,5 aA	49,3 \pm 1,1 aA

¹ Medias seguidas por la misma letra, minúscula para las columnas y mayúsculas para las filas no difieren para las pruebas de Tukey-Kramer (HDS) y prueba t-Student, respectivamente ($P \leq 0,05$).

3.5.2. Biología de adultos

3.5.2.1. Supervivencia y longevidad

En ambos sexos, los adultos alimentados con FMTR tuvieron una tasa de supervivencia significativamente menor, que con los restantes alimentos, los cuales fueron semejantes entre sí (Cuadro 3.3). A los 43 días de la emergencia de los adultos, sólo 22% de los machos y 33% de las hembras alimentadas con FMTR eran supervivientes, mientras que en los otros tres alimentos esa misma edad el porcentaje de supervivencia de tuvo un rango entre 47,8 y 77,1% para los machos, y de 60,9 a 73,3% para las hembras.

La longevidad de los adultos de ambos sexos varió en función de los alimentos (hembras $\chi^2 = 37,4$; machos $\chi^2 = 38,6$ gl = 3 $P < 0,0001$). Los adultos menos longevos (ambos sexos) fueron los que se alimentaron con FMTR; mientras que los machos más longevos fueron los alimentados con VIA y en el caso de las hembras fueron las que recibieron VIA y VIS, aunque el valor de éste último también fue similar al de VIL (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Pendiente de la regresión linear simple (b) entre LN (% Supervivencia+1) y el tiempo, coeficiente de correlación (r), y longevidad media (\pm EEM) de adultos de *Piezodorus guildinii* alimentados con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), de alfalfa (VIA) y de soja (VIS), en condiciones de laboratorio.

Alimento	b ¹		r		Longevidad (días) ²	
	Hembras		Machos		Hembras	Machos
FMTR	-0,0529 \pm 0,0061 a	0,98*	-0,0557 \pm 0,0053 a	0,99*	33,5 \pm 2,4 c [52] ³	29,9 \pm 2,4 c [53]
VIL	-0,0190 \pm 0,0026 b	0,97*	-0,0255 \pm 0,0025 b	0,99*	56,6 \pm 5,0 b [46]	44,5 \pm 4,6 b [45]
VIA	-0,0148 \pm 0,0027 b	0,95*	-0,0198 \pm 0,0058 b	0,90*	70,5 \pm 4,7 a [49]	65,4 \pm 4,5 a [48]
VIS	-0,0183 \pm 0,0047 b	0,93*	-0,0229 \pm 0,0033 b	0,97*	60,5 \pm 2,9 ab [67]	47,9 \pm 3,2 b [69]

¹Pendientes expresadas como LN (% supervivencia+1), valores en cada columna, seguidos por la misma letra no difieren significativamente para la prueba t ($P \leq 0,05$).

²Medias en cada columna, seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

³Número de adultos.

* $P \leq 0,0001$.

3.5.2.2. Desempeño reproductivo

El desempeño reproductivo de las hembras varió en función del alimento. Los tratamientos tuvieron efectos altamente significativos en el porcentaje de hembras que depositaron huevos ($\chi^2 = 21,3$ gl = 2 $P < 0,0001$). Los mayores valores correspondieron a los tratamientos VIA (87,7%) y VIS (83,8%), los cuales fueron semejantes entre sí; mientras que con VIL se registró un valor significativamente menor (52,2%). Las hembras alimentadas con FMTR no ovipusieron (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Desempeño reproductivo medio (\pm EEM) de las hembras de *Piezodorus guildinii* en alimentadas con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), de alfalfa (VIA) y de soja (VIS) en condiciones de laboratorio.

Alimento	Oviposición (%)	Período preoviposición (días)	Número/hembra		Eclosión de Huevos (%)
			Posturas	Huevos	
FMTR	0 [52] ³	-	-	-	-
VIL	52,2 b ¹ [46]	21,1 \pm 1,6 ab ¹ [24]	4,1 \pm 0,7 b ¹ [24]	60,2 \pm 10,2 b ¹ [24]	58,0 \pm 6,2 a ² [24]
VIA	87,7 a [49]	18,6 \pm 1,8 b [42]	8,5 \pm 1,0 a [42]	134,4 \pm 16,0 a [42]	57,5 \pm 3,1 a [42]
VIS	83,8 a [75]	25,8 \pm 2,5 a [62]	9,9 \pm 1,0 a [62]	148,3 \pm 14,9 a [62]	58,0 \pm 3,1 a [62]

¹ Medias en cada columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

² Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren significativamente para la prueba de Tukey-Kramer (HSD) ($P \leq 0,05$).

³ Número de hembras.

El alimento, también afectó la duración del período de preoviposición ($\chi^2 = 6,6$ gl = 2 $P = 0,04$), que fue más corto cuando las hembras fueron alimentadas con VIA (18,6 días), y más largo cuando el alimento fue VIS (25,8 días). Los valores correspondientes a VIL (21,1 días) fueron similares a VIA y VIS (Cuadro 3.4).

Hubo efectos altamente significativos de los alimentos en el número de posturas ($\chi^2 = 17,94$ gl = 2 $P < 0,0001$) y de huevos totales por hembra ($\chi^2 = 15,0$ gl = 2 $P = 0,0005$). Las hembras alimentadas con VIA y VIS depositaron un número de posturas/hembra (8,5 y 9,9; respectivamente) y de huevos totales/hembra (134,4 y 147,5; respectivamente) significativamente mayor que aquellas alimentadas con VIL (4,1 posturas/hembra y 60,2 huevos totales/hembra) (Cuadro 3.4). La fertilidad de los huevos fue similar para los tres alimentos ($F_{2, 125} = 0,06$ $P = 0,94$) (Cuadro 3.4).

3.5.2.3. Ganancia de peso

Durante los 43 días de edad de los adultos, los alimentos tuvieron efectos diferenciales en la ganancia de peso (interacción alimento*edad $F_{4,1464} = 25,4$ $P < 0,0001$), y el efecto del alimento en ambos sexos fue similar (interacción alimento*sexo $F_{3,241} = 1,5$ $P = 0,22$). De acuerdo a la pendiente de la regresión lineal, durante ese período los adultos alimentados con VIA y VIS tendieron a ganar peso, mientras que los que recibieron VIL mantuvieron el peso inicial, y los que recibieron FMTR perdieron de peso (Cuadro 3.5, Figura 3.2).

Cuadro 3.5. Ganancia de peso diaria (mg) de los adultos de *Piezodorus guildinii* durante un período de 43 días, cuando fueron alimentados con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), alfalfa (VIA) y soja (VIS) en condiciones de laboratorio.

Alimento	Pendiente (b) ¹	Pendiente ≠0 Pr> t
FMTR	-0,303c	<0,0001
VIL	0,035b	0,3501
VIA	0,181a	<0,0001
VIS	0,145a	<0,0001

¹ Medias por la misma letra en cada columna no difieren significativamente ($Pr > |t| < 0,05$).

En la figura 3.2 (A y B) son presentados para los distintos alimentos los cambios semanales de peso de adultos de ambos sexos desde la emergencia hasta los 43 días, se observa que si bien el efecto fue más marcado en las hembras, la tendencia en los machos fue similar, siendo los cambios en peso de menor magnitud. Las hembras alimentadas con VIS ganaron peso durante los primeros 15 días, luego a la semana siguiente perdieron peso, y a partir de ese momento vuelven a ganar peso hasta los 43 días, en consecuencia el peso a los 43 días fue mayor que el inicial. Cuando las hembras recibieron VIA como alimento, durante el período considerado nunca se registró pérdida de peso (Figura 3.2 A). En el caso de VIL, las hembras en los primeros ocho días de emergidas disminuyeron de peso; a partir de ese momento hasta los 22 días incrementaron su peso y luego hasta los 43 días nuevamente perdieron; como consecuencia el peso inicial y el de los 43 días fue similar. Las hembras que recibieron FMTR, en los primeros 15 días de edad perdieron peso de manera importante, en la semana siguiente fue el único momento del período

considerado donde ganaron peso. Como resultados el peso a los 43 días fue menor que el peso inicial (Figura 3.2 A).

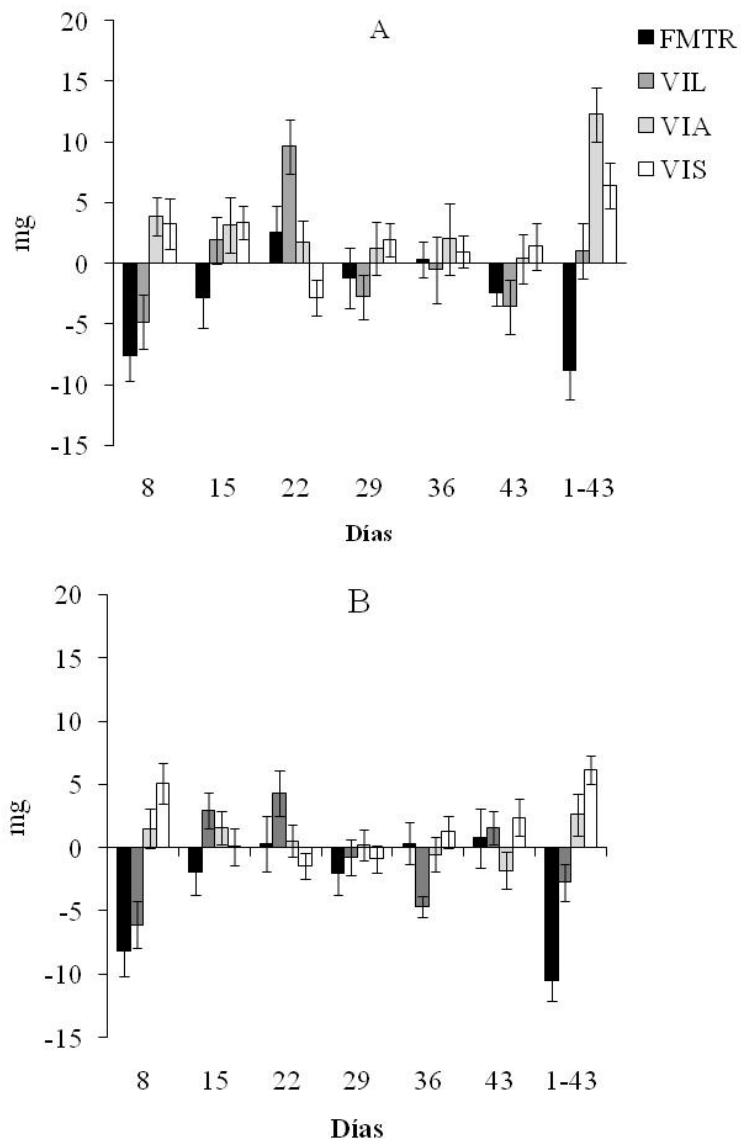


Figura 3.2. Cambio en el peso fresco medio (\pm EEM) (mg) durante las primeras seis semanas de vida de los adultos de *Piezodorus guildinii* alimentados con flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), alfalfa (VIA) y soja (VIS) en condiciones de laboratorio: A) hembras; B) machos.

3.5.3. Preferencia alimentaria de adultos

Los adultos de *P. guildinii* mostraron preferencias por algunos de los alimentos ofrecidos ($F_{3,309} = 16,0$ $P < 0,0001$). La respuesta a la oferta de los alimentos fue similar en ambos sexos (sexo $F_{1,309} = 0,6$ $P = 0,45$; interacción tratamiento*sexo $F_{3,309} = 0,9$ $P = 0,46$).

Cuadro 3.5. Número de visitas realizadas por adultos de *P. guildinii* a flores maduras de trébol rojo (FMTR), y vainas inmaduras de lotus (VIL), alfalfa (VIA) y soja (VIS), en un período de ocho horas en el laboratorio.

Alimento	Nº de visitas ¹
FMTR	0,35 ± 0,08 b
VIL	0,83 ± 0,16 a
VIA	0,47 ± 0,10 b
VIS	1,03 ± 0,19 a

¹ Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ($Pr > |t| < 0,05$).

De acuerdo al análisis estadístico, los alimentos quedaron separados en dos grupos. El mayor número de visitas se registró en VIS y VIL, mientras que los alimentos menos visitados fueron VIA y FMTR (Cuadro 3.5).

3.6. DISCUSIÓN

Los frutos de las especies vegetales utilizados como alimento tuvieron un impacto variable en el desempeño de las ninfas y de los adultos, lo cual es consecuencia de los distintos atributos físicos y químicos (nutrientes y no nutrientes) que los mismos tienen (Panizzi, 1987; Panizzi y Silva, 2009). A pesar de que a *P. guildinii* en varios países de América del Sur se le conoce como la “chinche de la

alfalfa”, en las revisiones realizadas no se menciona trabajo alguno que realizara estudios de la biología utilizando este alimento. Lo mismo sucedió con VIL y FMTR.

3.6.1. Biología de ninfas

El tipo de alimento ingerido sólo tuvo efectos significativos en la supervivencia y en la mortalidad total de ninfas. Scriber y Slansky (1981) establecen que la calidad nutricional del alimento (energía, nutrientes y aleloquímicos) tiene importantes efectos en la sobrevivencia y el crecimiento de los artrópodos inmaduros porque provoca alteraciones en los índices de digestibilidad y asimilación.

En la supervivencia de las ninfas, las mayores diferencias entre alimentos se observaron en el 2do y 3er estadio. Las ninfas alimentadas con VIS y VIA tuvieron una supervivencia similar y significativamente superior a las ninfas que recibieron VIL y FMTR como alimento, siendo mayor la supervivencia con VIL que con FMTR. A partir del 4to la supervivencia registrada con VIL fue similar a la de VIA, lo que indica que las ninfas mayores pueden tener distintos hábitos de alimentación que las ninfas menores.

Ninguna de las ninfas alimentadas con FMTR alcanzó el estado adulto. Esto pudo ser debido a que la calidad nutricional de este alimento es inadecuada y/o que la estructura de las flores haya impedido que las ninfas tuvieran una actividad alimentaria normal. Este resultado puede parecer contradictorio con el obtenido por Zerbino *et al.* (2014a), quienes reportan que en los muestreos de campo realizados en esta especie vegetal fueron colectadas ninfas entre los meses de noviembre y abril. Existen diversas explicaciones posibles de estos resultados, las cuales no son excluyentes entre sí. Una de ellas podría ser que el alimento ofrecido (flores maduras) no estuviera en el estado fenológico preciso en el cual las ninfas se alimentan en el campo. Panizzi (2007) y Panizzi y Silva (2009) establecen que en la supervivencia, además de la especie vegetal, el estado fenológico en el cual se encuentran las plantas tiene importantes efectos, como consecuencia de las variaciones en la composición nutricional y de la presencia de compuestos

secundarios o aleloquímicos. Otra posible explicación es que las ninfas encontradas hayan sido originadas de posturas eventualmente depositadas por adultos que colonizan el cultivo de manera temporaria, en ausencia de otros alimentos (Panizzi y Silva, 2009). En este caso, las ninfas estarían seriamente amenazadas porque el trébol rojo como alimento impediría su desarrollo (Panizzi *et al.*, 1980; Panizzi *et al.*, 2000a; Panizzi, 2007; Panizzi y Silva, 2009). También, podría ser que las ninfas que encontradas en el trébol rojo fueran de mayores (4to y 5to estadio), las cuales procederían de otras especies vegetales, dado que en esos estadios se pueden dispersar (Panizzi *et al.*, 1980). Las ninfas mayores pueden llegar a tener distintos hábitos de alimentación que las ninfas jóvenes (Panizzi, 1997), por lo que quizás pudieran sobrevivir en este cultivo. Los datos disponibles no permiten dilucidar este aspecto, dado que en el relevamiento no se registró el estadio de las ninfas. Por lo que, en próximos estudios sería necesario obtener esta información.

Como consecuencia de la baja supervivencia de ninfas en el 2do y 3er estadio cuando fueron alimentadas con VIL, se registró una mortalidad total muy alta. Estos resultados podrían ser consecuencia de la falta de nutrientes que son necesarios para el desarrollo normal y/o de la presencia de sustancias tóxicas como pueden ser los taninos (Panizzi y Silva, 2009). Estos compuestos son una importante defensa química de las plantas, y son considerados factores antinutricionales, dado que su presencia reduce la digestibilidad y los insectos tienen dificultades de metabolizarlos (Panizzi y Silva, 2009). Este resultado probablemente explica por qué en el estudio realizado por Zerbino *et al.* (2014a) la cantidad total de ninfas colectadas en cultivos de lotus fue considerablemente menor que en los de alfalfa.

Las ninfas alimentadas con VIA tuvieron una mortalidad intermedia, significativamente mayor y menor que los valores obtenidos con VIS y VIL, respectivamente. Generalmente las ninfas de *P. guildinii* tienen alta mortalidad en todos los alimentos, aún en los preferidos como las vainas del género *Indigofera* fue más alta del 50%, excepto con *I. endecaphylla* Jacq. que fue del 12% (Panizzi, 1992). El valor de mortalidad total registrado para VIS (32, 6%) fue menor que los obtenidos por Panizzi *et al.* (2000a, 2002) y Oliveira y Panizzi (2003) (57,7%; 88% y

47,6%; respectivamente), y similar al reportado por Gómez *et al.* (2013) (38%), cuando las ninfas recibieron un alimento similar. Estas diferencias en el porcentaje de mortalidad para un mismo alimento, se explican por variaciones en la calidad del alimento y/o de los insectos utilizados en los diferentes estudios (Panizzi *et al.*, 2002).

En los tres alimentos en que las ninfas alcanzaron el estado adulto (VIS, VIA y VIL) el tiempo de desarrollo fue similar, y las diferencias de peso a la emergencia de los adultos fueron poco importantes. Estos resultados sugieren que aquellas ninfas que son capaces de sobrevivir, poseen o desarrollarían mecanismos que les permiten superar la calidad inadecuada del alimento (Panizzi *et al.*, 2000a, 2002).

3.6.2. Biología de adultos

Los alimentos afectaron el desempeño de los adultos directamente en la longevidad y supervivencia a causa de las diferencias en la calidad nutricional, e indirectamente en el desempeño reproductivo como consecuencia de la presencia/ausencia de nutrientes que son necesarios para la producción de huevos (Oliveira y Panizzi, 2003; Panizzi, 2007; Panizzi y Silva, 2009). También hubo diferencias en la ganancia de peso en las primeras seis semanas de emergidos los adultos. El incremento de peso al inicio de la vida adulta, fundamentalmente en la primera semana, es un hecho común entre los hemípteros (Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi, 1987). El mayor consumo de alimento y el incremento en peso durante el período teneral, en ciertos hemípteros está asociado con la formación de cutícula, de los músculos de vuelo y de las gónadas, y con la acumulación de reservas. En general el peso tiende a estabilizarse a partir de los 15 días de emergidos los adultos (Panizzi y Slansky, 1985a).

Los adultos de ambos sexos que fueron alimentados con FMTR tuvieron una supervivencia y longevidad significativamente menor que con los otros alimentos, y durante el período de 43 días perdieron peso. Con este alimento, ninguna de las hembras depositó huevos, y tampoco se observó que las parejas copularan. Estos

resultados demuestran que FMTR es un alimento con baja calidad nutricional para los adultos, lo cual reafirmaría que colonizan el cultivo de manera temporaria, en ausencia de otros alimentos.

Los restantes alimentos (VIL, VIA y VIS) con los cuales las hembras produjeron descendencia, tuvieron efectos diferenciales en los distintos aspectos de la biología de los adultos, hubo efectos en la longevidad de adultos, en el período de preoviposición, el porcentaje de hembras que ovipusieron, y en la fecundidad (número de masas y huevos totales/hembra), sólo la tasa de supervivencia y el porcentaje de huevos eclosionados fueron similares en los tres alimentos. Las diferencias entre estos alimentos en el porcentaje de hembras que ovipusieron y en la fecundidad demuestra la importancia que tiene la calidad del alimento ingerido en el desempeño reproductivo de las hembras (Panizzi, 2007). Importantes variaciones en la fecundidad fueron reportadas en los distintos estudios de biología comparada con distintos alimentos (Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi, 1987; Panizzi *et al.* 2000a, 2002; Oliveira y Panizzi, 2003; Gómez *et al.*, 2013). En diferentes estudios que evaluaron el porcentaje de eclosión de los huevos depositados por hembras que recibían diferentes alimentos, Panizzi y Slansky (1985a), Panizzi (1987, 1992), Panizzi *et al.* (2002), tampoco encontraron diferencias en esta variable.

El conjunto de datos obtenidos indican que las VIL tienen menor aptitud nutricional que VIS y VIA (Panizzi, 2000). El hecho que la longevidad de los adultos alimentados con VIL y VIS fuera similar, pero que existieran importantes en el desempeño reproductivo, indica que la longevidad es prioritaria a la actividad reproductiva cuando el alimento tiene una aptitud nutricional poco adecuada, y de esta manera los adultos de *P. guildinii* ahorran energía (Panizzi *et al.*, 2000a). Otro indicador de la menor calidad de VIL como alimento fue que los adultos no ganaron peso. Por su parte, VIA demostró ser un alimento con excelente calidad nutricional (mayor longevidad de los adultos y porcentaje de oviposición, período de preoviposición más corto, fecundidad más alta y ganancia de peso durante 43 días). Con este alimento los adultos acumularon reservas y el desvío de nutrientes para la producción de huevos no afectó el tiempo de vida de los adultos, como sucede con

los alimentos de aptitud media y baja (Panizzi y Silva, 2009). Panizzi y Slansky (1985a) establecen que la calidad el alimento tiene efectos sobre el momento de inicio de la oviposición. Las diferencias encontradas en la duración del período de preoviposición, significativamente más corto en el VIA que en VIS, sugiere que la concentración de compuestos que intervienen en el proceso de maduración de los ovarios es mayor en VIA, que en VIS, o que VIA contiene otros compuestos que favorezcan este proceso (Slansky y Panizzi, 1987). Estos resultados explican los obtenidos por Zerbino *et al.* (2014a), donde establecieron que la alfalfa es la planta hospedera alternativa preferida.

Los valores obtenidos para las distintas variables consideradas en la biología de los adultos cuando fueron alimentados con VIS, en general se encontraron dentro del rango de valores reportados en otros trabajos, en los cuales el alimento fue vainas de soja en un estado fenológico similar al utilizado en este trabajo, con excepción del porcentaje del porcentaje de hembras que depositaron huevos y el porcentaje de eclosión de huevos (Panizzi y Slansky, 1985a; Panizzi *et al.* 2000a, 2002; Oliveira y Panizzi, 2003; Gómez *et al.*, 2013). Los valores de longevidad reportados por estos autores para machos y hembras fue 19,1-79,1 días y 28,1-88,1 días, respectivamente y el obtenido en este estudio con VIS fue de 47,9 y 60,5 días. El período de preoviposición registrado en las hembras alimentadas con VIS fue de 25,8 días, y en esos trabajos el rango se encuentra en un rango de 18 a 59,9 días. El porcentaje de oviposición alcanzado con VIS (83,7%), fue considerablemente más alto que los valores reportados en esos estudios (30 - 50%). La fecundidad (9,9 posturas/hembra y 147,5 huevos totales/hembra) también se encontró dentro del límite superior del rango de valores reportados (2,2 - 9,0 posturas/hembra y 28,0 - 164,6 huevos totales/hembra). Los trabajos consultados reportan valores de viabilidad de los huevos provenientes de hembras alimentadas con VIS algo mayores (62 y 75,5%) (Panizzi *et al.*, 2000a, 2002; Oliveira y Panizzi, 2003), que los registrados en este trabajo (58%). Las amplitudes en los rangos de estas variables podrían estar dadas por la calidad de los insectos, y/o por la calidad del alimento recibido en el estado adulto y/o en el estado de ninfa (Panizzi y Slansky, 1985a). El cambio de alimento de ninfa a adulto tiene efectos significativos en el desempeño de los adultos, una

adecuada alimentación en el estado de ninfa puede disminuir parcialmente los efectos deletéreos de una alimentación pobre en estado adulto (Panizzi, 1987). Panizzi *et al.* (2000a, 2002) y Oliveira y Panizzi (2003), alimentaron las ninfas con vainas de soja inmaduras, mientras que en este estudio recibieron chauchas, maní y granos de soja.

3.6.3. Preferencia alimentaria

Los adultos de *P. guildinii* tuvieron reacciones diferenciadas en relación a los alimentos evaluados, las cuales deben estar vinculadas a estímulos olfativos, visuales y/o mecánicos recibidos. En los insectos fitófagos con aparato bucal pico suctor, que particularmente basan sus decisiones para aceptar o rechazar un alimento en las señales mecánicas y químicas recibidas a nivel celular, muy poco se conoce sobre la identidad exacta de estas señales (Ventura *et al.*, 2000; Schoonhoven *et al.* 2005).

Las diferencias encontradas en las visitas a los alimentos, no se ajustan a la aptitud nutricional demostrada por los mismos en el estudio de la biología comparada (Schoonhoven *et al.*, 2005). La teoría óptima del forrajeo predice que adultos fitófagos deberían preferir alimentarse de aquellos hospederos donde el desarrollo y la reproducción son óptimos (Stephens y Krebs, 1986).

Existen considerables evidencias que los insectos compensan las deficiencias nutricionales de dos maneras, o seleccionan el alimento adecuado o regulan la cantidad que ingieren (Simpson y Raumheimer, 1993). Estos mecanismos probablemente son los que determinaron que las vainas verdes de soja y de lotus fueron los alimentos visitados con mayor frecuencia.

Los resultados obtenidos en el estudio de preferencia y en la biología comparada, confirman que VIS es uno de los alimentos preferidos de este insecto. Silva *et al.* (2013), determinaron que la diferente preferencia de *Euchistus heros* (F.) por variedades de soja, estuvo asociada a los compuestos no volátiles, particularmente altos tenores de azúcares.

La mayor frecuencia de inserción del estilete observada en VIL, pudo responder a la necesidad de consumir grandes cantidades de alimento como manera

de compensar la baja calidad nutricional de este alimento (Simpson y Simpson, 1990). También, la inserción del estilete pudo haber sido un comportamiento de prueba.

La menor visita a VIA, puede indicar que las concentraciones de compuestos químicos que atraen a los adultos de *P. guildinii* que contienen estas vainas son muy bajas o nulas, o que esos compuestos pueden encontrarse en otras partes de la planta. También podría ser que otros factores estén involucrados en el proceso de selección de este alimento. La ocurrencia estacional del insecto en cultivos de alfalfa, el valor del porcentaje de constancia y la abundancia de ninfas y adultos, así como el buen desempeño reproductivo y la longevidad de los adultos, indican que este es el hospedero alternativo preferido por el insecto y que tiene adecuada aptitud nutricional.

Los resultados obtenidos, demuestran que el comportamiento alimentario de este insecto es muy complejo, y que una misma actividad como la inserción del estilete puede responder a distintos comportamientos. Por lo tanto sería conveniente realizar este tipo de estudio utilizando la gráfica de penetración eléctrica (EPG), el cual permitiría cuantificar y realizar comparaciones estadísticas de los distintos comportamientos que ocurren dentro de la planta (Backus *et al.*, 2007).

Todas estas inferencias deberán ser dilucidadas en futuras investigaciones. Es fundamental conocer los perfiles bioquímicos de los tres alimentos y determinar los mecanismos que interviene en la selección del alimento por parte de los adultos de este insecto. Esto va a colaborar en el desarrollo de alternativas no químicas y proporcionar información de ecología química que puede ser muy útil en el establecimiento de programas de manejo sustentables.

3.7. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio, inéditos en cuanto a los alimentos evaluados, indican que la calidad del alimento tuvo efectos en algunos aspectos de la biología de ninfas y adultos de *P. guildinii*, y permitieron establecer el rol que cumplen las leguminosas forrajeras (alfalfa, lotus y trébol rojo) en la historia de vida de este

insecto, a pesar de las incertidumbres que quedaron planteadas respecto a la selección y preferencia del alimento por parte de los adultos. A partir de los resultados surge la necesidad de conocer los atributos químicos (nutrientes y no nutrientes) de los alimentos evaluados.

Panizzi (2000) distingue dos grandes grupos de especies vegetales, las plantas hospederas que son aquellos en las cuales los hemípteros fitófagos se desarrollan y reproducen, y las plantas alternativas que son las que utilizan como abrigo y/o como fuente de nutrientes y agua, pero no reproducen. De acuerdo a ello y a los resultados obtenidos se puede establecer que:

- El trébol rojo es una planta alternativa, porque las ninfas no pueden completar el ciclo y los adultos no generan descendencia. Por estas características este cultivo, que probablemente es fuente de agua y nutrientes cuando las otras especies vegetales no están disponibles, no contribuye sustancialmente a la población total que ingresa al cultivo de soja.
- El lotus, debe ser calificado como hospedero alternativo secundario, dado que como fuente de alimento tiene efectos negativos en la supervivencia de ninfas, y la longevidad de los adultos y en el desempeño reproductivo de las hembras es inferior a cuando se alimentan con vainas inmaduras de alfalfa.
- Las vainas inmaduras alfalfa, aunque las ninfas tuvieron una mortalidad mayor que en soja, es el componente más importante en la historia de vida de *P. guildinii*, porque la longevidad de los adultos de ambos sexos y el desempeño reproductivo de las hembras es igual o superior a cuando se alimentan con vainas inmaduras de soja.

3.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Backus EA, Cline AR, Ellerseick MR, Serrano MS. 2007. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. *Annals of the Entomological Society of America* 100(2): 296 - 310.

- 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.
- Gómez VA, Gaona EF, Arias OR, Lopez MB de, Ocampos OE. 2013. Aspectos biológicos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) criados con diferentes dietas en condiciones de laboratorio. *Revista Sociedad Entomología Argentina* 72: 27 - 34.
- Oliveira EDM, Panizzi AR. 2003. Performance of nymphs and adults of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean pods at different developmental stages. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology* 46(2): 187 - 192.
- 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 Experimenttalis Applicatta* 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, 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, 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, Slansky F Jr. 1985a*. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). Environmental Entomology 14(3): 237 - 242.
- 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.
- 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.

* Se utiliza la letra “a” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

- Ribeiro A, Castiglioni E, Silva H, Bartaburu S. 2009. Fluctuaciones poblacionales de pentatómidos (Hemiptera: Pentatomidae) en soja (*Glycine max*) y lotus (*Lotus corniculatus*). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 35: 429 - 438.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M. 2005. Insect-Plant Biology. Oxford: University Press. 421 p.
- Scriber JM, Slansky F Jr. 1981. The nutritional ecology of immature insects. Annual Review of Entomology 26: 183 - 211.
- Silva FAC, Carrão-Panizzi MC, Moraes MCB, Panizzi AR. 2013. Influence of volatile and nonvolatile secondary metabolites from soybean pods on feeding and on oviposition behavior of *Euschistus heros* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). Environmental Entomology 42(6): 1375 - 1382.
- Silva FAC, Panizzi AR. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). Revista Brasileira de Entomologia 52(1): 131 - 134.
- Simpson SJ, Raumheimer D. 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. Physiological Entomology 18(4): 395 - 403.
- Simpson SJ, Simpson CL. 1990. The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insects. En: Bernays, EA. (Ed.). Insect-plant interactions. Boca Raton: CRC Press. 111 - 160.
- Slansky F Jr., Panizzi AR. 1987. Nutritional ecology of seed sucking insects. En: Slansky F Jr., Rodriguez JG. (Eds.). Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates. New York: Wiley. 283 - 320.
- Stephens DW, Krebs JR. 1986. Foraging theory. Princeton: Princeton University Press. 247 p.

- Ventura MU, Moltanvan R, Panizzi AR. 2000. Feeding preferences and related types of behaviour of *Neomegalotomus parvus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97(3): 309 - 315.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014a. Nymph and adult seasonal occurrence on different plants and morphological and physiological changes of adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Uruguay. *Journal of Pest Science*, aceptado para publicar 29/10/2014, DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2.

* Se utiliza la letra “a” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

4. EFFECTO DE LOS FACTORES ABIÓTICOS (TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO) EN LA BIOLOGÍA DE *PIEZODORUS GUILDINII*

4.1. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del fotoperíodo y la temperatura en la biología de ninfas y adultos de *Piezodorus guildinii* (Westwood). Fueron consideradas cuatro condiciones (14:10, 12:12, 10:14 h L:O a 25 °C, y 10:14 h L:O a 20 °C), manteniendo la humedad relativa a $80 \pm 10\%$. El estado de ninfa tuvo una menor duración a 14hL-25 °C (21,5 días), mientras que la mayor duración se registró a 10hL-20 °C (42 días). La mayor y menor mortalidad de ninfas fue registrada en 10hL-20 °C y 14hL-25 °C (73,8 y 23,4% respectivamente). El peso promedio de las hembras adultas recién emergidas en el tratamiento 14hL-25 °C fue significativamente superior a los restantes tratamientos, los cuales fueron similares entre sí. No fueron detectadas diferencias en la ganancia de peso de los adultos. Los menores valores de longevidad de adultos se registraron a 14hL-25 °C, mientras que los mayores se registraron a 10hL-20 °C (38,6 vs. 98,8 días). El comportamiento reproductivo de las hembras varió con las condiciones evaluadas. El máximo porcentaje de oviposición se registró a 14hL-25 °C, y el mínimo con 10hL-20 °C (84,5 vs. 24,2%). El número de posturas sólo fue afectado por el fotoperíodo; las hembras criadas a 14hL y 12hL (25 °C) realizaron más posturas que en 10hL a 25 y 20 °C. El número de huevos por hembra varió con el fotoperíodo y la temperatura; el mayor valor se registró a 14hL-25 °C y el menor a 10hL-20 °C (196,2 vs. 21,7 huevos/♀). El porcentaje de huevos eclosionados fue similar en los diferentes fotoperíodos a 25 °C, y significativamente superior al de 10hL-20 °C. El período de incubación fue más largo a 10hL-20 °C, y más corto a 14hL-25 °C (7 vs. 4,1 días). Los resultados obtenidos sugieren que entre 30-35° de latitud S, *P. guildinii* no se reproduce en la entrefa del cultivo de soja, que se corresponde aproximadamente con las condiciones de 10hL-20 °C evaluadas en este estudio.

Palabras Clave: *Piezodorus guildinii*, biología, fotoperíodo, temperatura

4.2. ABSTRACT

The effect of photoperiod and temperature on the biology of nymphs and adults of *Piezodorus guildinii* (Westwood) was studied in the laboratory. Four different conditions were tested (14:10, 12:12 and 10:14 h L:D at 25 °C, and 10:14 h L:D at 20 °C), at 80 ± 10% RH. The shortest nymph development time was recorded at 14hL-25 °C (21.5 days) and the longest at 10hL-20 °C (42 days). The highest nymph mortality rate was recorded at 10hL-20 °C and the lowest at 14hL-25 °C (84.5 vs. 24.2%). Newly emerged females reared at 14hL-25 °C were heavier than those of the remaining treatments. Fresh body weight gain (mg) occurred only during the first week of adult life. Adult survivorship was highest at 10hL-20 °C and lowest at 14hL-25 °C. Total longevity was shortest when adults were held at 14hL-25 °C and longest at 10hL-20 °C (38.6 vs. 98.8 days). The maximum percentage of ovipositing females occurred at 14hL-25 °C and the minimum at 10hL-20 °C. Females maintained at 14hL-25 °C and 12hL-25 °C produced similar and greater number of egg masses than females at 10hL-25 °C and 10hL-20 °C. The number of eggs/female was the greatest at 14hL-25 °C and the lowest at 10hL-20 °C (196.2 vs 21.7 eggs/♀). Egg viability was similar under different photophases at 25 °C, while it was significantly reduced at 10hL-20 °C (54 vs. 4.1%). The longest egg incubation period was recorded at 10hL-20 °C and the shortest at 14hL-25 °C (7 vs. 4.1 days). These laboratory results suggest that *P. guildinii* does not reproduce during the time its preferred host, soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is unavailable at latitudes of S 30°-35°, which corresponds approximately to the conditions tested at 10hL-20 °C.

Key Words: *Piezodorus guildinii*, biology, photoperiod, temperature

4.3. INTRODUCCIÓN

La naturaleza variable de los factores abióticos y bióticos determina que las condiciones favorables para el crecimiento, desarrollo y reproducción de los insectos no sean permanentes. El fotoperíodo y la temperatura pueden ser considerados los principales factores abióticos que afectan la biología y el comportamiento de los insectos (Danks, 1987).

Algunos autores consideran que el fotoperíodo es el factor abiótico que influye más en la estacionalidad de los insectos dado que varía de manera previsible (Beck, 1980; Danks, 2007). Mientras que para los insectos el fotoperíodo es altamente reconocible, aun cuando las diferencias día a día son relativamente pequeñas, la temperatura es un factor menos informativo porque tiene fluctuaciones entre años (Danks, 2007). A pesar de que la temperatura muestra claras tendencias en el largo plazo, resulta difícil para los insectos integrar esta información de manera que le permita una respuesta estacional (Danks, 2007). Por lo tanto, si bien puede tener efectos por sí misma, en general actúa modificando o reforzando los efectos del fotoperíodo (Leather *et al.*, 1993).

Se considera que en zonas templadas el fotoperíodo es el factor abiótico principal en la regulación del proceso de diapausa de los hemípteros pentatómidos (Ali y Ewiess, 1977; Musolin y Numata, 2003b). En el caso particular de los heterópteros, en general a medida que aumentan las horas de luz se acelera el desarrollo, se reduce la mortalidad de ninfas y aumenta la fecundidad de los adultos; mientras que el desarrollo de huevos y ninfas, y la producción de huevos aumentan hasta que la temperatura alcanza cierto nivel, después de la cual estas variables disminuyen (Ali y Ewiess, 1977; Slansky y Panizzi, 1987; Higuchi, 1994; Chocorosqui y Panizzi, 2002; Mourão y Panizzi, 2002; Musolin y Numata, 2003a; Chocorosqui y Panizzi, 2003).

Existen muchos ejemplos de respuestas al fotoperíodo corto (12 horas o menos) y la inducción de la diapausa en Heteroptera. Algunos de ellos son *Eurydema rugosa* (Numata y Yamamoto, 1990), *Oebalus poecilus* (Dallas) (Albuquerque, 1989, 1993), *Dolycoris baccarum* (L.) (Hodek y Hodková, 1993), *Aelia fieberi* (Scott)

(Nakamura y Numata, 1997), *Dybowskyia reticulata* (Nakamura y Numata, 1998), *Euchistus heros* (F.) (Mourão y Panizzi, 2000, 2002), *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Chocorosqui y Panizzi, 2003) y *Nezara viridula* (L.) (Musolin y Numata, 2003a). En algunas especies de insectos se ha encontrado que la temperatura puede modificar las respuestas al fotoperíodo y en consecuencia la inducción a la diapausa (Kobayashi y Numata, 1995). La exposición a bajas temperaturas puede reforzar el efecto del fotoperíodo corto en la inducción de la diapausa (Chocorosqui y Panizzi, 2002). Para los pentatómidos *Halyomorpha halys* (Stål) y *Scotinophara lurida* (Burmeister), Niva y Takeda (2003) y Cho *et al.* (2008), registraron un incremento en el porcentaje de individuos que ingresaban en diapausa cuando había una disminución de la temperatura en fotoperíodos cortos.

A pesar de la importancia económica que tiene *Piezodorus guildinii* (Westwood) para el cultivo de soja en el Cono Sur de América del Sur, particularmente en Uruguay, los estudios de biología fueron realizados sin tener en cuenta los efectos de estos factores abióticos (Fraga y Ochoa, 1972; Panizzi y Smith, 1977; Panizzi *et al.*, 1980; Costa y Link, 1982; Panizzi y Slansky, 1985a, b; Panizzi, 1992; Cividanes y Parra, 1994; Serra y La Porta, 2001; Arroyo y Kamawura, 2003; Massoni y Frana, 2007). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del fotoperíodo y de la temperatura en el desarrollo de las ninfas, longevidad de los adultos, ganancia de peso y en la performance reproductiva.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Rutina de mantenimiento de la cría de insectos

Al inicio del experimento, en octubre, se colectaron adultos de *P. guildinii*, en el campo de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S 34° 20' W 57° 41'), los cuales en el laboratorio fueron colocados en cajas de plástico transparente (25 × 20 × 20 cm) forradas con papel de filtro y en la tapa del recipiente se colocaron hilos de 30 cm de largo de lana sintética para que las hembras realicen la oviposición (Silva y Panizzi, 2008). El alimento proporcionado fue vainas verdes de poroto *Phaseolus*

vulgaris L., semillas de soja *Glycine max* (L.) Merrill y maní *Arachis hypogaea* L. El alimento fue reemplazado día por medio y diariamente se les suministró agua destilada, para lo que se utilizó un algodón humedecido en un contenedor plástico (1,0 cm Ø). Las condiciones de temperatura y humedad fueron 25 ± 1 °C, $80 \pm 10\%$ RH y un fotoperíodo de 14:10 h L:O (Tres luces TLD 18W/54-765 dispuestas horizontalmente a 20 cm de distancia de los contenedores). Para mantener la humedad, el papel de filtro fue rociado con agua todos los días.

Las posturas fueron retiradas, y previo a la aplicación de los tratamientos fueron mezcladas con el objetivo de evitar efectos maternos. Para evaluar el efecto del fotoperíodo y la temperatura en la biología de ninfas y adultos, las cuatro condiciones (tratamientos) evaluadas fueron: 14:10, 12:12, y 10:14 h L:O a 25 ± 1 °C, y 10:14 h L:O a 20 ± 1 °C. Cada cámara de crecimiento constó de cuatro luces tipo Day light TLT 20W/54 RS colocadas verticalmente en la puerta. El fotoperíodo de 14:10 h L:O y 25 °C representó aproximadamente las condiciones del solsticio de verano, mientras que el fotoperíodo de 10:14 h L:D y 20 °C simuló las condiciones del otoño en un rango de latitud entre 30° y 35° S.

4.4.2. Biología de huevos y ninfas

Los huevos fueron acondicionadas en placas de Petri de 9,0 de Ø × 1,5 cm, cubiertas con papel de filtro humedecido, las cuales fueron colocados en cámaras de cría con las condiciones de fotoperíodo y temperatura de cada tratamiento descritas anteriormente. Cada postura permaneció en evaluación durante un período aproximado de tres semanas, cuando se observó la presencia de hongos contaminantes. Diariamente se evaluó la eclosión. La humedad relativa fue mantenida constante a $80 \pm 10\%$. Las cámaras fueron monitoreadas diariamente utilizando registradores HOBO ®, modelo U23-001 (Onset Computer, Pocasset, Massachusetts). Las ninfas de primer estadio solo recibieron agua destilada y en el primer día del segundo estadio fueron colocadas en forma individual en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) recubiertas de papel de filtro humedecido. Las ninfas recibieron el mismo tratamiento respecto al alimento y

suministro de agua que los adultos de la cría de insectos. Diariamente se registró el cambio de estadio y la mortalidad, y al emerger los adultos se determinó el sexo y el peso fresco con una balanza electrónica (OHAUS Pioneer™) (aproximación 0,1 mg). Para cada tratamiento se determinó la duración del estado de huevo, de cada estadio y total del estado de ninfa, y la supervivencia de cada estadio ninfal y la mortalidad total. Cada individuo fue considerado una réplica ($n > 30$). Este experimento fue repetido dos veces y las cámaras de cría fueron reasignadas por sorteo.

4.4.3. Biología de adultos

Las posturas obtenidas y acondicionadas como fue descrito anteriormente, fueron dispuestas en las cuatro condiciones de fotoperíodo y temperatura establecidas. La humedad relativa se mantuvo constante ($80 \pm 10\%$). La temperatura y humedad de las cámaras fueron monitoreadas utilizando registradores HOBO® modelo U23-001. Durante el primer estadio las ninfas sólo fueron mantenidas con agua destilada y en el primer día del segundo estadio, grupos de 10 ninfas fueron colocados en cajas plásticas de poliestireno cristal ($11,0 \times 11,0 \times 3,5$ cm) forradas en el fondo con papel de filtro humedecido. Cuando emergieron los adultos, en cada tratamiento se formaron aproximadamente 30 parejas; cada una de ellas fue colocada en una caja plástica con el fondo forrado con papel de filtro humedecido. La metodología para el mantenimiento de las ninfas y de las parejas de adultos (alimento y agua) fue la misma que la descrita en la cría de insectos. Desde el momento de la emergencia, una vez por semana y hasta la muerte se registró el peso fresco de ambos sexos, para lo cual se utilizó una balanza electrónica (OHAUS Pioneer™) (aproximación 0,1 mg). Cuando murió un integrante de la pareja, el mismo no fue reemplazado. Diariamente se registró la mortalidad, el número de huevos y la emergencia de ninfas.

Para cada tratamiento se calculó la supervivencia y la longevidad de ambos sexos y el efecto de los tratamientos en la actividad reproductiva fue evaluado a través del porcentaje de hembras que ovipusieron, del período de preoviposición, del número de posturas por hembra y del número de huevos totales por hembras, y de la

viabilidad de los huevos. El diseño experimental fue de parcelas completamente al azar y cada pareja fue considerada una réplica. Este experimento fue repetido dos veces, y las cámaras de cría fueron reasignadas por sorteo.

4.4.4. Análisis de datos

La duración del estado de huevo, de cada estadio y el tiempo de desarrollo total de las ninfas fueron analizados mediante modelos lineales generalizados con distribución Poisson y función logarítmica (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). La supervivencia de ninfas en cada estadio y la mortalidad total fue analizada utilizando modelos lineales generalizados con distribución binomial y función logit (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). En todos los casos los resultados son presentados como la máxima verosimilitud de la distribución Chi cuadrado.

El peso fresco de los adultos a la emergencia fue analizado con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2), dado que la varianza fue homogénea y no se encontró asociación entre la media y la varianza. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ($P \leq 0,05$). Las diferencias de peso fresco entre sexos fueron comparadas con la prueba t Student ($P \leq 0,05$).

El análisis de la supervivencia de adultos a través del tiempo se realizó mediante regresiones lineales simples para cada tratamiento. Para cumplir con los supuestos de la regresión lineal, los datos fueron transformados a LN (x +1). Las pendientes (b) de las ecuaciones fueron comparadas con la prueba t de Student ($P \leq 0,05$).

El porcentaje de oviposición fue analizado por medio de modelos lineales generalizados con distribución binomial y función logit (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Para el análisis de los datos del período de preoviposición, el número de posturas y de huevos totales por hembra, y la longevidad, debido a que son variables discretas que presentaron una fuerte asociación entre la media y la varianza, se utilizaron modelos lineales generalizados con distribución Poisson o

binomial negativa y función logarítmica (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2).

La viabilidad de los huevos fue analizada con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2), dado que la varianza fue homogénea y no se encontró asociación entre la media y la varianza. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ($P \leq 0,05$).

El cambio de peso fresco de los adultos fue analizado con modelos lineales generales mixtos (Proc MIXED, SAS Institute, versión 9.2), el peso inicial medido en el primer día de adulto fue la co-variable y los pesos subsiguientes fueron considerados como medidas repetidas. La estructura de covarianza que ajustó fue ANTE (1). Para la prueba de heterogeneidad de las pendientes, el modelo incluyó el término de interacción ganancia por tratamiento.

Los resultados de las repeticiones de los dos experimentos fueron similares, por lo que los datos fueron combinados en los análisis estadísticos.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Biología de huevos

Los tratamientos impuestos tuvieron un efecto altamente significativo en el período de incubación de los huevos de *P. guildinii* ($\chi^2 = 23,4$ gl = 3 $P < 0,0001$). A medida que hubo acortamiento de la fotofase y la temperatura disminuyó el período de incubación de huevos fue mayor. La disminución de la fotofase de 14 a 12 hL a 25 °C, causó un incremento significativo en la duración del período de incubación de 4,1 a 5,8 días. Por su parte, la disminución de la temperatura de 25 a 20 °C en fotofase corta provocó un aumento significativo en el tiempo requerido para la emergencia de huevos de 5,8 a 7,1 días (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Tiempo de desarrollo medio (\pm EEM) de huevos y ninfas de *Piezodorus guildinii*, y porcentaje de mortalidad total de ninfas, en diferentes fotoperíodos y temperaturas en condiciones de laboratorio.

Condiciones	Tiempo de desarrollo (días)						Mortalidad		
	Estadio						Total		Total (%)
	Huevo	1er	2do	3er	4to	5to	Hembras	Machos	
10 h - 20 °C	7,0 \pm 0,2 a ¹ [149] ²	4,6 \pm 0,2 a [83]	9,3 \pm 0,3 a [64]	8,7 \pm 0,5 a [48]	8,0 \pm 0,3 a [39]	11,7 \pm 0,4 a	41,9 \pm 0,9a	42,2 \pm 1,2a	73,8 a
10 h - 25 °C	5,8 \pm 0,1 b	3,4 \pm 0,1 b [75]	5,5 \pm 0,2 b [68]	4,8 \pm 0,2 b [57]	4,9 \pm 0,2 b [50]	6,3 \pm 0,2 b [37]	24,5 \pm 0,5b	25,1 \pm 0,4b	50,7 b
12h - 25 °C	5,4 \pm 0,1 b	2,8 \pm 0,1 b [55]	5,3 \pm 0,2 b [46]	4,6 \pm 0,2 b [41]	4,5 \pm 0,2 bc [37]	6,7 \pm 0,2 b [32]	24,5 \pm 0,5b	23,9 \pm 0,4bc	40,0 b
14h - 25 °C	4,1 \pm 0,1 c	3,1 \pm 0,2 b [47]	5,3 \pm 0,4 b [44]	4,7 \pm 0,5 b [42]	3,7 \pm 0,3 c [39]	5,1 \pm 0,4 c [36]	21,2 \pm 0,8b	22,0 \pm 0,5c	23,4 c

¹ Medias en cada columna, seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

² Número de ninfas que completaron cada estadio.

4.5.2. Biología de ninfas

4.5.2.1. Supervivencia y mortalidad total

En la supervivencia de ninfas hubo efecto de los tratamientos entre los estadios 2do y 4to (2do $\chi^2 = 51,2$ gl = 3 $P < 0,0001$; 3er $\chi^2 = 9,3$ gl = 3 $P = 0,02$; 4to $\chi^2 = 9,2$ gl = 3 $P = 0,03$). En el 5to estadio la supervivencia fue similar en todos los tratamientos ($\chi^2 = 4,6$ gl = 3 $P = 0,20$).

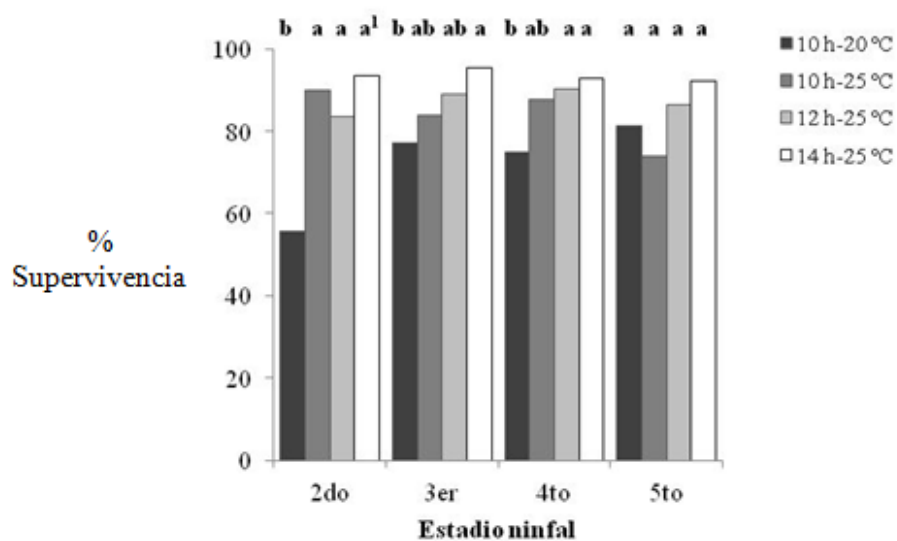


Figura 4.1. Supervivencia de ninfas de *Piezodorus guildinii* en los diferentes estadios para las distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura. ¹Medias en cada estadio seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

En la supervivencia de ninfas, las mayores diferencias entre tratamientos ocurrieron en el 2do estadio. El descenso de la temperatura de 25 a 20 °C en 10 h de fotofase tuvo un efecto más notorio, que la disminución de la duración de la fotofase a 25 °C. En este estadio, el menor valor de supervivencia de ninfas se registró con 10h-20 °C (55,7%), mientras que en los tratamientos con distintas fotofases a 25 °C los valores obtenidos estuvieron en el rango de 83,6 a 93,6%, los cuales fueron

similares entre sí (Figura 4.1).

A partir del tercer estadio en el tratamiento 10hL-20 °C la supervivencia de las ninfas fue mayor que en el 2do estadio; mientras que en el resto de los tratamientos los valores registrados en todos los estadios fueron similares. Esto determinó que las diferencias entre tratamientos fueran cada vez menos marcadas, mientras que en el 3er y 4to estadio sólo hubo diferencias entre los valores de los tratamientos de 10h-20 °C y 14hL-25 °C. En el 5to estadio la supervivencia ninfal de todos los fue similar (Figura 4.1).

La mortalidad total de ninfas (estadios 2-5), varió en función de los cambios en la fotofase y la temperatura ($\chi^2 = 47,0$ gl = 3 $P < 0,0001$). Se registró un aumento a medida que la duración de la fotofase y la temperatura disminuyeron. A 14hL-25 °C la mortalidad total de ninfas fue menor (23,4%) que los valores registrados a 12 y 10hL a 25 °C (40 y 50,7%, respectivamente), los cuales fueron similares entre sí. Cuando la temperatura descendió de 25 a 20 °C en condiciones de fotofase corta (10 h) la mortalidad total de ninfas aumentó significativamente de 50,75 a 73,8% (Cuadro 4.1).

4.5.2.2. Tiempo de desarrollo

El tiempo de desarrollo del estado de ninfa varió significativamente en función de los tratamientos (1er estadio $\chi^2 = 18,3$ gl = 3 $P = 0,0004$) (estadios 2do $\chi^2 = 66,70$; 3ero $\chi^2 = 66,49$; 4to $\chi^2 = 58,6$; 5to $\chi^2 = 116,0$ gl = 3 $P < 0,0001$). Durante los tres primeros estadios, la tasa de desarrollo fue similar en los tratamientos con diferente fotofase y 25 °C. Por su parte, en el 4to y 5to estadio la duración de la fotofase tuvo efectos en el tiempo de desarrollo, los cuales se completaron de manera más rápida y más lenta en condiciones de fotofase larga (14 h) y corta (10 h), respectivamente. En cambio, la disminución de la temperatura en condiciones de fotofase corta provocó un aumento significativo en la duración de todos los estadios (Cuadro 4.1)

Los tratamientos impuestos tuvieron efectos en ambos sexos en la duración del estado de ninfa (hembras $\chi^2 = 156,2$; machos $\chi^2 = 155,3$ gl = 3 $P < 0,0001$), aunque

los factores (fotofase y temperatura) incidieron de manera diferente. En las hembras la duración del estado de ninfa fue similar en las tres fotofases a 25 °C, con un rango de 21,2 a 24,5 días. En los machos la duración de la fotofase tuvo efectos en el tiempo de desarrollo, a 10 hL (25,1 días) fue significativamente mayor que con una fotofase de 14 hL (22,0 días). La disminución de la temperatura de 25 a 20 °C en condiciones de fotofase corta aumentó significativamente el tiempo que necesitaron las ninfas de ambos sexos en completar el estado en condiciones de fotoperíodo corto (Cuadro 4.1).

4.5.2.3. Peso fresco de los adultos en la emergencia

En el peso fresco de los adultos recién emergidos, ambos sexos tuvieron una respuesta diferencial a los tratamientos. En las hembras recién emergidas hubo efecto de los mismos ($F_{3,151} = 10,4$ $P < 0,0001$), y fueron significativamente más pesadas cuando estuvieron en condiciones de fotoperíodo largo (14h-25 °C) que en los restantes tratamientos (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Peso fresco medio (\pm EEM) de los adultos de *Piezodorus guildinii* en la emergencia, mantenidos en diferentes fotoperíodos y temperaturas en condiciones de laboratorio.

Condiciones	Peso fresco (mg)	
	Hembras	Machos
10 h - 20 °C	49,84 \pm 0,69 bA ¹	43,71 \pm 0,54 aB
10 h - 25 °C	51,55 \pm 1,07 bA	45,34 \pm 0,96 aB
12 h - 25 °C	49,93 \pm 0,72 bA	46,37 \pm 0,66 aB
14 h - 25 °C	56,70 \pm 1,37 aA	46,68 \pm 1,68 aB

¹ Medias seguidas por la misma letra, minúscula para las columnas y mayúsculas para las filas no difieren significativamente para las pruebas de Tukey-Kramer (HDS) y prueba t-Student, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Por el contrario el peso fresco de los machos fue similar en todas las condiciones de fotoperíodo y temperatura evaluadas ($F_{3,143} = 2,2$ $P = 0,09$). Las hembras fueron más pesadas que los machos en todas las condiciones evaluadas (Cuadro 4.2).

4.5.3. Biología de adultos

4.5.3.1. Supervivencia y longevidad

La supervivencia de adultos disminuyó con el tiempo en todos los tratamientos. Las variaciones registradas fueron diferentes en los sexos. En las hembras en las diferentes fotofase a 25 °C la disminución en la supervivencia fue similar y mayor que la registrada a 10hL-20 °C (Cuadro 4.3). Por el contrario en la supervivencia de los machos hubo efecto de ambos factores. El valor de la pendiente del tratamiento de fotoperíodo largo (14hL-25 °C) fue significativamente mayor que los obtenidos para 12 y 10 h de luz a 25 °C, los cuales fueron similares entre sí, y a la vez estos últimos fueron mayores que el correspondiente a 10hL-20 °C (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Pendiente de la regresión lineal simple (b) entre LN (% Supervivencia+1) y el tiempo, coeficiente de correlación (r), y longevidad media (\pm EEM) de adultos de *Piezodorus guildinii* en diferentes fotoperíodos y temperaturas en condiciones de laboratorio.

Tratamientos	b ¹	r	b	r	Longevidad (días) ²	
	Hembras		Machos		Hembras	Machos
10 h - 20 °C	-0,005 \pm 0,001 b	0,91 *	-0,007 \pm 0,001 c	0,96 *	107,4 \pm 12,9 a [33] ³	94,1 \pm 11,9 a [33]
10 h - 25 °C	-0,022 \pm 0,005 a	0,91 *	-0,019 \pm 0,003b	0,96 *	62,8 \pm 6,13 b [33]	63,4 \pm 7,1 b [35]
12 h - 25 °C	-0,020 \pm 0,002 a	0,97 *	-0,018 \pm 0,002 b	0,98 *	50,8 \pm 5,7 bc [37]	60,3 \pm 6,3 b [37]
14h - 25 °C	-0,025 \pm 0,004 a	0,96 *	-0,043 \pm 0,005 a	0,97 *	46,1 \pm 5,4 c [32]	31,2 \pm 3,8 c [32]

¹ Valores en cada columna, seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba t ($P \leq 0,05$).

² Medias en cada columna, seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

³ Número de adultos.

⁴ * $P \leq 0,0001$.

La variación en la duración de la fotofase y en la temperatura tuvieron efectos estadísticamente significativos en la longevidad de los adultos, con una respuesta similar en los dos sexos (hembras $\chi^2 = 21,7$; machos $\chi^2 = 29,7$ gl = 3 $P < 0,0001$) (Cuadro 4.3). Los adultos más y menos longevos fueron los que estuvieron expuestos a condiciones de fotofase corta (10 h) y 20 °C (♀ = 107,4 y ♂ = 94,1 días) y larga (14 h) y 25 °C (♀ = 46,1 y ♂ = 31,2 días), respectivamente (Cuadro 4.3).

4.5.3.2. Desempeño reproductivo

El desempeño reproductivo de las hembras varió en función de los cambios en la duración de la fotofase y en la temperatura. Los tratamientos tuvieron efectos altamente significativos en el porcentaje de hembras que ovipusieron ($\chi^2 = 27,2$ gl = 3 $P < 0,0001$). El máximo y mínimo valor fue registrado en los tratamientos 14hL-25 °C (84,5%), y 10hL-20 °C (24,2%), respectivamente. Por su parte, los valores obtenidos en 12hL-25 °C (61,5%) y 10hL-25 °C (62,1%), fueron diferentes de los otros dos tratamientos y similares entre sí (Cuadro 4.4).

Hubo efectos altamente significativos de los tratamientos en la duración del período de preoviposición, del número de posturas y de huevos por hembra ($\chi^2 = 62,9$; $\chi^2 = 60,6$; $\chi^2 = 29,9$ gl = 3 $P < 0,0001$, respectivamente), y de la viabilidad de los huevos ($F_{3,77} = 15,0$ $P < 0,0001$). El período de preoviposición más corto se registró cuando las hembras fueron mantenidas en condiciones de 14h-25 °C (8,0 días), mientras que el más largo fue con 10hL-20 °C (50,1 días). Para esta variable los valores correspondientes a 12hL-25 °C (11,3 días) y a 10hL-25 °C (14,5 días), fueron similares entre sí y diferentes del mayor y menor valor, aunque los valores fueron más cercanos a 14hL-25 °C (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Desempeño reproductivo medio (\pm EEM) de las hembras de *Piezodorus guildinii* en diferentes fotoperíodos y temperaturas en condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Oviposición (%)	Período preoviposición (días)	Número/hembra		Eclosión de Huevos (%)
			Posturas	Huevos	
10 h - 20 °C	24,2 c ¹ [33] ³	50,1 \pm 22,0 a ¹ [8]	3,1 \pm 1,0 b ¹ [7]	21,7 \pm 5,0 d ¹ [7]	4,1 \pm 4,5 b ² [7]
10 h - 25 °C	62,1b [30]	14,5 \pm 2,2 b [16]	3,6 \pm 0,6 b [16]	48,2 \pm 7,9 c [16]	54,6 \pm 9,1 a [19]
12 h - 25 °C	61,5 b [39]	11,3 \pm 1,4 b [19]	6,9 \pm 0,9 a [25]	106,3 \pm 29,5 b [22]	43,6 \pm 5,3 a [24]
14 h - 25 °C	84,5 a [33]	8,0 \pm 0,4 c [26]	8,8 \pm 1,4 a [27]	196,2 \pm 34,7 a [27]	64,2 \pm 3,7 a [27]

¹ Medias en cada columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

² Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren significativamente para la prueba de Tukey-Kramer (HSD) ($P \leq 0,05$).

³ Número de hembras.

En el número de posturas sólo la duración de la fotofase tuvo efecto significativo. Cuando las hembras fueron mantenidas con 14 y 12 h de luz a 25 °C, depositaron la mayor cantidad de posturas (8,8 y 6,9 posturas/hembra, respectivamente), valores que fueron similares entre sí y mayores que los correspondientes a los tratamientos con fotofase corta (10 h) (25 y 20 °C) (3,6 y 3,1

posturas/hembra, respectivamente), los cuales fueron semejantes entre sí (Cuadro 4.4).

La fecundidad, expresada como el número total de huevos por hembra fue diferente en todos los tratamientos. Los mayores y menores valores registrados correspondieron a 14hL-25 °C (196,2 huevos) y 10hL-20 °C (21,7 huevos), respectivamente (Cuadro 4.4). En cambio, la fertilidad de los huevos provenientes de las hembras mantenidas en diferentes fotofase a 25 °C fue similar. El descenso de la temperatura de 25 a 20 °C con 10 h de fotofase causó una disminución significativa en la viabilidad de los huevos de 54,6% a 4,1%, respectivamente (Cuadro 4.4).

4.5.3.3. Ganancia de peso

Durante las dos primeras semanas de vida, los adultos ganaron peso, siendo considerablemente mayor la ganancia en las hembras que en los machos (Figura 4.2 A, B). Sin embargo, los cambios en el peso fresco fueron similares en todas las condiciones evaluadas (interacción tratamiento*edad $F_{3,949} = 1,5$ $P = 0,22$).

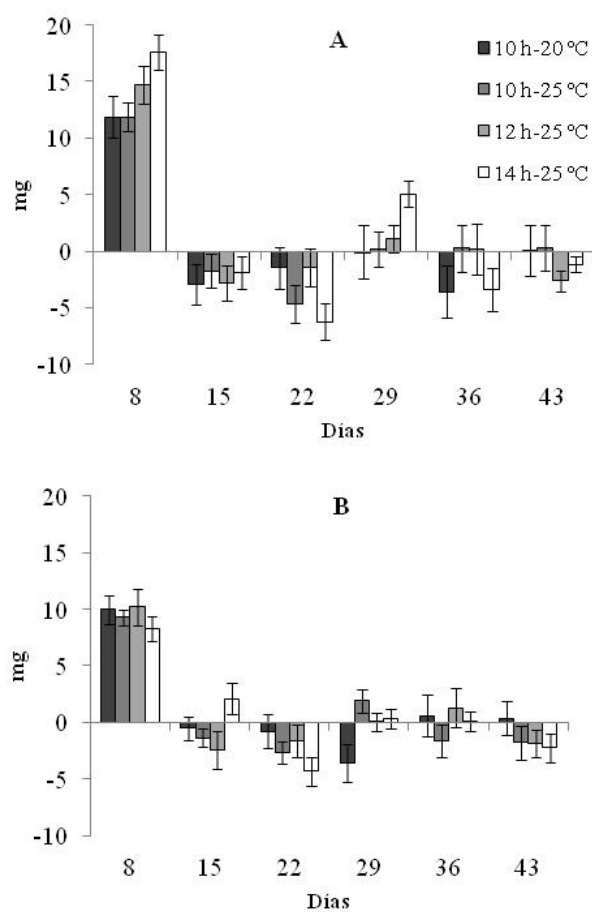


Figura 4.2. Cambio en el peso fresco medio (\pm EEM) (mg) durante las primeras seis semanas de vida de los adultos de *Piezodorus guildinii* para las distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura: A) hembras; B) machos.

4.6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los dos experimentos indican que ambos factores, la duración de la fotofase y la temperatura, tuvieron efectos en la biología de ninfas y adultos. La importancia de uno u otro, fue variable en los distintos estados del insecto y en las diferentes variables consideradas en cada estado.

4.6.1. Biología de huevos

El período de incubación de los huevos aumentó significativamente a medida que la fotofase y la temperatura disminuyeron. En diferentes especies de pentatómidos se ha constatado que existe variación en la respuesta a estos factores abióticos. En *E. heros* la duración de la fotofase tuvo un efecto similar al determinado en este estudio para *P. guildinii* (Mourão y Panizzi, 2000). Por el contrario el período de incubación de huevos de *N. viridula* y *O. poecilus* fue similar cuando varió la duración de la fotofase (Ali y Ewiess, 1977; Albuquerque, 1989, 1993). Esto puede ser debido a que los embriones de las diferentes especies de pentatómidos tienen diferente sensibilidad a los cambios en la duración de la fotofase, o ser efecto de diferentes calidades de luz utilizadas en los diferentes trabajos.

Respecto al efecto de la temperatura, Cividanes y Parra (1994) reportaron que en condiciones de fotoperíodo largo (14 h) los huevos de *P. guildinii* eclosionaron más rápido cuando la temperatura se incrementó de 20 a 26 °C; y no encontraron diferencias dentro del rango de 26 a 28 °C. El período de incubación a 26 °C (4,2 días) fue similar al registrado en este trabajo en condiciones similares (14 h y 25 °C) (4,1 días). Sin embargo, Cividanes y Parra (1994) en condiciones de 20 °C determinaron un período de incubación mayor (9 días) que el obtenido en este experimento en fotofase corta (10 h) y la temperatura 20 °C (7 días). Esta diferencia podrían ser atribuida al hecho de que los insectos de ambos estudios fueron colectados en dos regiones con diferentes regímenes climáticos, subtropical y templado, respectivamente (Latitud S 23° 18' y S 34° 20', respectivamente). La temperatura umbral para el desarrollo de un insecto y/o los grado días requeridos para completar el desarrollo puede variar con la latitud como resultado de adaptaciones locales a las condiciones climáticas (Stacey y Fellowes, 2002). En general, a bajas temperaturas las especies que tienen umbrales de desarrollo más bajos tienen una tasa de desarrollo más rápida que aquellas que tienen umbrales más altos (Trudgill *et al.*, 2005).

Diferentes trabajos referidos a otras especies de pentatómidos establecen, tal cual los resultados obtenidos en este estudio, que la disminución de la temperatura provoca un incremento en el tiempo de desarrollo de los huevos. En condiciones de fotoperíodo corto (10 h), el período de incubación de huevos de *N. viridula* a 20 °C fue significativamente más largo que a 25 °C (Ali y Ewiess, 1977). Cuando los huevos de *D. melacanthus* fueron incubados en fotoperíodo largo (14 h) a 20 °C no emergieron ninfas (Chocorosqui y Panizzi, 2002).

4.6.2. Biología de ninfas

En algunos aspectos de la biología de ninfas, como la supervivencia y tasa de desarrollo de las ninfas, el descenso de la temperatura en condiciones de fotofase corta (10 h) tuvo un efecto más notorio, que el acortamiento de la fotofase a 25 °C. En cambio la variación de ambos factores tuvo efectos en la mortalidad total.

Los resultados de supervivencia obtenidos, sugieren que la supervivencia de ninfas permanece inalterada cuando la fotofase se reduce a 25 °C, y que por el contrario la disminución de la temperatura en fotofase corta tiene importantes efectos negativos. El 2do estadio demostró ser el más sensible de todos a las temperaturas iguales o menores 20 °C. Panizzi y Smith (1977) también encontraron que la mortalidad de las ninfas de 2do estadio de *P. guildinii* era muy alta. *Dichelops melacantus* mostró tener la misma sensibilidad cuando fue criada en condiciones de fotofase corta a 20 °C (Chocorosqui y Panizzi, 2002).

La disminución en el largo de la fotofase y en la temperatura causó un aumento en la mortalidad total de ninfas. Cividanes y Parra (1994) encontraron que en condiciones de fotofase larga la mortalidad de ninfas de *P. guildinii* fue similar cuando las temperaturas eran de 26 °C y 20 °C. Los resultados obtenidos en ambos trabajos, sugieren que las ninfas sólo tienen una menor adaptabilidad a las bajas temperaturas (iguales o menores a 20 °C) cuando se desarrollan en fotofase corta. Por lo tanto es posible inferir que en las regiones templadas donde el insecto está presente, las ninfas no podrían sobrevivir desde mediados de otoño y durante el

invierno. En el estudio de la ocurrencia estacional realizado por Zerbino *et al.* (2014a), se reporta que las ninfas estuvieron ausentes en los muestreos realizados entre junio y noviembre.

En otras especies de pentatómidos también se observó que la mortalidad total de ninfas varió como consecuencia de la duración de la fotofase. Mourão y Panizzi (2000) observaron que la mortalidad de ninfas de *E. heros* fue mayor en condiciones de fotoperíodo corto en comparación al fotoperíodo largo (56,7 vs. 28,3%). Chocorosqui y Panizzi (2003) determinaron que a 25 °C la mayor mortalidad total de ninfas de *D. melacanthus* (60%) se registró en condiciones de fotoperíodo corto. Estos autores obtuvieron 100% de mortalidad cuando las ninfas eran criadas a 20 °C en condiciones de fotoperíodo largo (Chocorosqui y Panizzi, 2002). Por el contrario, Ali y Ewiess (1977), determinaron que la variación en la duración de la fotofase, tiene un efecto menos notorio en la mortalidad de ninfas de *N. viridula*, que cuando se produce un descenso de la temperatura de 25 a 20 °C en una misma fotofase.

La disminución del largo de la fotofase a 25 °C provocó un incremento en el tiempo necesario para completar los mismos sólo en los estadios 4to y 5to. Como consecuencia del efecto del largo de la fotofase en la duración de los distintos estadios ninfales, el tiempo de desarrollo del estado de ninfa fue similar en las tres fotofases cuando la temperatura fue 25 °C. Resultados similares fueron reportados por Albuquerque (1989) para *O. poecilus*. Por el contrario, otras especies de pentatómidos, como *N. viridula*, *E. heros* y *D. melacanthus*, completaron el estado en menos tiempo cuando la duración de la fotofase fue mayor (Ali y Ewiess, 1977; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Mourão y Panizzi, 2000). Estas diferencias en el efecto del largo de la fotofase en la duración del estado de ninfas de las distintas especies, sugiere que tienen distinta sensibilidad a las horas de luz y/o que la misma puede manifestarse en distintos estados de desarrollo (Saulich y Musolin, 2012), lo cual destaca la importancia que tiene realizar estudios locales para determinar el efecto de los factores abióticos en la biología y comportamiento de los insectos (Ali y Ewiess, 1977).

En el tiempo de desarrollo del estado de ninfa, la disminución de la temperatura acentuó de forma significativa el efecto de la fotofase corta; ambos sexos requirieron un 40% más de tiempo para completar este estado cuando la temperatura disminuyó de 25 a 20 °C. Los valores de duración del estado de ninfa de *P. guildinii* determinados por Cividanes y Parra (1994) en condiciones de 14 h a 26 °C (20,2 días) y a 20 °C (44,2 días) fueron similares a los obtenidos en este estudio para los tratamientos 14 h a 25 °C (21,2 días) y 10 h a 20 °C (41,9 días). Ambos resultados indicarían que la temperatura ejerce un efecto mayor que el fotoperíodo en el desarrollo del estado de ninfa.

Similares resultados fueron obtenidos en otras especies de pentatómidos. Chocorosqui y Panizzi (2003) encontraron también que la temperatura tuvo efectos significativos en la duración del estado de ninfa de *D. melacanthus*, estableciendo que los valores tendieron a ser mayores cuando la temperatura disminuyó y que por debajo de 20 °C las ninfas no se desarrollaron. Ali y Ewiess (1977), determinaron que la tasa de desarrollo de las ninfas de *N. viridula* disminuyó cuando la temperatura aumentó en un rango de temperaturas entre 20 y 30 °C en diferentes fotoperíodos.

El peso de los adultos al momento de la emergencia varió con los tratamientos en forma diferencial en los dos sexos. Los machos fueron insensibles a las variaciones en la duración de la fotofase y en la temperatura, mientras que en las hembras se produjo una reducción en el peso cuando la duración de la fotofase disminuyó de 14 a 12 h. Otros autores encontraron el mismo efecto de la duración de la fotofase en el peso de los adultos al momento de la emergencia, cuando estudiaron distintas especies de pentatómidos. Mourão y Panizzi (2000) para *E. heros*, y Chocorosqui y Panizzi (2003) para *D. melacanthus* observaron que el peso de las hembras tendió a ser mayor en condiciones de fotoperíodo largo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por el contrario Ali y Ewiess (1977) encontraron que sólo la variación de la temperatura produjo efectos en el peso fresco de adultos recién emergidos de *N. viridula*; los adultos fueron más pesados cuando la temperatura de desarrollo de las ninfas fue de 20 °C en comparación con

25 °C.

4.6.3. Biología de adultos

A diferencia de las respuestas obtenidas con las ninfas, ambos factores (duración de la fotofase y temperatura) tuvieron efectos importantes en la supervivencia y longevidad de los adultos, así como también en el rendimiento reproductivo de las hembras. La ganancia de peso de los adultos en ambos sexos fue similar en todas las condiciones evaluadas.

La variación en la duración de la fotofase y en la temperatura tuvo efectos diferenciales en la supervivencia de los adultos de ambos sexos. En las hembras, sólo el descenso de la temperatura en condiciones de fotofase corta tuvo efectos negativos en la supervivencia. Por el contrario en los machos hubo efectos de ambos factores. A 25 °C la tasa de disminución de la supervivencia aumentó significativamente cuando la fotofase fue de 14 h, y la disminución de la temperatura de 25 a 20 °C en condiciones de fotofase corta acentuó el efecto nocivo de la reducción del largo de la fotofase.

También, la duración de la fotofase y la temperatura tuvieron efectos en la longevidad de los adultos, con una respuesta similar en ambos sexos. Los adultos fueron más longevos cuando se desarrollaron en condiciones de fotofase corta y 20 °C; y por el contrario su vida fue más corta cuando fueron mantenidos en condiciones de fotofase larga a 25 °C.

Panizzi y Smith (1977) en Curitiba, Brasil obtuvieron valores similares de longevidad cuando adultos de *P. guildinii* fueron mantenidos en invernáculo durante verano e invierno. Los autores encontraron que en verano e invierno las hembras vivían 41,2 días y 96,6 días, respectivamente; y los machos 34,0 y 112,5 días, respectivamente. Por el contrario, Cividanes y Parra (1994) en experimentos de laboratorio determinaron que en condiciones de fotoperíodo largo (14 h) la longevidad de los adultos disminuyó cuando la temperatura se redujo de 26 a 20 °C. El análisis conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo, y los reportados por

Panizzi y Smith (1977) y por Cividanes y Parra (1994), sugieren que podría existir interacción entre la respuesta de esta variable con el fotoperíodo y la temperatura.

Los mayores valores de tasa de supervivencia y de longevidad en condiciones de fotofase corta y bajas temperaturas probablemente esté explicada por las menores tasas metabólicas que tienen los insectos en esas condiciones (Tauber *et al.*, 1986); las hembras particularmente realizan menor gasto de reservas en la producción de huevos como consecuencia de una disminución de la actividad reproductiva (Slansky y Panizzi, 1987).

Si bien el porcentaje de hembras que ovipusieron y el período de preoviposición variaron en función de la duración de la fotofase y de la temperatura, la disminución de ésta última en condiciones de fotofase corta tuvo un efecto negativo más marcado que la reducción de las horas de luz a 25 °C. Cividanes y Parra (1994) para hembras de *P. guildinii* criadas en condiciones de fotoperíodo largo a 20 °C, reportaron valores de oviposición similares (24%) a los obtenidos en este trabajo en condiciones de fotoperíodo corto e igual temperatura, y determinaron que el período de preoviposición de las hembras a 20 °C (47 días) en condiciones de fotoperíodo largo (14 h) fue mayor que a 26 °C (13 días). Musolin y Numata (2003a) para *N. viridula* establecieron que a 20 °C los efectos del fotoperíodo fueron mayores en la duración del período de preoviposición. Por su parte, Hodek y Hodková (1993) para *D. baccarum* determinaron que la reducción en el largo de la fotofase y la disminución de la temperatura afectaron de manera negativa la duración del período de preoviposición.

El efecto de la duración de la fotofase y de la temperatura en el número de posturas y de los huevos totales por hembras fue diferente. Mientras que el número de posturas decreció sólo con la reducción en la duración de la fotofase, el número total de huevos por hembra fue menor en la medida que ambos factores disminuyeron. Cividanes y Parra (1994) observaron en condiciones de fotoperíodo largo que la temperatura afectó el número de huevos por hembra de *P. guildinii*, con valores significativamente mayores a 26 °C (310 huevos/hembra) que a 20 °C (28 huevos/hembra).

Respecto al efecto de ambos factores sobre otras especies de pentatómidos, Chocorosqui y Panizzi (2003) reportaron que las hembras de *D. melacanthus* en condiciones de fotoperíodo largo (14:10 y 13:11 h L:O) tuvieron una mayor actividad reproductiva, con mayores valores de porcentaje de oviposición, de número de posturas y de huevos totales por hembra que cuando eran expuestas a fotoperíodo corto (12:12 y 10:14 h L:O). Resultados similares fueron obtenidos por Mourão y Panizzi (2002), cuando estudiaron la biología de *E. heros*, quienes observaron que en condiciones de día corto 10:14 h L:O los huevos que produjeron las hembras no fueron fértiles. Para *D. baccarum*, Hodek y Hodková (1993) determinaron mayor fecundidad cuando las hembras se desarrollaron en condiciones de día largo que en día corto. Sin embargo, Ali y Ewiess (1977) encontraron que los parámetros reproductivos de *N. viridula* fueron similares cuando las hembras fueron expuestas a distintos fotoperíodos (10:14 h L:O and 14:10 h L:O).

La fertilidad de los huevos fue similar en las distintas fotofases cuando la temperatura fue 25 °C, pero hubo disminución significativa cuando la temperatura descendió de 25 a 20 °C en fotofase corta. Cividanes y Parra (1994), determinaron en condiciones de fotoperíodo largo (14 h) que la viabilidad de los huevos de *P. guildinii* fue similar cuando fueron expuestos a 26 y 20 °C. Los resultados de este trabajo y los obtenidos Cividanes y Parra (1994) sugieren que podría existir interacción entre el fotoperíodo y la temperatura en la viabilidad de los huevos.

4.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los factores abióticos, fotoperíodo y temperatura, tuvieron diferentes efectos en las diferentes variables evaluadas de la tabla de vida del insecto. La variación de ambos factores tuvo efectos en el tiempo de incubación de huevos y en la mortalidad total de ninfas. El descenso de la temperatura reforzó el efecto negativo del acortamiento de la fotofase en la supervivencia y la tasa de desarrollo de las ninfas. Con la disminución de ambos factores hubo un aumento en la supervivencia y longevidad de los adultos, y el desempeño reproductivo de las hembras se vio comprometido.

Estos estudios demostraron la importancia y el rol de la temperatura y el fotoperíodo como factores ambientales reguladores del desarrollo y la estacionalidad de *P. guildinii*. En la región geográfica entre 30°-35° de latitud S, este insecto hibernaría como adulto y podría no reproducirse entre la mitad del otoño y la primavera, cuando su huésped preferido, el cultivo de soja, no está disponible, lo cual corresponde aproximadamente a las condiciones evaluadas de 10 h de fotofase y 20 °C.

4.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Mestría]. Porto Alegre: 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.
- Arroyo L, Kamawura N. 2003. Biología y ecología de *Piezodorus guildinii* Westwood en soja. *Artículos de Investigación, Centro Tecnológico Agropecuario en Bolivia* N°2: 3 - 6.
- Beck SD. 1980. *Insect photoperiodism*. New York: Academic Press. 387 p.
- Cividanes FG, Parra JRP. 1994. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. III. *Piezodorus guildinii* (West., 1837) (Heteroptera: Pentatomidae). *Científica* 22(2): 177 - 186.

- 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.
- Cho JR, Minho L, Kim HS, Boo KS. 2008. Effect of photoperiod and temperature on reproductive diapause of *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(2): 53 - 57.
- 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.
- Chocorosqui VR, Panizzi AR. 2002. Influência da temperatura na biologia de ninfas de *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Ciências Agrárias* 23(2): 217 - 220.
- Danks HV. 2007. The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomologist* 139(1): 1 - 44.
- Danks HV. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. Canadá: Biological Survey of Canada (Terrestrial arthropods) Monographs series No 1. 439 p.
- Fraga CP, Ochoa LH. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). IDIA-Suplemento (Revista del INTA información sobre investigación y desarrollo agropecuario) 28: 103 - 117.
- 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, 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.
- Kobayashi S, Numata H. 1995. Effects of temperature and photoperiod on the induction of diapause and the determination of body coloration in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Zoological Science* 12(3): 343 - 348.

- Leather SR, Walters KFA, Bale JS. 1993. The ecology of insect overwintering. Cambridge: Cambridge University Press. 255 p.
- 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 INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2007. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea 108: 153 - 161.
- 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.
- Mourão APM, Panizzi AR. 2000. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera Pentatomidae) no norte do Paraná. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29(2): 205 - 208.
- Musolin DL, Numata H. 2003a. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and color change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. Physiological Entomology 28(2): 65 - 74.
- Musolin DL, Numata H. 2003b. Timing of diapause induction and its life-history consequences in *Nezara viridula*: is it costly to expand the distribution range? Ecological Entomology 28(6): 694 - 703.
- Nakamura K, Numata H. 1998. Alternative life cycles controlled by temperature and photoperiod in the oligophagus bug, *Dybowskyi reticulata*. Physiological Entomology 23(1): 69 - 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.

- Numata H, Yamamoto K. 1990. Feeding on seeds induce diapauses in the cabbage bug, *Eurydema rugosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57(3): 281 - 284.
- Panizzi AR. 1992. Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of Indigofera legumes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 63(3): 221 - 228.
- 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, 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.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Saulich A KH, 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* XVIII: 51 - 57.
- Silva FAC, Panizzi AR. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 52(1): 131 - 134.

- Slansky F Jr., Panizzi AR. 1987. Nutritional ecology of seed-sucking insects. En: Slansky F Jr., Rodriguez JG. (Eds.). Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates. New York: Wiley. 283 - 320.
- Stacey DA, Fellowes DE. 2002. Temperature and the development rates of thrips: evidence for a constraint on local adaptation? *European Journal of Entomology* 99(3): 399 - 404.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. Seasonal adaptations of insects. New York: Oxford University Press. 411 p.
- Trudgill DL, Honek A, Li D, Van Straalen NM. 2005. Thermal time - concepts and utility. *Annals of Applied Biology* 146(1): 1 - 14.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014a. Nymph and adult seasonal occurrence on different plants and morphological and physiological changes of adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Uruguay. *Journal of Pest Science*, aceptado para publicar 29/10/2014, DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2.

* Se utiliza la letra “a” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

5. DETERMINACIÓN DE FORMAS ESTACIONALES EN ADULTOS DE *PIEZODORUS GUILDINII*: CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS

5.1. RESUMEN

El objetivo de estos estudios de laboratorio y campo fue evaluar las variaciones por efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfometría, el color del cuerpo, contenido de lípidos, desarrollo de los órganos reproductivos y en la actividad alimentaria de *Piezodorus guildinii* (Westwood). En el laboratorio fueron evaluadas tres condiciones diferentes (14:10 y 10:14 h L:O a 25 °C, y 10:14 h L:O a 20 °C), a $80 \pm 10\%$ HR. Los adultos en 14hL-25 °C, fueron más grandes y tuvieron menor contenido de lípidos que en 10hL-20 °C. El mayor porcentaje de hembras con banda del pronoto y conectivo claro se registró con 10hL (20 y 25 °C). El fotoperíodo y la temperatura tuvieron efectos en la condición del aparato reproductivo de los adultos. A los 15, 30 y 45 días de edad, en 14hL-25 °C, 0% de las hembras exhibió el ovario inmaduro; por el contrario en 10hL-20 °C, durante ese período el porcentaje de hembras con ovario inmaduro varió entre 60 y 33%. Los testículos tuvieron mayor y menor tamaño, en 14hL-25 °C y en 10hL-20 °C, respectivamente. El porcentaje de machos con saco ectodérmico expandido fue mayor en 14hL-25 °C que en 10hL-20 °C. Los adultos en condiciones de fotofase corta tuvieron menor actividad alimentaria a 10hL-20 °C que a 14hL-25 °C. Durante dos años fueron colectados semanalmente adultos en diferentes especies vegetales, los cuales mostraron diferencias en la morfología y fisiología en las diferentes estaciones del año. En otoño e invierno, los adultos de ambos sexos mostraron los mismos cambios que fueron observados en el laboratorio en 10hL-20 °C. Los resultados obtenidos indican que en esas condiciones los adultos de *P. guildinii* ingresan en diapausa reproductiva, acumulan reservas energéticas (lípidos), tienen estructuras reproductivas inmaduras, cuerpo más pequeño, actividad alimentaria menor y particularmente las hembras mostraron la banda del pronoto y el conectivo con coloración clara.

Palabras clave: *Piezodorus guildinii*, características fenológicas y fisiológicas, actividad alimentaria, fotoperíodo, temperatura.

5.2. ABSTRACT

The effect of photoperiod and temperature on *Piezodorus guildinii* (Westwood) adult body morphometry and color, lipid content, development of reproductive organs, and feeding activity at different ages was studied in the laboratory and in the field. At the laboratory, three different conditions were tested (14:10 and 10:14 h L:D at 25 °C, and 10:14 h L:D at 20 °C), at 80 ± 10% RH. Adults at 14 hL (25 °C) were larger and showed lower lipid content than those reared at 10 hL (20 °C). Highest proportions of females with clear pronotum band and connexivum were recorded at 10 hL (20 and 25 °C). The ovary condition was affected by photoperiod and temperature. At 15, 30 and 45 days of age under 14 h photophase at 25 °C, the proportions of females that exhibited ovary immature remained constant at 0%; in contrast, at 10 hL (20 °C) it declined from 60 to 33%. Testes size was affected by photoperiod and temperature; males at 14 hL (25 °C) and at 10 hL (20 °C) showed the largest and the smallest testes, respectively. The proportion of males with ectodermal sac expanded was greater at a 14 hL (25 °C) than at a 10 hL (20 °C). Adults at 10 hL (20 °C) after 20 days showed less feeding activity than under 14 hL (25 °C). In the field adults were sampled weekly during two years. Adults collected in different seasons showed differences in morphology and physiology. In autumn and winter, both sexes showed the same changes that were recorded in the laboratory under short photophase and 20 °C. The results indicate that under these environment conditions adults of *P. guildinii* enter into reproductive diapause, accumulate energy reserves (lipids), show undeveloped reproductive structures, smaller body, and less feeding activity, and particularly females show clear coloration of the pronotum band and connexivum.

Key Words: *Piezodorus guildinii*, phenological and physiological traits, feeding activity, photoperiod, temperature.

5.3. INTRODUCCIÓN

La habilidad de los insectos para pasar los períodos adversos en estado de dormancia, les permite explotar recursos estacionales fluctuantes y colonizar zonas que de otra manera les sería imposible habitar (Danks, 2003; Košťal, 2006). La diapausa, que es un tipo de dormancia, es un proceso dinámico que se caracteriza por la reducción o detención de las actividades metabólicas, lo que implica cambios morfológicos, fisiológicos, epidérmicos, bioquímicos y de comportamiento (Tauber *et al.*, 1986, Hodek, 2002; Košťal, 2006). Como consecuencia de estos cambios, el metabolismo y la maquinaria bioquímica de los insectos sufren reajustes sustanciales (Danks, 1987).

Los hemípteros fitófagos de la región templada, en general, enfrentan las condiciones ambientales adversas como adultos en diapausa reproductiva (Mansingh, 1971, Saulich y Musolin, 2012). La acumulación de reservas energéticas, el aparato reproductor inmaduro, y cambios en el tamaño, la forma y la coloración del cuerpo, son algunos de los fenómenos más notables que ocurren en pentatómidos durante este período (McPherson, 1974; Ali y Ewiess, 1977; Ito, 1985; Albuquerque 1989, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Nakamura y Numata, 1997; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Musolin y Numata, 2003a; Niva y Takeda, 2003; Musolin, 2012). Si bien la detención de la alimentación es otro de los procesos característicos de la diapausa, en climas con inviernos moderados, algunas especies continúan con la alimentación (Shearer y Jones, 1996; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Saulich y Musolin, 2012).

La duración de la fotofase y la temperatura son los factores abióticos que están asociados a la diapausa (Ali y Ewiess, 1977; Ichimori *et al.*, 1990; Higuchi, 1994; Panizzi y Silva, 2009). Estudios con diferentes especies de pentatómidos que evaluaron el efecto de la duración de la fotofase en la diapausa reproductiva, determinaron que la misma es inducida cuando tiene una duración igual o menor a 12 horas (Ali y Ewiess, 1977; Albuquerque, 1989, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Nakamura y Numata, 1997; Mourão y Panizzi, 2002;

Chocorosqui y Panizzi, 2003; Musolin y Numata, 2003a; Niva y Takeda, 2003). En algunas especies, como *Nezara viridula* (L.), la respuesta a las horas de luz en la inducción de la diapausa es estable en un rango de temperaturas (Musolin y Numata, 2003a); pero en otros casos la temperatura modifica el efecto del largo de la fotofase (Numata *et al.*, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Niva y Takeda, 2003; Saulich y Musolin, 2012). La principal función de la temperatura es indicar el momento óptimo de inducción de la diapausa, mientras que en años cálidos se retrasa, en años fríos ocurre antes; por lo tanto la interacción del fotoperíodo y la temperatura crea un mecanismo de regulación ecológica fiable a la aparición oportuna de este proceso (Saulich y Musolin, 2012).

A nivel internacional, el conocimiento sobre la ecología de *Piezodorus guildinii* (Westwood) es limitado. En este capítulo se presenta la información generada en distintos experimentos que tuvieron como objetivo determinar el efecto del fotoperíodo y de la temperatura en la ocurrencia de formas estacionales y de diapausa en adultos. Para ello fueron realizados ensayos en el laboratorio donde se evaluó como la variación en la duración de la fotofase y en la temperatura provoca cambios en la morfología (cambios en la morfometría y en el color del cuerpo) y en la fisiología (desarrollo de los órganos reproductivos de los machos y las hembras, en el contenido de lípidos, y en la actividad de alimentación) de los adultos; paralelamente se realizaron las mismas evaluaciones morfológicas y fisiológicas en adultos colectados en el campo durante dos años, con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en el laboratorio.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. Rutina de mantenimiento de la cría de insectos

Al inicio del experimento, se colectaron adultos de *P. guildinii* en el campo de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S 34° 20' W 57° 41'). En el laboratorio, los insectos fueron colocados en cajas de plástico transparente (25 × 20 × 20 cm) forradas con papel de filtro y en la tapa del recipiente se colocaron hilos de 30 cm de

largo de lana sintética para la oviposición de las hembras (Silva y Panizzi, 2008). El alimento proporcionado fue vainas verdes de poroto *Phaseolus vulgaris* L., semillas de soja *Glycine max* (L.) Merrill y maní *Arachis hypogaea* L. El alimento fue reemplazado día por medio y diariamente se les proporcionó agua destilada, para lo que se colocó un algodón en un contenedor plástico (1,0 cm Ø). Las condiciones de temperatura y humedad fueron 25 ± 1 °C y $80 \pm 10\%$ RH, con un fotoperíodo de 14:10 h L:O (Tres luces TLD 18W/54-765 dispuestas horizontalmente a 20 cm de distancia de los contenedores). Para mantener la humedad, el papel de filtro fue rociado con agua todos los días.

Los huevos fueron acondicionados en placas de Petri de 9,0 de Ø × 1,5 cm, cubiertas con papel de filtro humedecido y fueron colocados en cámaras de crecimiento con las condiciones de fotoperíodo y temperatura de cada tratamiento. La humedad relativa fue mantenida constante a $80 \pm 10\%$. Las cámaras fueron monitoreadas diariamente utilizando registradores HOBO ®, modelo U23-001 (Onset Computer, Pocasset, Massachusetts). Durante el primer estadio, las ninfas sólo recibieron agua destilada. En el primer día del segundo estadio, grupos de 10 ninfas fueron colocados en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) que en el fondo contenían papel de filtro humedecido. La metodología de mantenimiento de las ninfas (alimento y agua) fue la misma que la descrita en la rutina de mantenimiento de la cría de insectos.

5.4.2. Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfología y fisiología de adultos

Para evaluar el efecto del fotoperíodo y la temperatura en la determinación de formas estacionales, en el contenido de lípidos, en el desarrollo del aparato reproductor y en la actividad alimentaria, fueron evaluadas tres condiciones diferentes (tratamientos): 14:10 y 10:14 h L:O a 25 ± 1 °C, y 10:14 h L:O a 20 ± 1 °C. Cada cámara de cría constó de cuatro luces tipo Day light TLT 20W/54 RS colocadas verticalmente en la puerta de la incubadora. El fotoperíodo de 14:10 h L:O y 25 °C representó aproximadamente las condiciones del solsticio de verano,

mientras que el fotoperíodo de 10:14 h L:O y 20 °C simuló las condiciones del otoño en un rango de latitud entre 30° y 35° S.

5.4.2.1. Cambios morfológicos y fisiológicos

Cuando emergieron los adultos en cada tratamiento, fueron formadas parejas. Cada una de ellas fue acondicionada en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 × 11,0 × 3,5 cm) con el fondo forrado con papel de filtro humedecido. El alimento y el agua fueron proporcionados de la manera descrita anteriormente. A los 1, 15, 30 y 45 días de emergidos los adultos, aproximadamente 30 parejas de cada tratamiento fueron muertas por congelamiento en el freezer.

De cada integrante de las parejas, previamente identificado, se obtuvo una foto digital a los efectos de realizar la evaluación morfométrica con el software Image Pro-Express 5.1. Las variables consideradas fueron: el largo desde el ápice de las yugas hasta el final de los hemielitros, el ancho en la región del pronoto, y el borde lateral del pronoto (Silva y Panizzi, 2010). También se evaluó el color del cuerpo de los adultos. Mientras que en los machos no mostraron cambios notorios en la coloración del cuerpo, las hembras pudieron ser caracterizadas por el color de la banda del pronoto y del conectivo (Zerbino et al., 2014b). El color de la banda del pronoto varió entre crema y púrpura. Las hembras fueron tipificadas como claras cuando el color fue crema o anaranjado, y oscuras cuando tuvieron la banda del pronoto de color rosa o púrpura (Figura 5.1). El conectivo también tuvo diferentes coloraciones que variaron entre el blanco y el púrpura. Las hembras fueron caracterizadas como claras cuando el conectivo fue de color blanco o blanco y rosa, y como oscuras cuando fue rosa, rosa y negro, o púrpura (Figura 5.1).

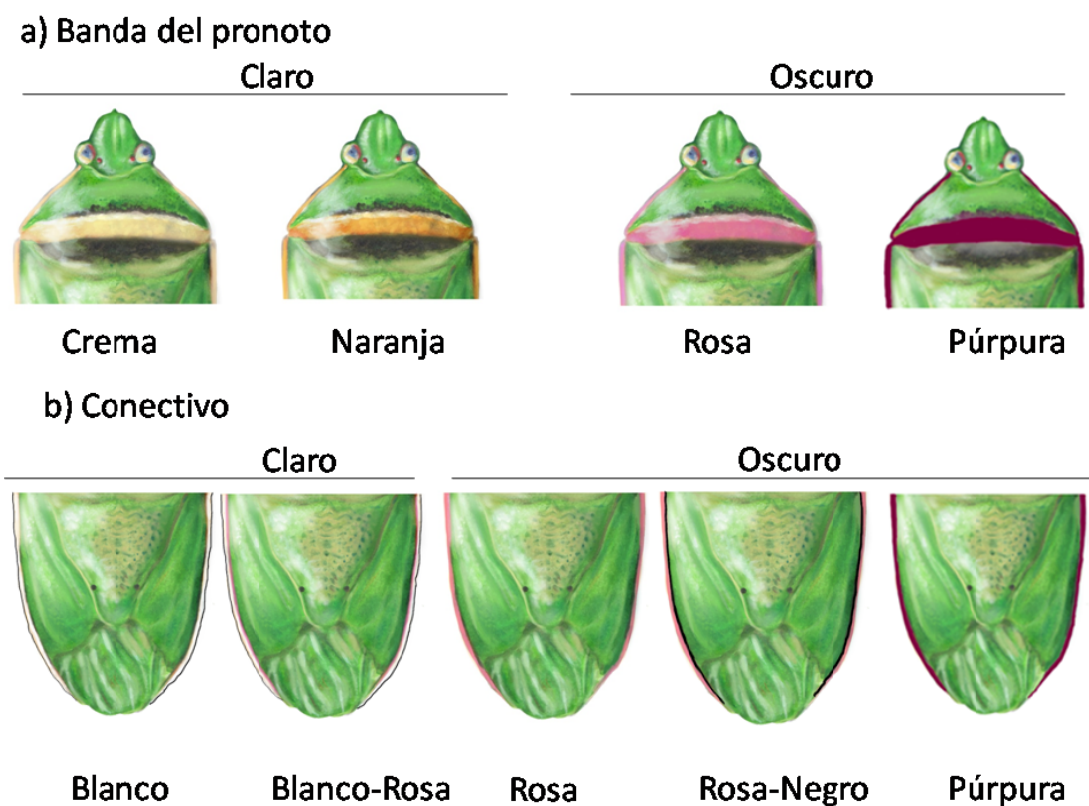


Figura 5.1. Tipificación de las hembras de *Piezodoros guildinii* de acuerdo al color de a) banda del pronoto y b) conectivo.

Posteriormente, las parejas de adultos de cada tratamiento y edad fueron divididas en dos grupos. En uno de ellos se realizó la determinación del contenido de lípidos de acuerdo a la metodología descrita por Panizzi y Hirose (1995), para lo cual se utilizó el extractor Twisselman. Los insectos identificados por sexo, tratamiento y edad, fueron llevados a estufa a 60 °C durante 48 horas a fin de determinar el peso seco (PS) con una balanza electrónica (Scientech SA 210) (con 0,01 mg). Luego fueron acondicionados en forma individual en una bolsa de tejido de 3,0 cm x 4,0 cm, con la debida identificación (sexo, tratamiento, edad) y colocados en tubos de celulosa de 7,5 × 3,0 cm, a razón de seis individuos por tubo, los cuales recibieron el reflujó del extractor químico. Se utilizó éter de petróleo como extractor químico, el

cual fue colocado en un matraz a razón de 250 ml. El equipo recibió calor hasta que el extractor químico alcanzó 120 °C. El tiempo de extracción considerado fue de dos horas. Al finalizar este período, los insectos fueron llevados a estufa (60 °C) por un período de 15 horas, para posteriormente determinar el peso sin lípidos (PM). El porcentaje de lípidos totales de cada insecto se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos en peso seco} = [(PS-PM)/PS] \times 100$$

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

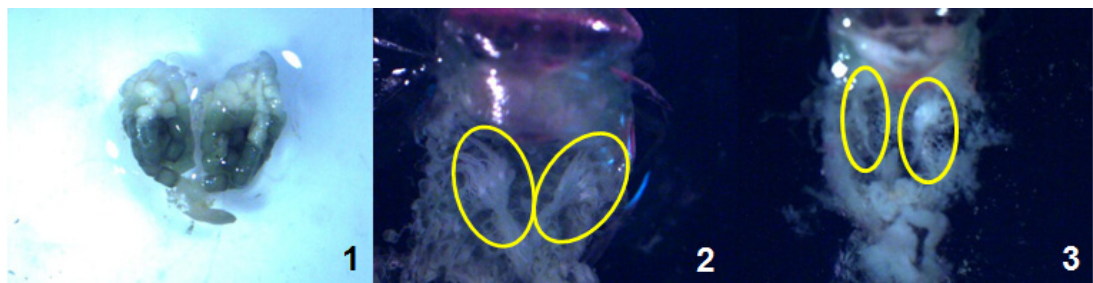


Figura 5.2. Tipificación del estado de desarrollo del ovario de hembras de *Piezodorus guildinii* 1) desarrollado, 2) intermedio, y 3) inmaduro.

De acuerdo al estado de desarrollo de los ovarios las hembras fueron clasificadas en tres categorías (Mourão y Panizzi, 2002): 1) ovario desarrollado con huevos, 2) ovario desarrollado sin huevos, y 3) ovario atrofiado (Figura 5.2). En los machos se evaluó la condición del saco ectodérmico (colapsado o expandido) de acuerdo con Esquivel (2009). También, fue extraído uno de los testículos de la

cavidad abdominal, se obtuvo una foto digital y se realizó la medición de su largo con el software Image Pro-Express 5.1 (Figura 5.3).

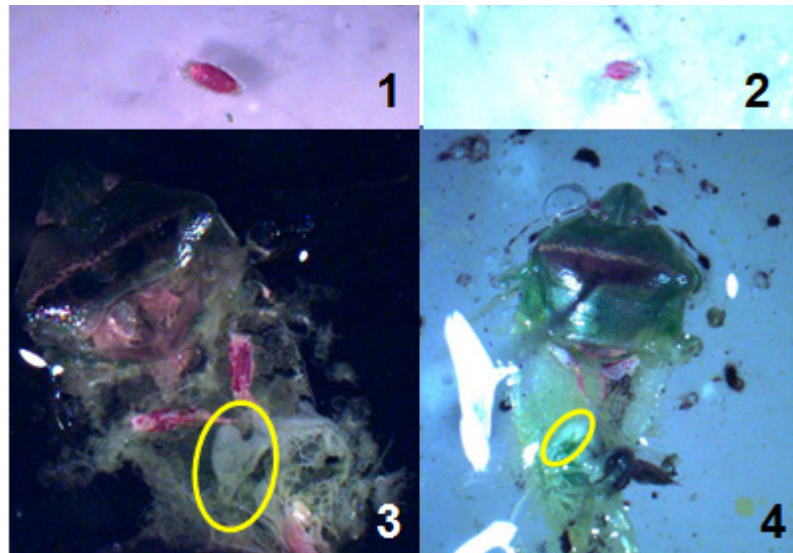


Figura 5.3. Tipificación del estado de aparato reproductor masculino de *Piezodorus guildinii*, testículos desarrollado (1) e inmaduro (2), y saco ectodérmico expandido (3) y colapsado (4).

Los machos fueron clasificados en inmaduros o desarrollados de acuerdo al tamaño del testículo. Se consideraron desarrollados cuando el tamaño del testículo se encontraba dentro del rango de la media mayor \pm un error estándar de la media mayor, e inmaduros cuando los valores se encontraban dentro del rango de la media menor \pm un error estándar de la media menor.

5.4.2.2. Actividad alimentaria

En la evaluación de la actividad alimentaria fueron considerados más de 50 adultos de cada tratamiento. En el momento de la emergencia fueron acondicionados en forma individual en cajas plásticas de poliestireno cristal (11,0 \times 11,0 \times 3,5 cm) con el fondo forrado con papel de filtro humedecido. Los insectos fueron alimentados con vainas verdes de poroto, semillas de soja y maní. El alimento y el

agua fueron proporcionados de la misma manera que en la cría. La evaluación de la actividad alimentaria fue realizada cada 10 días, desde el décimo día y hasta los 40 días de emergidos los adultos. Previo a cada evaluación, los adultos permanecieron en ayuno durante dos días donde sólo recibieron agua. Finalizado este período, los insectos recibieron una chaucha de soja inmadura (R 5.5) durante un período de 24 horas. Posteriormente, y hasta el ayuno precedente de la siguiente evaluación, volvieron a recibir el alimento basado en vainas verdes de poroto, semillas maduras de soja y maní. Cada insecto fue considerado una réplica. La actividad alimentaria fue evaluada mediante el registro del número de vainas alimentares que atravesaron la pared de la chaucha de soja (Bowling, 1980). Al finalizar cada evaluación, las chauchas fueron individualmente sumergidas en una solución de fucsina ácida (1g de fucsina + 2 ml de alcohol absoluto + 300 ml de agua), durante 30 minutos. Luego se las enjuagó con agua a los efectos de eliminar los excesos del colorante, y cada chaucha se abrió y se observó en el microscopio estereoscópico.

5.4.3. Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos en adultos colectados en el campo

Cuando se realizó el estudio de estacionalidad (Capítulo 2), los adultos colectados durante los dos años en cada muestreo fueron llevados al laboratorio donde fueron muertos por congelamiento. Posteriormente fueron sexados, y con cada insecto se procedió a realizar la evaluación morfológica (morfometría y cambio de color de las hembras) y fisiológica (% de lípidos y desarrollo del aparato reproductor) con la misma metodología descrita en el ensayo de laboratorio (ítem 5.2.1.2). La categorización de los machos en inmaduros y maduros de acuerdo al tamaño del testículo, fue realizada considerando los valores determinados previamente en el ensayo de laboratorio.

5.4.4. Análisis de datos

5.4.4.1. Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfología y fisiología de

adultos

Cada experimento fue repetido dos veces, y las cámaras de cría fueron reasignadas por sorteo. El diseño experimental fue factorial con parcelas divididas en bloques al azar, con diferente número de submuestras por tratamiento. La parcela mayor fueron los tratamientos, y las pequeñas fueron las ocho combinaciones dadas por el sexo y la edad. Las variables morfométricas (largo del cuerpo, ancho del pronoto, y largo del margen lateral del pronoto), el contenido de lípidos, y el tamaño de los testículos fueron analizados con modelos lineales generales mixtos (PROC MIXED, SAS Institute, versión 9.2). Las medias fueron comparadas por contrastes ($Pr > |t| < 0,05$).

El porcentaje de hembras que presentaron la banda y el conectivo claro u oscuro fueron analizadas mediante modelos lineales generalizados con distribución binomial (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). El modelo consideró los efectos del tratamiento, de la edad y la interacción tratamiento con edad. Las proporciones de las hembras con diferente estado de desarrollo del ovario fueron analizadas mediante un modelo lineal generalizado (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Los datos correspondientes a 1 día de edad fueron analizados mediante la distribución binomial y la función logit, porque en esta edad sólo se registraron los estados intermedio e inmaduro, mientras que los datos obtenidos a los 15, 30, y 45 días de edad se analizaron utilizando distribución multinomial y la función cumlogit. Cada edad se analizó individualmente. El porcentaje de machos con diferente estado de desarrollo de los testículos y la condición del saco ectodérmico se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado con distribución binomial y la función logit (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Cada edad se analizó individualmente.

Los datos de actividad de alimentaria se analizaron con modelos lineales generalizados mixtos con distribución de Poisson y la función logarítmica (PROC GLIMMIX, SAS Institute, versión 9.2). El número de vainas medido a los 10 días de emergidos los adultos fue la co-variable y las subsiguientes evaluaciones realizadas a los 20, 30 y 40 días fueron consideradas como medidas repetidas en el tiempo. La

estructura de covarianza que ajustó fue AR (1). Para la prueba de heterogeneidad de las pendientes, el modelo incluyó el término de interacción edad*tratamiento. Las medias de los tratamientos fueron comparadas por contrastes ($Pr > |t| < 0,05$).

5.4.4.2. Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos en adultos colectados en el campo

En cada año de muestreo, se calculó para cada mes la media de los datos morfométricos (largo del cuerpo, ancho del pronoto, y largo del margen lateral del pronoto), el contenido de lípidos, y el largo del testículo. Todas estas variables continuas cumplieron con los principios de normalidad, homogeneidad e independencia, por lo que fueron analizadas con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2). El modelo utilizado consideró al mes y el año como efectos fijos; en el caso de las variables morfométricas y de los lípidos también se tuvo en cuenta el efecto del sexo y la interacción mes*sexo. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey-Kramer honestly significant (HSD) con una probabilidad de $P \leq 0,05$.

Las variables expresadas como porcentaje fueron analizadas utilizando modelos lineales generalizados (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.2). Para el color de la banda del pronoto y del conectivo de las hembras, y la condición de desarrollo del saco ectodérmico y de los testículos de los machos se consideró la distribución binomial y la función logit. El porcentaje de hembras con distintos estados de desarrollo del ovario fue analizado utilizando la distribución multinomial con la función cumlogit. En todos los casos, el modelo consideró al mes y al año como efecto fijo. Los resultados son presentados como la máxima verosimilitud de la distribución Chi cuadrado.

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfología y fisiología de adultos

5.5.1.1. Tamaño y coloración del cuerpo

Los análisis estadísticos de las variables morfométricas indican que hubo efecto estadísticamente significativo de los tratamientos (fotofase/temperatura) en el largo del cuerpo ($F_{2,2} = 61,7 P = 0,01$), el ancho del pronoto ($F_{2,2} = 44,2 P = 0,02$), y del borde lateral del pronoto ($F_{2,2} = 29,1 P = 0,03$). Ambos sexos fueron estadísticamente diferentes en las variables morfométricas (largo del cuerpo: $F_{1,683} = 394,7 P < 0,0001$; ancho del pronoto: $F_{1,684} = 314,1 P < 0,0001$; margen lateral del pronoto: $F_{1,684} = 156,9 P < 0,0001$); mientras que el efecto de los tratamientos fue semejante en ambos sexos (interacción tratamiento*sexo largo del cuerpo: $F_{2,683} = 1,5 P = 0,21$; ancho del pronoto: $F_{2,684} = 2,63 P = 0,07$; margen lateral del pronoto: $F_{2,684} = 1,4 P = 0,26$). En las tres variables morfométricas, hubo efecto significativo de la edad (largo del cuerpo: $F_{3,683} = 21,9 P < 0,0001$; ancho del pronoto: $F_{3,684} = 13,2 P < 0,0001$; margen lateral del pronoto: $F_{3,684} = 12,6 P < 0,0001$). Este resultado no era esperado y biológicamente no tiene explicación, dado que los insectos adultos no crecen, y su tamaño está determinado por el tamaño alcanzado en el último estadio de ninfa. Estas diferencias probablemente estén dadas por la asignación de los grupos. Sin embargo, el efecto de los tratamientos fue similar en todas las edades consideradas (interacciones tratamiento*edad largo del cuerpo: $F_{6,683} = 1,5 P = 0,18$; ancho del pronoto: $F_{6,684} = 1,4 P = 0,22$; borde lateral del pronoto: $F_{6,683} = 0,9 P = 0,51$). En las tres variables, la interacción tratamiento*edad*sexo no fue significativa (largo del cuerpo: $F_{6,683} = 0,5 P = 0,80$; ancho del pronoto: $F_{6,684} = 0,5 P = 0,84$; margen lateral del pronoto: $F_{6,684} = 0,4 P = 0,86$).

Cuadro 5.1. Tamaño medio de los adultos (\pm EEM) (mm) de *Piezodorus guildinii* en diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura en el laboratorio.

Condiciones	Largo del cuerpo	Ancho pronoto	Largo lateral borde pronoto	Testículos
10 h - 20 °C	9,54 \pm 0,03 b	5,03 \pm 0,01 b	1,96 \pm 0,01 b	1,41 \pm 0,02 c
10 h - 25 °C	9,50 \pm 0,02 b	5,01 \pm 0,01 b	1,96 \pm 0,01 b	1,50 \pm 0,02 b
14 h - 25 °C	9,80 \pm 0,03 a	5,18 \pm 0,01 a	2,05 \pm 0,01 a	1,74 \pm 0,02 a
Hembras	9,89 \pm 0,02 A	5,20 \pm 0,01A	2,04 \pm 0,01 A	
Machos	9,36 \pm 0,02 B	4,95 \pm 0,01B	1,94 \pm 0,01 B	

¹ Medias seguidas por la misma letra minúscula y mayúscula en cada columna no difieren significativamente ($Pr > |t| < 0,05$).

En todas las variables morfométricas el mayor valor se registró en condiciones de 14hL-25 °C. El tamaño del cuerpo de los adultos de esta especie estuvo controlado solamente por el largo de la fotofase, y la temperatura, al menos en condiciones de fotofase corta, no tuvo efectos en el tamaño del cuerpo (Cuadro 5.1).

El porcentaje de hembras con banda del pronoto y conectivo claro varió con los tratamientos de manera diferencial según la edad (interacción tratamiento*edad banda del pronoto $\chi^2 = 27,0$ gl = 6 $P < 0,0001$; conectivo $\chi^2 = 35,4$ gl = 6 $P < 0,0001$). En ambas características, en todas las edades, el porcentaje de hembras que tuvieron el tipo claro fue significativamente mayor en condiciones de fotofase corta (10hL-20 °C) que en fotofase larga (14hL-25 °C) (Figura 5.4 A y B). A partir de los 15 días de la emergencia de las hembras, los porcentajes correspondientes a los tratamientos de fotofase corta (10 h) y diferentes temperaturas (25 °C y 20 °C) fueron similares entre sí (Figura 5.4 A y B). En las distintas fotofases a 25 °C los porcentajes de hembras con banda del pronoto y conectivo claro fueron similares en todas las edades. Por el contrario, en 10hL-20 °C, en las dos características, hubo una disminución significativa en los valores, que en la banda del pronoto se registró entre el día 1 y 15 de edad y luego se mantuvo constante (Figura 5.4 A), mientras que en el

conectivo la declinación del porcentaje fue gradual y se pudo registrar hasta los 45 días (Figura 5.4 B).

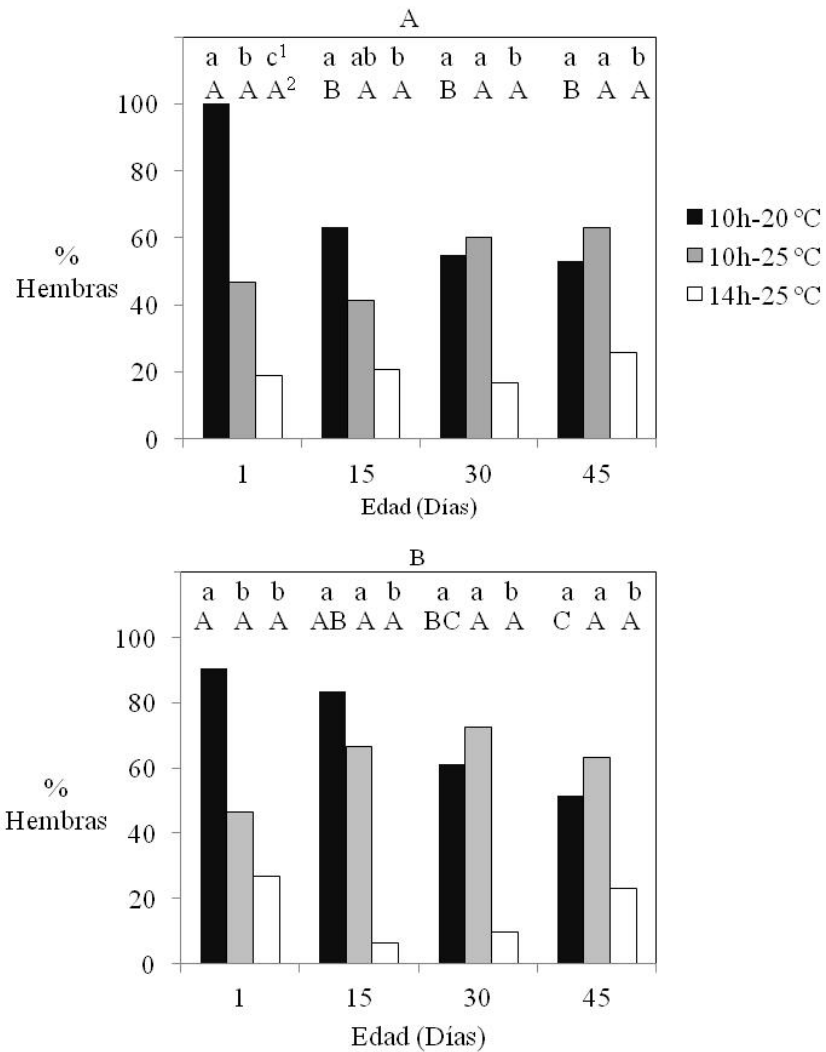


Figura 5.4. Porcentaje de hembras adultas (%) de *Piezodorus guildinii* en distintas edades con la banda del pronoto (A) y el conectivo (B) tipo claro, para las diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura de laboratorio. ^{1,2}Valores seguidos por la misma letra minúscula dentro de cada edad y por la misma letra mayúscula para un mismo tratamiento en las diferentes edades no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

5.5.1.2. Contenido de lípidos

El análisis estadístico para el contenido de lípidos en el cuerpo de los adultos, expresado como porcentaje de peso seco, indica que el tratamiento ($F_{2,2} = 3,4 P = 0,23$), el sexo ($F_{1,355} = 2,8 P = 0,09$), y la interacción sexo*edad ($F_{3,355} = 0,2 P = 0,87$) no tuvieron efectos estadísticamente significativos. Por su parte, las condiciones de fotofase y temperatura impuestas, tuvieron efectos diferenciales en las distintas edades (interacción tratamiento*edad $F_{6,355} = 2,3 P = 0,03$).

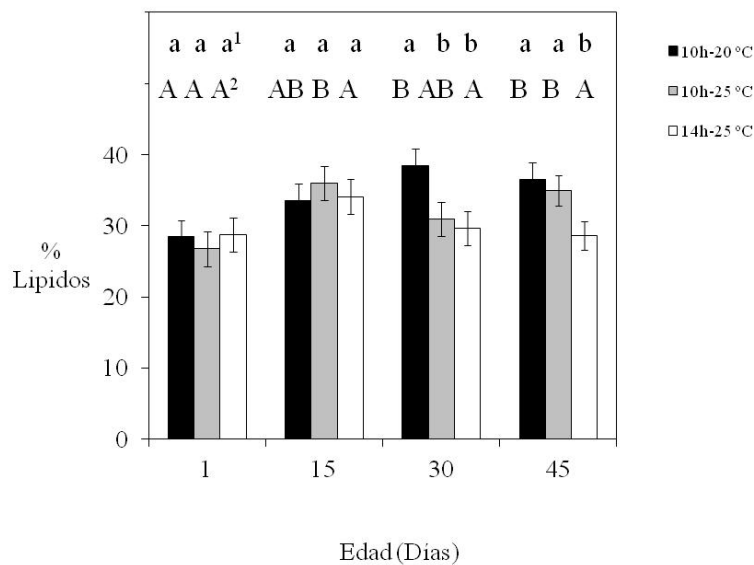


Figura 5.5. Contenido medio (\pm EEM) de lípidos en el cuerpo (%) de adultos de *Piezodorus guildinii* en distinta edades para las diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura de laboratorio. ^{1,2}Valores seguidos por la misma letra minúscula dentro de cada edad y por la misma letra mayúscula para un mismo tratamiento en las diferentes edades no difieren significativamente ($Pr > |t| < 0,05$).

El contenido de lípidos de los adultos con 1 y 15 días de edad fue similar en todos los tratamientos. A los 30 y 45 días de edad los adultos que se desarrollaron en 10hL-20 °C registraron un porcentaje de lípidos significativamente superior que los

mantenidos en 14hL-25 °C. Respecto al efecto de la temperatura en fotofase corta, se destaca que los adultos a los 30 y 45 días de edad tuvieron un contenido de lípidos diferente y similar, respectivamente (Figura 5.5).

5.5.1.3. Desarrollo de los órganos del aparato reproductor

El fotoperíodo, la temperatura y la edad tuvieron efectos en el desarrollo de los ovarios. En las hembras recién emergidas (1 día), los porcentajes de los distintos estados de desarrollo del ovario registrados en cada condición evaluada, fueron similares en los tres tratamientos ($\chi^2 = 5,3$ gl = 2 $P = 0,07$). En ese momento ninguna hembra registró el ovario desarrollado (Figura 5.6).

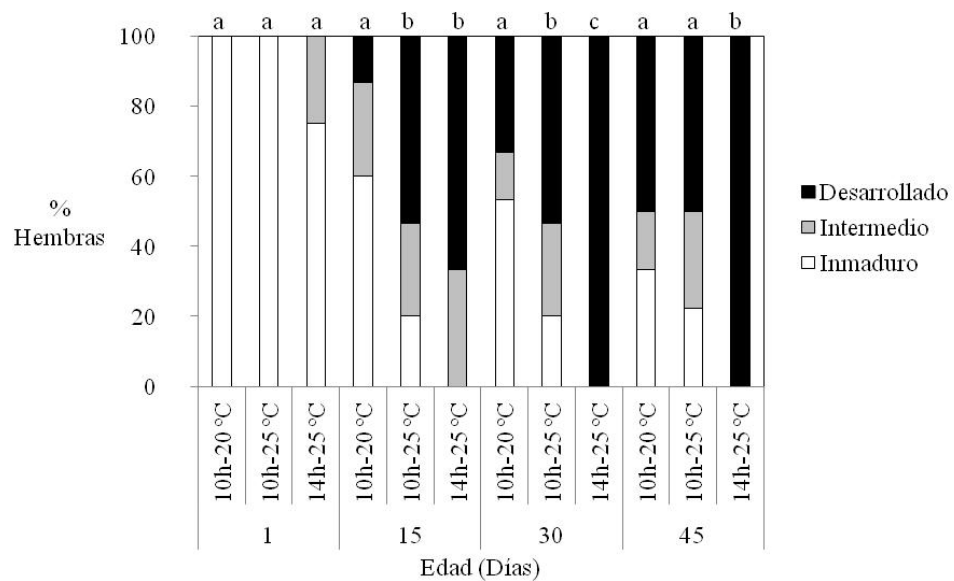


Figura 5.6. Porcentaje de hembras adultas de *Piezodorus guildinii* con diferente grado de desarrollo de los ovarios en distintas edades, para las diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura de laboratorio. Valores seguidos por la misma letra en cada edad no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

A los 15, 30 y 45 días de edad hubo efecto estadísticamente significativo de los tratamientos (15 días $\chi^2 = 24,6$; 30 días $\chi^2 = 42,4$; 45 días $\chi^2 = 33,9$; gl = 2 $P <$

0,0001). Cuando las hembras tuvieron 15 días de emergidas, los valores registrados en las dos fotofases (14 h y 10 h) a 25 °C fueron similares entre sí y diferentes de los obtenidos con 10hL-20 °C (Figura 5.6). En el día 30, los tres tratamientos fueron diferentes entre sí, mientras que en el día 45, los porcentajes registrados a 14 h de luz y 25 °C fueron diferentes de los obtenidos en 10 h de luz en las dos temperaturas (20 y 25 °C), los cuales fueron similares entre sí.

Entre los 15 y 45 días de la emergencia, en las condiciones de 14 y 10 h de luz y 25 °C, el porcentaje de hembras que tenía el ovario inmaduro se mantuvo estable en 0 y 20%, respectivamente. Por el contrario, en 10 hL-20 °C, este porcentaje disminuyó de 60 a 33% (Figura 5.6).

El tamaño de los testículos varió significativamente en función de las variaciones de la fotofase y de la temperatura (tratamiento $F_{2,2} = 93,3$ $P = 0,01$) y de la edad ($F_{3,202} = 22,8$ $P < 0,0001$). La variaciones causada por los tratamientos fueron en todas las edades (interacción tratamiento*edad $F_{6,202} = 1,9$ $P = 0,08$). La disminución de la fotofase y de la temperatura redujo su tamaño, y los tres tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 5.1). El tamaño de los testículo de los machos con un día de edad fue más pequeño ($1,38 \pm 0,02$ mm) que el de aquellos con 15 ($1,55 \pm 0,02$ mm), 30 ($1,57 \pm 0,02$ mm) y 45 días de emergidos ($1,60 \pm 0,02$ mm), los cuales fueron similares entre sí.

A partir de los resultados obtenidos, se consideró que los machos que tenían testículos con tamaño entre 1,21 y 1,54 mm tenían su aparato reproductor inmaduro, y lo tenían desarrollado aquellos con valores iguales o mayores a 1,55 mm. El análisis de los datos del estado de desarrollo del aparato reproductor de los machos (de acuerdo al tamaño del testículo) indica que hubo efecto significativo de los tratamientos en las cuatro edades consideradas (día 1 $\chi^2 = 9,7$ $gl = 2$ $P = 0,008$; día 15 $\chi^2 = 25,6$ $gl = 2$ $P < 0,0001$; día 30 $\chi^2 = 11,4$ $gl = 2$ $P = 0,003$; día 45 $\chi^2 = 13,9$ $gl = 2$ $P = 0,001$). En todas las edades, el porcentaje de machos con testículos desarrollados fue significativamente mayor en condiciones de 14hL-25 °C que en 10hL-20 °C (Figura 5.7 A). Las diferencias entre los tratamientos de fotoperíodo corto y diferentes temperaturas no fueron claras.

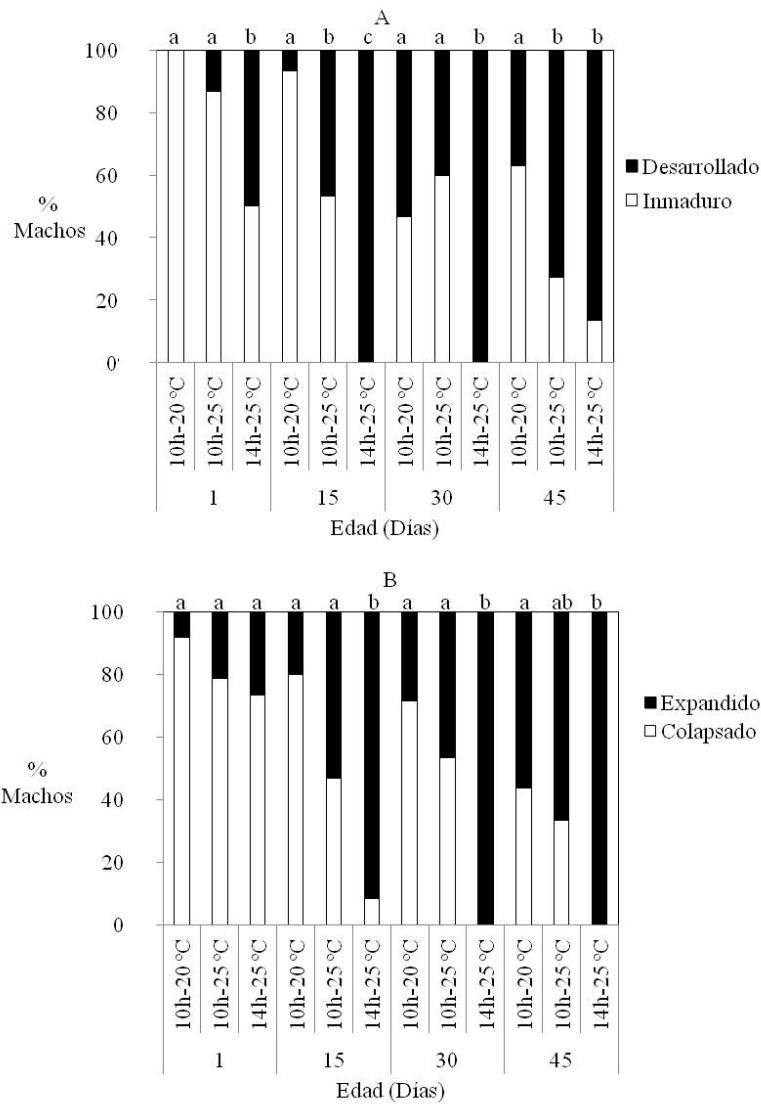


Figura 5.7. Porcentaje de machos adultos de *Piezodorus guildinii* con diferente grado de desarrollo de los testículos (A) y del saco ectodérmico (B) en distintas edades, para las diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura de laboratorio. Valores seguidos por la misma letra en cada edad no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

El análisis de la condición del saco ectodérmico indican que al día de emergidos, en los tres tratamientos los machos tenían una condición similar ($\chi^2 = 1,6$

gl = 2 $P = 0,44$). A los 15, 30 y 45 días de edad hubo efecto de las condiciones de fotofase y temperatura evaluadas (día 15 $\chi^2 = 16,6$ gl = 2 $P = 0,0002$; día 30 $\chi^2 = 14,3$ gl = 2 $P = 0,001$; día 45 $\chi^2 = 6,4$ gl = 2 $P = 0,04$). En estas edades, el porcentaje de machos con el saco ectodérmico expandido fue significativamente mayor en 14 hL-25 °C que en 10 hL-20 °C (Figura 5.7 B).

5.5.1.4. Actividad alimentaria

El número de vainas alimentarias presentes en las chauchas de soja varió con los tratamientos de manera diferencial en las diferentes edades (interacción tratamiento*edad $F_{3,478} = 11,9$ $P < 0,0001$). Si bien hubo diferencias entre los sexos ($F_{1,222} = 23,4$ $P < 0,0001$), el efecto de los tratamientos fue similar en ambos casos (interacción tratamiento*sexo $F_{2,222} = 2,5$ $P = 0,09$). Para los machos se registró un mayor número de sitios de alimentación que para las hembras (2,60 vs. 1,47 vainas alimentarias/adulto/día).

Cuadro 5.2. Actividad alimentaria de los adultos de *Piezodorus guildinii* durante 24 horas en diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura en el laboratorio.

Condiciones	Número de vainas alimentarias/adulto/día ¹	
	Pendiente LN(x)	(Media ± EEM)
10 h - 20 °C	-0,044 a	1,43 ± 0,18 b
10 h - 25 °C	-0,035 a	1,90 ± 0,20 b
14 h - 25 °C	-0,011 b	2,77 ± 0,25 a

¹ Medias seguidas por la misma letra en cada columna no difieren significativamente ($Pr > |t| < 0,05$).

La actividad alimentaria sólo estuvo controlada por el fotoperíodo. Los adultos mantenidos en condiciones de fotofase larga (14hL-25°C), depositaron en todas las edades un número similar de vainas alimentarias (pendiente $\neq 0$ $Pr > |t| = 0,14$). Por el contrario, cuando se desarrollaron en condiciones de fotofase corta y diferente temperatura (25 y 20 °C), a medida que los adultos envejecieron se registró una reducción significativa en el número de vainas alimentarias, la cual fue similar en ambos tratamientos (pendiente $\neq 0$ $Pr > |t| = <0,0001$; ambos tratamientos) (Cuadro 5.2). Durante el período de evaluación, el número medio de vainas alimentarias producidas por los adultos en condiciones de fotofase larga a 25 °C fue significativamente mayor que en los tratamientos con 10 h de luz y diferentes temperaturas (20 y 25 °C), los cuales fueron similares entre sí (Cuadro 5.2).

5.5.2. Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos de adultos colectados en el campo

5.5.2.1. Tamaño y coloración del cuerpo

Las tres variables morfométricas variaron significativamente en función de los meses (largo del cuerpo $F_{11,23} = 8,4$ $P < 0,0001$; ancho de pronoto $F_{11,23} = 4,5$ $P = 0,0012$; largo del margen lateral del pronoto $F_{11,23} = 5,4$ $P = 0,0003$) y del sexo (largo del cuerpo $F_{1,23} = 64,0$ $P < 0,0001$; ancho de pronoto $F_{1,23} = 24,0$ $P < 0,0001$; largo del margen lateral del pronoto $F_{1,23} = 16,1$ $P = 0,0005$). En los dos años los resultados obtenidos fueron semejantes (largo del cuerpo $F_{1,23} = 0,05$ $P = 0,85$; ancho de pronoto $F_{1,23} = 0,3$ $P = 0,59$; largo del margen lateral del pronoto $F_{1,23} = 0,00$ $P = 0,98$). Los cambios registrados en ambos sexos en los distintos meses (interacción mes*sexo) fueron similares (largo del cuerpo $F_{11,23} = 1,3$ $P = 0,30$; ancho de pronoto $F_{11,23} = 0,7$ $P = 0,73$; largo del margen lateral del pronoto $F_{11,23} = 0,6$ $P = 0,81$).

En el Cuadro 5.3 se presentan los valores medios (\pm EEM) de las tres variables morfométricas. Los adultos colectados en febrero tuvieron un largo del cuerpo significativamente más grande que los interceptados en otoño (entre abril y junio), en

invierno (entre julio y setiembre) y en dos meses de la primavera (octubre y noviembre). Los adultos recolectados al final de la primavera (diciembre) tuvieron un largo del cuerpo intermedio entre esos grupos. Los valores del ancho del pronoto y del largo del margen lateral de los adultos colectados en febrero fueron mayores que los de los adultos capturados en los meses de mayo-junio, y mayo-julio, respectivamente.

Cuadro 5.3. Horas de luz (promedio mensual), tamaño del cuerpo y de testículos (mm) de los adultos de *Piezodorus guildinii* colectados en el Departamento de Colonia en diferentes meses del año ($X \pm EEM$). (Años 2011-2013)

Mes	Horas de luz (h) ²	Largo del cuerpo (mm)	Ancho del pronoto (mm)	Margen lateral del pronoto (mm)	Largo del testículo (mm)
Octubre	12,98	10,23 ± 0,14 cd	5,30 ± 0,07 abc	2,10 ± 0,02 abcd	1,68 ± 0,03 ab
Noviembre	13,94	10,28 ± 0,12 bcd	5,30 ± 0,04 abc	2,10 ± 0,02 abcd	1,76 ± 0,00 a
Diciembre	14,43	10,35 ± 0,19 abcd	5,39 ± 0,08 ab	2,16 ± 0,04 abc	1,77 ± 0,06 a
Enero	14,16	10,69 ± 0,19 ab	5,50 ± 0,10 ab	2,21 ± 0,05 ab	1,81 ± 0,05 a
Febrero	13,32	10,74 ± 0,19 a	5,55 ± 0,08 a	2,24 ± 0,04 a	1,82 ± 0,04 a
Marzo	12,28	10,54 ± 0,16 abc	5,49 ± 0,06 ab	2,19 ± 0,04 ab	1,77 ± 0,07 a
Abril	11,20	10,27 ± 0,12 bcd	5,35 ± 0,05 abc	2,11 ± 0,02 abcd	1,58 ± 0,06 bc
Mayo	10,31	10,03 ± 0,08 d	5,19 ± 0,04 bc	2,02 ± 0,02 cd	1,49 ± 0,03 dc
Junio	9,87	9,96 ± 0,14 d	5,01 ± 0,18 c	1,99 ± 0,04 d	1,35 ± 0,04 d
Julio	10,09	10,30 ± 0,12 bcd	5,33 ± 0,07 abc	2,05 ± 0,03 bcd	1,39 ± 0,00 d
Agosto	10,87	10,11 ± 0,07 d	5,32 ± 0,04 abc	2,09 ± 0,01 abcd	1,41 ± 0,05 d
Setiembre	11,90	10,27 ± 0,09 bcd	5,33 ± 0,08 abc	2,11 ± 0,06 abcd	1,46 ± 0,21 dc

Cuadro 5.3. (cont.)

Sexo	Largo del cuerpo (mm)	Ancho del pronoto (mm)	Margen lateral del pronoto (mm)
Hembras	10,51 ± 0,07 A	5,44 ± 0,03 A	2,15 ± 0,02 A
Machos	10,12 ± 0,04 B	5,24 ± 0,04 B	2,08 ± 0,01 B

¹ Medias seguidas por la misma letra minúscula y mayúscula no difieren significativamente para la prueba de Tukey's HSD ($P \leq 0,05$).

² Valores medios para latitud S 34° 20' y longitud W 57° 41' (Fuente: USNO, 2012).

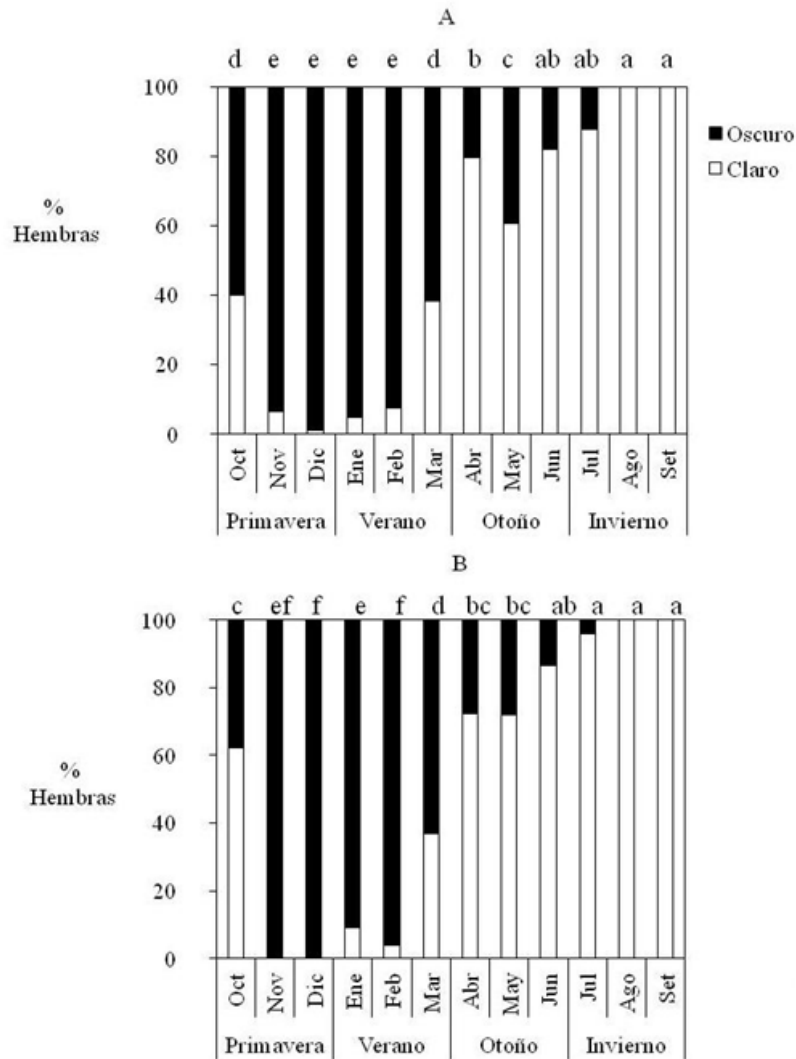


Figura 5.8. Porcentaje de hembras adultas (%) de *Piezodorus guildinii* con diferente coloración de la banda del pronoto (A) y del conectivo (B), en los distintos meses del año. (Años 2011-2013). Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

El color de la banda del pronoto varió significativamente de acuerdo al mes de colecta ($\chi^2 = 528,8$ gl = 11 $P < 0,0001$). Los resultados de ambos años fueron semejantes ($\chi^2 = 0,55$ gl = 1 $P = 0,47$). Desde el final del otoño y durante el invierno, entre junio y setiembre, la mayoría de las hembras tuvieron la banda del pronoto clara ($> 80\%$), mientras que desde la mitad de la primavera hasta la mitad del verano

(noviembre a febrero) un alto porcentaje de las hembras mostraron la banda del pronoto oscura (> 90%) (Figura 5.8 A). El porcentaje de hembras con conectivo de diferente color también varió con los meses de colecta ($\chi^2 = 633,9$ gl = 11 $P < 0,0001$), y el año no tuvo efecto significativo ($\chi^2 = 0,3$ gl = 1 $P = 0,57$). El porcentaje mayor de hembras con el conectivo claro (> 85%), fue registrado al final del otoño (junio) y durante el invierno (julio a setiembre), al tiempo que la mayoría de las hembras que tuvieron el conectivo oscuro (> 90%) fueron colectadas entre la mitad de la primavera y la mitad de verano (noviembre a febrero) (Figura 5.8 B).

5.5.2.2. Contenido de lípidos

El contenido de lípidos de los adultos varió significativamente de acuerdo al mes en el que fueron colectados ($F_{11,23} = 37,6$ $P < 0,0001$). Los valores obtenidos en ambos años fueron semejantes ($F_{1,23} = 0,35$ $P = 0,56$). Machos y hembras tuvieron un contenido de lípidos similar ($F_{1,23} = 1,54$ $P = 0,23$) y en ambos sexos la variación en los meses fue semejante (interacción mes*sexo $F_{11,23} = 0,34$ $P = 0,97$).

Los adultos colectados durante otoño e invierno (abril a setiembre) tuvieron un contenido de lípidos significativamente mayor que los interceptados en primavera-verano (octubre a febrero) (Figura 5.9). El valor correspondiente al mes de marzo fue intermedio entre ambos grupos.

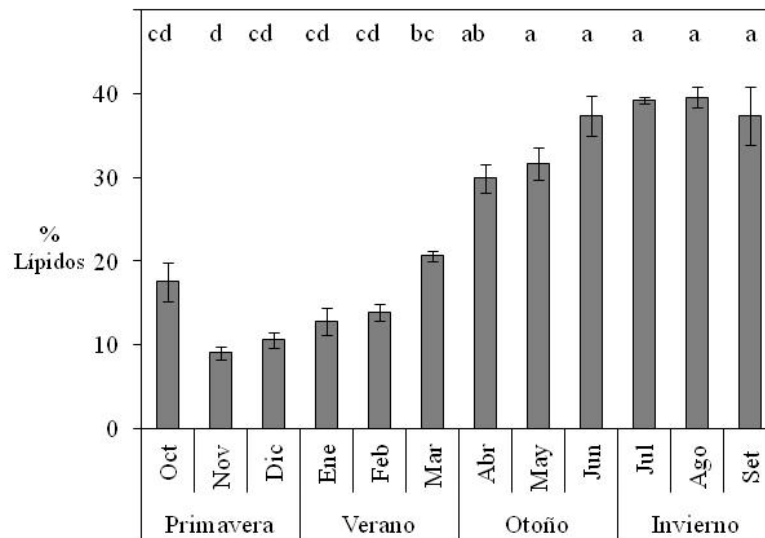


Figura 5.9. Contenido medio (\pm EEM) de lípidos del cuerpo (%) de adultos de *Piezodorus guildinii* en los distintos meses del año. (Años 2011-2013). Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente para la prueba de Tukey's HSD: $P \leq 0,05$).

5.5.2.3. Desarrollo de los órganos reproductivos

El grado de desarrollo de los ovarios varió en función del mes de colecta de las hembras ($\chi^2 = 456,0$ gl = 11 $P < 0,0001$); los resultados obtenidos en los dos años de muestreo fueron similares ($\chi^2 = 0,1$ gl = 1 $P = 0,74$). De acuerdo a los porcentajes de hembras con diferente estado de desarrollo de los ovarios, los meses quedaron estadísticamente separados en tres grupos (Figura 5.10). En el primer grupo, que incluye los meses de otoño e invierno (abril a setiembre), un alto porcentaje ($> 80\%$) de las hembras tuvieron el ovario inmaduro, alcanzando valores de 100% entre los meses de julio y setiembre. Este período se caracteriza porque la duración promedio del día es < 11 h (Cuadro 5.3). En el segundo grupo que estuvo integrado por los meses de noviembre a febrero (primavera/verano), cuando la fotofase es > 13 h (Cuadro 5.3), la mayoría de las hembras ($> 80\%$) tuvo el ovario desarrollado. Particularmente, en diciembre y enero, ninguna de las hembras mostró los ovarios inmaduros. Los meses de octubre y marzo, constituyeron el tercer grupo, y se

caracterizaron porque la mitad de las hembras tuvieron el ovario desarrollado. En ellos las horas de luz promedio se encuentran entre de 12 y 13 h (Cuadro 5.3).

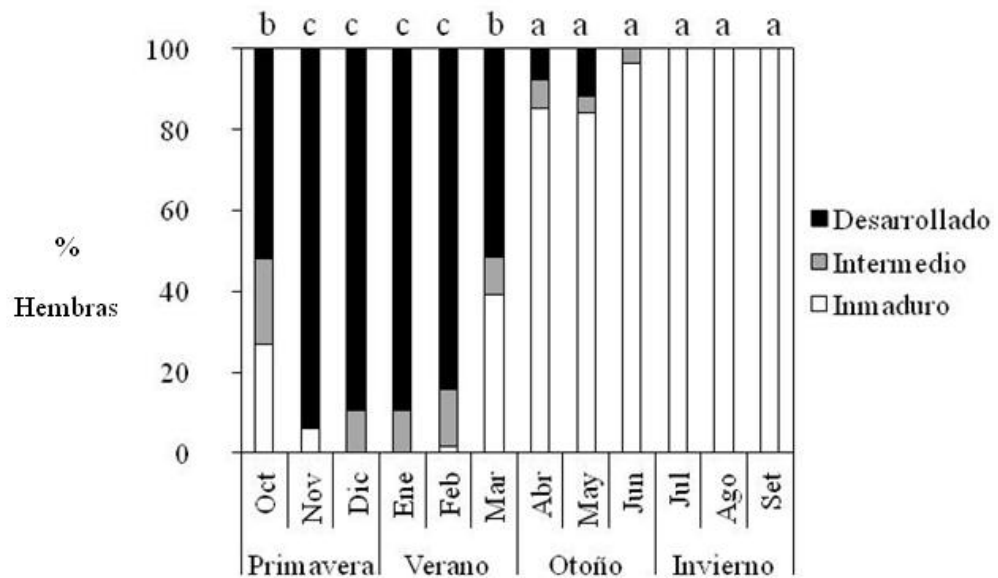


Figura 5.10. Porcentaje de hembras de *Piezodorus guildinii* con diferente grado de desarrollo de los ovarios en los distintos meses del año. (Años 2011-2013). Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

El mes de colecta tuvo efecto significativo en el largo de los testículos ($F_{11,11} = 51,7 P < 0,0001$), y el efecto año no fue significativo ($F_{1,11} = 1,5 P = 0,23$). Los machos interceptados entre noviembre y marzo (mitad de primavera y verano) tuvieron testículos significativamente más grandes que aquellos capturados entre mayo y setiembre (mitad del otoño e invierno), mientras que los colectados en octubre y abril (comienzo de primavera y otoño, respectivamente) tuvieron un tamaño intermedio (Cuadro 5.3).

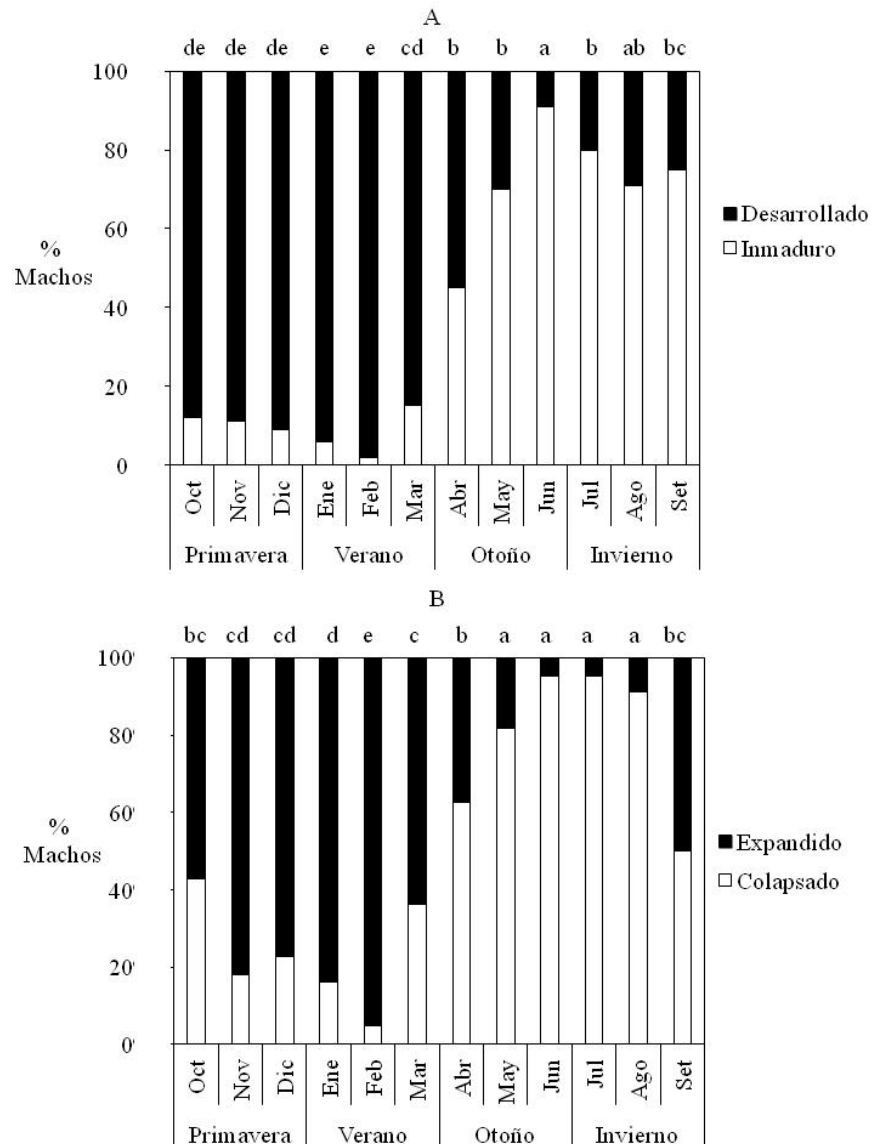


Figura 5.11. Porcentaje de machos adultos de *Piezodorus guildinii* con diferente grado de desarrollo de los testículos (A) y del saco ectodérmico (B) en los distintos meses del año. (Años 2011-2013). Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$).

El porcentaje de machos con diferente grado de desarrollo de los testículos también varió en función del mes ($\chi^2 = 225,1$ gl = 11 $P < 0,0001$), pero no con el año de colecta ($\chi^2 = 0,0$ gl = 1 $P = 0,95$). Desde la mitad del otoño hasta el final del invierno (mayo a setiembre), cuando la duración del día es menor a 12 h, la mayoría de los machos (> 70%) tuvo los testículos inmaduros, mientras que durante la primavera y verano (octubre a marzo), cuando el día tiene una duración mayor a 12 h, un alto porcentaje (> 85%) mostró los testículos desarrollados. El mes de abril fue un mes de transición, ambos grupos estuvieron representados en 50% (Figura 5.11 A).

El porcentaje de machos con distinta condición del saco ectodérmico varió con el mes de colecta ($\chi^2 = 274,3$ gl = 11 $P < 0,0001$), y los resultados para los dos años fueron semejantes ($\chi^2 = 0,8$ gl = 1 $P = 0,38$). Desde la mitad del otoño (mayo) hasta la mitad del invierno (agosto) la mayoría de los machos (> 80%) tuvieron el saco ectodérmico colapsado, mientras que entre la mitad de la primavera (noviembre) hasta la mitad del verano (febrero) un alto porcentaje lo tuvieron expandido (> 80%); el valor más alto correspondió a febrero (95%) (Figura 5.11 B).

5.6. DISCUSIÓN

5.6.1. Efecto del fotoperíodo y la temperatura en la morfología y fisiología de adultos

Los resultados del experimento de laboratorio indican que el fotoperíodo y la temperatura tuvieron efectos en la morfología y fisiología de los adultos. En condiciones de fotofase corta los adultos mostraron características como la disminución en el tamaño del cuerpo, la acumulación de reservas energéticas, la ocurrencia de estructuras reproductivas inmaduras, la menor frecuencia en la actividad alimentaria, y los cambios en la coloración del cuerpo de las hembras, que sugieren que los adultos de *P. guildinii* en condiciones abióticas desfavorables utilizan como estrategia la diapausa reproductiva. En general, en condiciones de fotofase corta el descenso de la temperatura aceleró y aumentó la tendencia a la

diapausa, lo que sugiere que la principal función de la temperatura es indicar el momento óptimo de inducción de la diapausa (Saulich y Musolin, 2012).

El tamaño del cuerpo de los adultos de *P.guildinii* estuvo bajo control de la duración de la fotofase, y fue significativamente más grande en condiciones de día largo (14 h) que en fotofase corta (10 h). La variación en la temperatura, al menos en condiciones de día corto, no tuvo efectos significativos en el tamaño del cuerpo.

Distintos autores estudiaron el efecto de factores abióticos en el tamaño y forma de diferentes especies de pentatómidos. En las especies que presentan espinas en el pronoto, como *Euchistus servus* (Say), *E. heros* (Fabr.), *Oebalus poecilus* (Dallas) y *Dichelops melacanthus* (Dallas), los autores encontraron que el largo de la fotofase afecta el tamaño y la forma de la misma (McPherson, 1974; Albuquerque, 1989, 1993; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003). Por su parte, Niva y Takeda (2003) reportaron que el ancho de la cabeza y del pronoto de *Halyomorpha halys* (Stål) en condiciones de fotoperíodo corto se redujo significativamente. Nakamura (2002) determinó que los adultos de *Dolycoris baccarum* (L.), mantenidos en condiciones de fotoperíodo largo (16:8 h L:O) tenían un tamaño mayor que los desarrollados en condiciones de fotoperíodo corto (12:12 h L:O).

El tamaño del cuerpo es uno de los caracteres más importantes de un insecto adulto, que afecta numerosos aspectos fisiológicos como la capacidad de soportar temperaturas extremas, de almacenar energía o nutrientes, la fecundidad y la supervivencia (Danks, 1987; Honěk, 1993; Nylin y Gotthard, 1998; Chown y Gaston, 2010). Los resultados obtenidos en este experimento y los reportados por Zerbino *et al.* (2013) indicarían que el tamaño del cuerpo de *P. guildinii* está asociado con la actividad reproductiva, la tasa de supervivencia, y la longevidad.

Los machos, a diferencia de las hembras, no mostraron cambios notorios en la coloración del cuerpo. Las hembras mostraron variaciones en el color de la banda del pronoto y del conectivo como consecuencia de la duración de la fotofase y de la edad, por lo que estas características podrían ser inexactas al momento de determinar el estado de dormancia de adultos colectados en el campo. Similares resultados encontraron Chocorosqui y Panizzi (2003) respecto a la variación en la coloración

abdominal de los adultos del pentatómido *D. melacanthus*.

Los cambios estacionales en la coloración del cuerpo, típicos de muchos heterópteros, a menudo son controlados por el fotoperíodo y generalmente están asociados con el estado fisiológico de los individuos (Musolin y Numata, 2003a; Musolin *et al.* 2007; Saulich y Musolin, 2007, 2012). Varios estudios con diferentes especies de pentatómidos determinaron que los cambios de color están relacionados a la diapausa, como el caso de *E. servus*, *E. tristigmus tristigmus* (Say), *N. viridula*, *O. ypsilongriseus* (DeGeer), *Plautia stali* (Scott), y *Thyanta calceata* (Say) (referencias en Saulich y Musolin, 2012). En general, las principales tendencias en los cambios de coloración asociados a la condición de diapausa son colores marrones en el cuerpo o color mate o claro en los integumentos. Esto les proporciona una protección pasiva de los predadores, haciéndolos menos visibles (Saulich y Musolin, 2012).

El contenido de lípidos en los adultos de ambos sexos aumentó, en la medida que la duración de la fotofase y la temperatura disminuyeron. Este resultado sugiere que para sobrevivir en el invierno, *P.guildinii* acumularía lípidos. Resultados similares fueron obtenidos en otras especies de pentatómidos (Panizzi y Hirose, 1995; Jones y Westcott, 2002; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Niva y Takeda, 2003). Las diferencias en el contenido de lípidos se manifestaron cuando los adultos tenían tiempo de emergidos, lo que sugiere que el proceso de acumulación de reserva se iniciaría en el estado adulto.

El desarrollo del aparato reproductor de ambos sexos estuvo influenciado por los factores abióticos evaluados. La reducción de la fotofase disminuyó significativamente el porcentaje de individuos con órganos reproductivos desarrollados. Al igual que en otras especies de insectos, el descenso de la temperatura acentuó el efecto negativo del acortamiento de la fotofase (Danks, 1987; Cho *et al.*, 2008; Saulich y Musolin, 2012), lo que sugiere que la respuesta al fotoperíodo en esta especie no es termoestable como en el caso de *N. viridula* y de *Arma custos* (Fabr.) (Musolin, 2012; Volkovich y Saulich, 1994).

La lenta disminución en el porcentaje de hembras que mostraron el ovario inmaduro en condiciones de fotofase corta a 20 °C, y la continua ocurrencia de

ovarios intermedios, indicaría que en algunos individuos la exposición a estas condiciones retrasa pero no impide el desarrollo del ovario, tal como lo observaron Spurgeon y Brent (2010) en *Lygus hesperus* (Knight). Saulich y Musolin (2009) consideran que en algunos casos, especialmente en especies que hibernan como adultos, la ausencia de oviposición es causada por la supresión directa de la maduración y/o oviposición, debido a las bajas temperatura del ambiente, más que por la inducción a la diapausa reproductiva. Zerbino *et al.* (2013) cuando evaluaron el comportamiento reproductivo de *P.guildinii*, encontraron que el período de preoviposición tuvo una duración cinco veces menor en fotofase larga (14 h) a 25 °C que en fotofase corta (10 h) a 20 °C. Además, en fotofase larga a 25 °C se registraron los valores más altos del porcentaje de hembras que ovipusieron, el número de posturas y total de huevos /hembra. La disminución de la temperatura incrementó el efecto negativo de la fotofase corta; las hembras mantenidas con 10 h de luz a 20 °C registraron valores significativamente más bajos de todas las variables, incluyendo el porcentaje de eclosión de huevos (4%).

El porcentaje de hembras con ovarios inmaduros registrado en este estudio, fue menor que los reportados en estudios de laboratorio para otras especies de pentatómidos. Higuchi (1994) determinó que en condiciones de fotofase corta (12 h o menos), más del 80% de las hembras de *P. hybneri* de 15 días de edad tuvieron el ovario inmaduro. Mourão y Panizzi (2002), establecieron que a los 30 días de edad el 90% de las hembras de *E. heros* tuvieron el ovario inmaduro cuando fueron mantenidas a 10 h de luz y 25 °C. Chocorosqui y Panizzi (2003), en el estudio de la biología de adultos de *D. melacanthus*, encontraron que cuando la fotofase era de 11 h y la temperatura de 25 °C, el 80% de las hembras de 20 días de edad tenían los ovarios inmaduros. Musolin y Numata (2003a) reportaron que en condiciones de fotofase corta (10 h) y 25 °C, el 100% de las hembras de *N. viridula* con 60 días de edad tenía el ovario inmaduro.

A pesar de que los testículos de los machos criados en condiciones de fotofase corta ocuparon una porción significativamente más pequeña de la cavidad abdominal que los desarrollados en fotofase larga, su apariencia fue normal, y resulto imposible

determinar diferencias en el estado de desarrollo por observación en microscopio estereoscópico, sin realizar la medición. Probablemente debido a que los testículos de esta especie son pequeños. Sin embargo, lo mismo fue observado en *N. viridula* (Ali y Ewiess, 1977; Esquivel, 2009), que es una especie que tiene testículos de mayor tamaño. En otros pentatómidos las diferencias entre los testículos inmaduros y maduros es tan notable, que no es necesario realizar mediciones para determinar la condición del aparato reproductor de los machos. En *E. heros* Mourão y Panizzi (2002) observaron que los testículos inmaduros tenían un largo de 1mm o menos, y Chocorosqui y Panizzi (2003) en *D. melacanthus* determinaron que si bien los testículos inmaduros tenían aspecto normal, eran considerablemente más pequeños que los desarrollados. En estos dos estudios, los autores determinaron que en condiciones de fotoperíodo corto a los 20 días de edad el 90% de los machos tuvieron los testículos inmaduros.

Algunos autores (Ali y Eweiss, 1977; Esquivel, 2009; Spurgeon y Brent, 2010) consideran que en aquellas especies en las que resulta dificultoso determinar el estado de desarrollo de los machos en base al tamaño de los testículos, es muy útil la evaluación del saco ectodérmico. En este estudio, el porcentaje de machos con el saco ectodérmico expandido cuando se desarrollaron en fotofase larga fue significativamente mayor que cuando fueron criados en fotofase corta. La disminución de la temperatura no acentuó el efecto negativo de la reducción de las horas de luz.

Los resultados obtenidos en este experimento y los reportados por Zerbino *et al.* (2013) indican que los adultos de ambos sexos de *P. guildinii* incrementan su tendencia a ingresar en estado de diapausa reproductiva en condiciones de día corto (10 h) y temperaturas de 20 °C. La incidencia de la diapausa observada en este estudio de laboratorio fue menor comparada a otros pentatómidos (Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003). Spurgeon y Brent (2010) encontraron que los adultos de *L. hesperus* provenientes de muestreos de campo exhibieron una respuesta mayor y más consistente al fotoperíodo corto y bajas temperaturas que los insectos evaluados en experimentos de laboratorio.

La duración de la fotofase afectó el comportamiento alimentario de los adultos de ambos sexos. Los desarrollados en fotofase larga (14 h) tuvieron una actividad alimentaria mayor que aquellos que permanecieron en condiciones de fotofase corta (10 h). Por otra parte, en los adultos mantenidos en fotofase larga la actividad alimentaria de los adultos permaneció estable durante el transcurso del tiempo, mientras que en los que se criaron en fotofase corta disminuyó. Los adultos fueron insensibles a los cambios de temperatura, al menos en condiciones de fotofase corta.

Los estudios referidos a la evaluación del efecto del fotoperíodo y la temperatura en la actividad alimentaria de pentatómidos son escasos. Mourão y Panizzi (2002) para adultos de *E. heros*, determinaron que la actividad alimentaria se incrementó con el largo de la fotofase y tendió a disminuir o disminuyó con la edad de los insectos. Estos autores determinaron que cuando la fotofase fue de 12 h o menos, la disminución en la actividad alimentar ocurrió entre la primer y segunda semana de vida de los adultos, y cuando la fotofase era de 14 h ocurrió entre la segunda y tercer semana. Niva y Takeda (2003) encontraron que ninfas del 5to estadio *H. halys* tuvieron menor actividad alimentaria con 12 h, respecto a cuando recibieron 16 h de luz.

El hecho que los machos hayan tenido una actividad alimentaria significativamente superior que las hembras, concuerda con datos de trabajos realizados con anterioridad (Panizzi *et al.*, 1995). Esta es una característica particular de esta especie. En otros pentatómidos como *N. viridula*, *E. heros* y *Acrosternum hilare* (Say), ambos sexos registran similar actividad (Bowling, 1980; Simmons y Yeargan, 1988; Panizzi *et al.*, 1995).

5.6.2. Determinación de formas estacionales: cambios morfológicos y fisiológicos de adultos colectados en el campo

Los adultos de *P. guildinii* colectados en las distintas estaciones del año mostraron diferencias en la morfología y fisiología. Aquellos interceptados en primavera-verano comparados con los capturados en otoño-invierno, mostraron

diferencias en el tamaño del cuerpo, contenido de lípidos, desarrollo de los órganos reproductivos, y particularmente las hembras tuvieron diferencias en el color en la banda del pronoto y en el conectivo.

Durante otoño e invierno, cuando la fotofase es menor a 12 h y la temperatura se encuentra por debajo de 20 °C, los adultos mostraron características particulares que indican diapausa reproductiva. En esta época, un porcentaje mayor de hembras y machos mostró órganos reproductivos inmaduros, los adultos de ambos sexos tuvieron un tamaño de cuerpo más pequeño y mayor contenido de lípidos; y particularmente, un alta porcentaje de hembras tuvo la banda del pronoto y el conectivo claro. Estos resultados confirman los obtenidos por Zerbino *et al.* (2014b) en el laboratorio. Por lo tanto el cambio de color de la banda del pronoto y el conectivo puede ser considerado como una característica que indica diapausa.

Las proporciones de hembras y machos con órganos reproductivos inmaduros registradas en los meses de otoño/invierno (abril a setiembre), sugieren que la diapausa en los machos es más corta y menos intensa que en las hembras. De esta manera, los machos estarían fisiológicamente listos para copular las hembras cuando éstas finalizan la diapausa. Estudios con diferentes especies de pentatómidos muestran que la diapausa reproductiva es inducida cuando la fotofase es igual o menor a 12 h (Ali y Ewiess, 1977; Albuquerque, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Nakamura y Numata, 1997; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Musolin y Numata, 2003a; Niva y Takeda, 2003).

La categorización del estado fisiológico de los machos (maduros e inmaduros), realizada en base a los datos obtenidos en el laboratorio de acuerdo al tamaño del testículo, fue pertinente para determinar el estado de desarrollo del aparato reproductor de los machos provenientes del campo. Dado que los resultados referidos al porcentaje de machos con diferente grado de desarrollo de acuerdo al testículo y saco ectodérmico fueron similares, en esta especie en la que resulta dificultoso determinar el estado de desarrollo en base a la observación del testículo, resulta más práctico evaluar la condición del saco ectodérmico (Ali y Eweiss, 1977; Esquivel, 2009; Spurgeon y Brent, 2010).

5.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran la ocurrencia de formas estacionales diferentes y permiten establecer que durante el otoño e invierno, cuando la duración del día es igual o menor a 12 h, los adultos permanecen en estado de diapausa reproductiva con acumulación de reservas energéticas, estructuras reproductivas inmaduras, cambios en el tamaño del cuerpo y en su coloración, y con menor frecuencia en la actividad alimentaria. Las características asociadas a la diapausa observadas en los adultos colectados en el campo confirman los resultados previamente obtenidos en el laboratorio.

5.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Mestría]. Porto Alegre: 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.
- Bowling CC. 1980. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybean. *Journal of Economic Entomology* 73(1): 1 - 3.
- Cho JR, Minh L, Kim HS, Boo KS. 2008. Effect of photoperiod and temperature on reproductive diapauses of *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(2): 53 - 57.

- 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(2): 655 - 664.
- Chown SL, Gaston KJ. 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews* 85(1): 139 - 169.
- Danks HV. 2003. Studying insect photoperiodism and rhythmicity: Components approaches, and lessons. *European Journal of Entomology* 100(2): 209 - 221.
- Danks HV. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. Canadá: Biological Survey of Canada (Terrestrial arthropods) Monographs series No 1. 439 p.
- 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.
- 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.
- Honěk A. 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66(3): 483 - 492.
- Ichimori JW, Ohtomo R, Suzuki K, Kurihara M. 1990. Specific protein related to adult diapause in the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea*. *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.

- Jones VP, Westcott D. 2002. The effect of seasonal changes on *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) and *Trissolcus basalus* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) in Hawaii. *Biological Control* 23(3): 115 - 120.
- 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.
- Mansingh A. 1971. Physiological classification of dormancies in insects. *Canadian Entomologist* 103: 983 - 1009.
- 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.
- 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, Fujisaki K, Numata H. 2007. Photoperiodic control of diapauses termination, color change and postdiapause reproduction in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Physiological Entomology* 32(1): 64 - 72.
- Musolin DL, Numata H. 2003a*. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and color change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiological Entomology* 28(2): 65 - 74.

* Se utiliza la letra “a” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

- Nakamura K. 2002. Effect of photoperiod on the size–temperature relationship in a pentatomid bug, *Dolycoris baccarum*. *Journal of Thermal Biology* 27(6): 541 - 546.
- 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.
- Numata H, Saulich AH, Volkovich TA. 1993. Photoperiodic responses of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, under conditions of constant temperature and under thermoperiodic conditions. *Zoological Science* 10(3): 521 - 527.
- Nylin S, Gotthard K. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology* 43: 63 - 83.
- 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*. Brasilia DF: Embrapa Informação Tecnológica. 465 - 522.
- 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, Niva CC, Hirose E. 1995. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. *Journal of Entomological Science* 30(3): 333 - 341.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Saulich A KH, Musolin DL. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomological Review* 92(1): 1 - 26.

- Saulich A KH, Musolin DL. 2009. Seasonal Development and Ecology of Anthocorids (Heteroptera, Anthocoridae). *Entomological Review* 89: 501–528.
- Saulich A KH, Musolin DL. 2007. Times of the year: the diversity of seasonal adaptations and ecological mechanisms controlling seasonal development of true bugs (Heteroptera) in the temperate climate. *Trudy Biol NII SPbGU* 53: 25 - 106.
- Shearer PW, Jones VP. 1996. Diel feeding pattern of adult female southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* 25(3): 599 - 602.
- 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). Poster 266. 1CD.
- Silva FAC, Panizzi AR. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 52(1): 131 - 134.
- Simmons AM, Yeargan KV. 1988. Feeding frequency and feeding duration of the green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean. *Journal Economic of Entomology* 81(3): 812 - 815.
- Spurgeon DW, Brent CS. 2010. Morphological characters of diapauses in *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Entomological Science* 45(4): 303 - 316.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. Seasonal adaptations of insects. New York: Oxford University Press. 411p.
- USNO (The United States Naval Observatory). 2012. Consulta (27/8/2013, http://aa.usno.navy.mil/data/docs/RS_OneYear.php)

- Volkovich TA, Saulich AH. 1994. The predatory bug *Arma custos*: photoperiodic and temperature control of diapause and coloration. *Zoologicheskii Zhurnal* 73(3): 26 - 37.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014b^{*}. 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.

^{*} Se utiliza la letra “b” a efectos de indicar trabajos diferentes contenidos en el conjunto de esta tesis

6. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. DISCUSIÓN GENERAL

La información generada en esta tesis doctoral amplía el conocimiento sobre la bioecología de *Piezodorus guildinii* (Westwood), uno de los principales insectos plaga del cultivo de soja en algunas regiones de las Américas (Baur y Baldwin, 2006; Castiglioni *et al.*, 2008; Zerbino, 2010; Zerbino *et al.*, 2010; Kamminga *et al.*, 2012; Antônio Panizzi, 2011 com. pers.). A pesar de su importancia económica a nivel nacional, poco se conocía sobre la estrategia de supervivencia durante el período en que los factores bióticos (escasez de alimento) y abióticos (horas de luz y temperatura) son desfavorables, y sobre la función que cumplen las distintas especies vegetales en la historia de vida de este insecto.

Al igual que otros heterópteros, la disponibilidad de alimento, la duración de la fotofase y la temperatura, demostraron ser los factores principales que regulan la estacionalidad del insecto, afectando distintos aspectos de la biología de ninfas y adultos, el desempeño reproductivo de las hembras, y el comportamiento alimentario (Ali y Ewiess, 1977; Albuquerque, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Nakamura y Numata, 1997; Musolin y Numata, 2003b; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Niva y Takeda, 2003; Panizzi, 1997, 2000; Panizzi y Silva, 2009; Zerbino *et al.*, 2013, 2014b).

Con los estudios realizados fue posible conocer la ocurrencia estacional del insecto en distintas especies vegetales y determinar la época en que se produce la dispersión desde y hacia el cultivo de soja, y también se pudo establecer el rol que cumplen las distintas especies vegetales y definir cuál es el huésped alternativo más importante en la biología del insecto. La información obtenida es un aporte para concebir tácticas de manejo que puedan ser aplicadas previo a que el insecto colonice el cultivo de soja (Panizzi y Parra, 2009).

En el sur-oeste del Uruguay, entre 33° 55' y 34° 17' de latitud Sur, cuando el alimento preferido, la soja, está ausente, *P. guildinii* es encontrado en al menos 15 especies vegetales y cinco sitios de hibernación (rastros de soja y sorgo, borde de

gramilla de soja, corteza y hojarasca de eucaliptus). De todos ellos, las leguminosas alfalfa *Medicago sativa* L., trébol rojo *Trifolium pratense* L., y lotus *Lotus corniculatus* L., los arbustos azarero *Pittosporum undulatum* Ventenat y ligustro *Ligustrum lucidum* Aiton, las cañas *Phyllostachys* sp., y la hojarasca de *Eucalyptus* sp, son los hábitat donde el insecto es más abundante y su presencia se registra durante un período de tiempo más prolongado.

Algunas de las plantas alternativas en las que los adultos son encontrados, como el azarero, las cañas, el arazá *Psidium* sp., la catalpa *Catalpa bignoides* Walter, el guaviyú *Myrciastes pungens* (Berg) Legrand, el roble australiano *Grevillea robusta* A.Cunn., la acacia *Acacia melanoxylon* R.Br., el cotoneaster *Cotoneaster lacteus* W. W. Sm., y el maíz *Zea mays* L. no se encuentran mencionadas en las diferentes prospecciones realizadas en otras regiones de América del Sur (Ferreira y Panizzi, 1982; Panizzi y Slansky, 1985b; Costa *et al.*, 1995; Bunde *et al.*, 2010; Garlet *et al.*, 2010). Esto enfatiza una vez más, la importancia que tiene realizar estudios locales para determinar las plantas y sitios que utiliza el insecto (Panizzi, 1997; Panizzi, 2000).

De acuerdo al estudio de ocurrencia estacional en distintas especies vegetales y sitios de hibernación, en la región de estudio las generaciones de este insecto se desarrollarían en la siguiente sucesión de plantas huéspedes y/o hábitat: al inicio del otoño, cuando la soja se cosecha, las ninfas mayores y los adultos se dispersan hacia las leguminosas forrajeras, fundamentalmente alfalfa; al mismo tiempo los adultos pueden comenzar a trasladarse hacia plantas perennes como el azarero, ligustro, y cañas del género *Phyllostachys* sp., las cuales probablemente son utilizadas como abrigo. Este desplazamiento es máximo en el inicio del otoño. Asimismo, en este momento los adultos también pueden iniciar el movimiento hacia los sitios de hibernación, como la hojarasca de *Eucalyptus* sp., que son utilizados como refugio, aunque el mayor desplazamiento ocurre al inicio del invierno, cuando la población en las leguminosas forrajeras y plantas perennes disminuye considerablemente (Zerbino *et al.*, 2014b).

La alfalfa, comparada con las otras leguminosas, es la especie vegetal donde se desarrollan las poblaciones más importantes; los adultos y las ninfas se encuentran con mayor abundancia y durante un período de tiempo más prolongado (hasta 11 meses) (Zerbino *et al.*, 2014a). Esto indica que la alfalfa es el principal enlace antes y después del cultivo de soja (Fraga y Ochoa, 1972; Panizzi y Slansky, 1985a). Las vainas inmaduras de esta especie vegetal tienen una adecuada aptitud nutricional para el desarrollo de este insecto. Las ninfas se desarrollan y su mortalidad es menor que en otras leguminosas forrajeras, y los adultos tienen una longevidad y desempeño reproductivo similar que los que se alimentan con vainas inmaduras de soja (Scheirs *et al.*, 2000, 2005).

Todas estas características permiten establecer que el cultivo de alfalfa es un componente muy importante en la historia de vida de *P. guildinii*; por lo tanto, esta debe ser la especie vegetal en la cual habría que concentrar esfuerzos para desarrollar tácticas de control a aplicar durante la primavera, que impidan el desarrollo de la población que va a colonizar la soja, y que permitan disminuir el impacto del insecto en el cultivo. En aquellas regiones del país donde este cultivo no ocupe un área de consideración, las intervenciones deben ser planificadas para el cultivo de lotus, que si bien demostró ser una planta huésped secundaria y un alimento de menor calidad nutricional que la alfalfa, el insecto se desarrolla y se reproduce. El trébol rojo nunca deberá ser considerado para este tipo de acciones, porque es un componente con importancia menor en la historia de vida del insecto, que no contribuye al incremento de la población que ingresa al cultivo de soja, dado que las ninfas menores no se desarrollan y los adultos no se reproducen.

El control biológico cumple una función muy importante en programas de manejo de plagas holísticos. En este contexto es necesario replantearlo, porque el control biológico clásico para agroecosistemas altamente perturbados como los cultivos anuales no ha resultado eficiente; por el contrario, la conservación de los enemigos naturales residentes y la mejora de su hábitat en ambientes menos perturbados o de vegetación perenne tienen gran potencial de uso en cultivos anuales (Ehler, 2000). En el caso particular de *P. guildinii*, este tipo de estrategia debería ser

considerada para aplicar en el cultivo de alfalfa. Para ello es fundamental profundizar en el conocimiento en otros aspectos de la ecología de la plaga y de sus enemigos naturales a escala de predio y de paisaje (Ehler, 2000).

A partir de los resultados de la biología comparada y de la preferencia alimentaria, surge la necesidad de conocer los atributos químicos (nutrientes y no nutrientes) de las vainas inmaduras de alfalfa. La identificación de compuestos que estimulan la oviposición tiene potencial de uso en la manipulación del comportamiento de los insectos en el campo. También, sería importante conocer los mecanismos mediante los cuales los adultos son atraídos para colonizar y utilizar la alfalfa como alimento.

A menudo, los adultos se dispersan desde el huésped utilizado en estado de ninfa a otras especies vegetales en las cuales se van a alimentar y reproducir. Este cambio de alimento de ninfa a adulto, es un evento común en la biología de los pentatómidos que puede tener impactos variables, positivo, negativo o simplemente no afecta el desempeño de los adultos. Dado que para la región de estudio la secuencia de plantas en la cual el insecto se desarrolla y reproduce con más éxito es alfalfa, soja, alfalfa, es fundamental evaluar el efecto que tiene este cambio de alimento (Panizzi y Silva, 2009). Disponer de esta información es importante al momento de diseñar estrategias para el manejo de este insecto en la entezafra.

La información obtenida indica que al igual que muchas especies de Heteroptera (Pentatomidae), en las distintas estaciones del año los adultos de *P. guildinii* tienen diferencias morfológicas y fisiológicas, como consecuencia de las variaciones en el fotoperíodo y la temperatura y que la diapausa reproductiva en estado adulto es la estrategia de supervivencia que desarrolla cuando los factores bióticos y abióticos son desfavorables (Ali y Ewiess, 1977; Albuquerque, 1993; Hodek y Hodková, 1993; Kobayashi y Numata, 1995; Nakamura y Numata, 1997; Musolin y Numata, 2003b; Mourão y Panizzi, 2002; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Niva y Takeda, 2003, Zerbino *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

En el otoño e invierno un alto porcentaje de los adultos de ambos sexos tienen los órganos reproductivos inmaduros. La ausencia de ninfas durante el otoño,

invierno e inicio de la primavera, indican que las ninfas que alcanzan el estado adulto en el otoño no se reproducen hasta la primavera siguiente (Zerbino *et al.*, 2014a). Zerbino *et al.* (2013, 2014b) en el laboratorio, determinaron que el porcentaje de mortalidad de las ninfas, y la longevidad y supervivencia de los adultos eran mayores cuando se desarrollaron en condiciones de fotofase corta (10 h) y temperatura de 20 °C. La comparación de las proporciones de hembras y machos con órganos reproductivos inmaduros en otoño e invierno (abril a setiembre) sugiere que la diapausa en los machos es más corta y menos intensa. De esta forma los machos estarían fisiológicamente prontos para la cópula, cuando las hembras finalizan la diapausa (Zerbino *et al.*, 2014a).

Durante la diapausa, la estructura de sistemas externos e internos puede ser modificadas, lo cual a menudo resulta en cambios de color y de tamaño del cuerpo (Danks, 1987). En marzo el tamaño del cuerpo de los adultos comienza a disminuir gradualmente hasta alcanzar el mínimo al finalizar el otoño (junio). Zerbino *et al.* (2014b) en el laboratorio determinaron que el tamaño del cuerpo se encuentra bajo control del fotoperíodo, y que en condiciones fotoperíodo corto los insectos son más pequeños. El tamaño del cuerpo es uno de los caracteres más importantes de un insecto adulto, que afecta numerosos aspectos fisiológicos como la capacidad de soportar temperaturas extremas y de almacenar energía o nutrientes, la fecundidad y la supervivencia (Danks, 1987; Honěk, 1993; Nylin y Gotthard, 1998; Chown y Gaston, 2010). Los machos, a diferencia de las hembras, no muestran cambios notorios en la coloración del cuerpo. La mayoría de las hembras entre los meses de junio y setiembre, tienen la banda del pronoto y el conectivo de tipo claro, y por el contrario de tipo oscuro desde noviembre hasta febrero. En el laboratorio, para ambas características y en todas las edades, Zerbino *et al.* (2014b), encontraron que ambos tipos, claro y oscuro, estuvieron asociados a condiciones de fotofase corta (10h-20 °C) y fotofase larga (14h- 25 °C), respectivamente.

En el momento que el porcentaje de hembras con la banda del pronoto y el conectivo tipo claro comienza a aumentar, también aumenta la proporción de hembras con ovarios inmaduros. Los cambios estacionales en la coloración del

cuerpo, típicos de muchos heteropteros, que están regulados por las horas de luz, en general se relacionan con la diapausa (Musolin y Numata, 2003a; Musolin *et al.*, 2007; Saulich y Musolin, 2007, 2012; Zerbino *et al.*, 2014a, b).

Cuando los adultos de ambos sexos tiene los órganos reproductivos inmaduros en el otoño e invierno, se produce un aumento en las reservas del cuerpo (Zerbino *et al.*, 2014a). La acumulación de reservas energéticas es uno de los fenómenos más característicos de un insecto que está en estado de diapausa (Danks, 1987; Ito, 1985; Chocorosqui y Panizzi, 2003); esto les permite sobrevivir y prolongar la longevidad de los adultos durante los períodos adversos (Ito, 1985; Panizzi y Hirose, 1995). Zerbino *et al.* (2014b) reportaron que cuando la duración de la fotofase y la temperatura disminuyó, los adultos acumularon lípidos y la actividad reproductiva se redujo.

La detención o disminución de la alimentación es otro de los procesos característicos de la diapausa (Shearer y Jones, 1996; Chocorosqui y Panizzi, 2003; Saulich y Musolin, 2012). En el laboratorio, los adultos de ambos sexos tuvieron menor actividad alimentaria cuando la duración de la fotofase tuvo una duración de 10hL (Zerbino *et al.*, 2014b); por lo tanto, es pertinente suponer que los adultos que pasan el invierno no se alimentan hasta el comienzo de la primavera. Panizzi y Silva (2009) reportan que durante el invierno en el estado de Paraná, Brasil, (24° latitud S) los adultos de *P. guildinii* se alimentan. En esta región, durante el otoño-invierno el día tiene una duración mayor que en nuestra latitud, lo cual confirmaría que la actividad alimentaria de *P. guildinii* se encuentra bajo control del fotoperíodo.

La diapausa desarrollada por *P. guildinii* es facultativa, su inducción está controlada por la respuesta al largo del día, y la temperatura modifica el efecto del fotoperíodo (Zerbino *et al.*, 2013, 2014b). La principal función de la temperatura es indicar el momento óptimo de inducción de la diapausa, por lo que la interacción del fotoperíodo y la temperatura crea un mecanismo de regulación ecológica fiable para determinar el inicio oportuno de este proceso (Saulich y Musolin, 2012). Como respuesta al calentamiento global, este insecto podría desarrollar actividad reproductiva durante el período del año en el cual en la actualidad desarrolla

diapausa reproductiva. Como resultado podría haber un incremento en el número de generaciones y consecuentemente un incremento en el número de insectos que colonicen el cultivo de soja, lo que incrementaría las pérdidas que causa este insecto (Musolin, 2007). En este escenario, se justifican aún más el desarrollo de tácticas de manejo durante el período de ausencia del cultivo de soja.

6.2. CONCLUSIONES

La información generada servirá de base para el desarrollo de un programa de manejo holístico, eficiente y ecológicamente compatible de *P. guildinii*. El alimento, la duración de la fotofase y la temperatura demostraron ser los principales factores que regulan la estacionalidad de *P. guildinii*, afectando distintos aspectos de la historia de vida del insecto.

En la región litoral Sur del Uruguay, durante la primavera-verano se registran al menos dos generaciones. Este insecto se alimenta y reproduce en su huésped preferido, la soja, durante un breve período del año, y la alfalfa es la principal planta huésped en la entrefa, por lo que debe ser la especie vegetal en la cual habría que concentrar esfuerzos para desarrollar tácticas de control a aplicar durante la primavera, que impidan el desarrollo de la población que va a colonizar la soja, y que permitan disminuir el impacto del insecto en el cultivo.

Durante el otoño y el invierno, cuando el día tiene una duración menor a 12 h, y la temperatura media está por debajo de los 17 °C, los adultos, que se desplazan hacia plantas alternativas u ocupan sitios de hibernación, se encuentran en estado de diapausa reproductiva, mostrando características especiales como la acumulación de reservas energéticas (lípidos), órganos reproductivos inmaduros, menor tamaño del cuerpo y una disminución en la actividad alimentaria. Las hembras en particular, en este período cambian el color de la banda del pronoto y el conectivo rosado o púrpura, característico del verano, por colores más claros.

6.3. PERSPECTIVAS

En el contexto del manejo de plagas, el objetivo de la ecología del paisaje agrícola es entender cómo poblaciones de insectos plaga y enemigos naturales usan parches adyacentes de hábitat, y de esta manera poder idear estrategias de manejo de plagas a nivel regional, del paisaje o de predios, de acuerdo a la movilidad del insecto. En el caso de los hemípteros fitófagos, que son insectos poco móviles, diseñar estrategias a escala de paisaje o predio es lo adecuado.

Los resultados sobre el conocimiento de la estacionalidad de este insecto y de los factores abióticos involucrados en la misma, así como también el rol que cumplen las distintas plantas huéspedes, sugieren que una variedad de tácticas de manejo en las leguminosas forrajeras durante la primavera, particularmente alfalfa, podrían ser exploradas para el manejo de este insecto. Para ello es fundamental profundizar en el conocimiento en aspectos de la ecología de la plaga y sus enemigos naturales a escala de predio y de paisaje.

Sería necesario generar información a nivel de campo y de laboratorio sobre:

1) Interacción alfalfa-*P.guildinii*

- Distancia de dispersión de los adultos desde alfalfa hacia cultivos de soja y viceversa. Esta información es fundamental para el diseño de estrategias de manejo a escala del paisaje.
- Perfil químico de las vainas de alfalfa (nutrientes y no nutrientes) para identificar compuestos que permitan la manipulación de insectos en el campo (ej. los que estimulan la oviposición).
- Efecto del cambio de la fuente de alimento (soja-alfalfa y viceversa) de ninfa a adulto en el desempeño de los adultos. A menudo las ninfas se dispersan desde un huésped a otro donde los adultos se van a alimentar y reproducir. El cambio del alimento puede tener impactos variables. Disponer de esta información es importante al momento de diseñar estrategias para el manejo en ausencia del cultivo de soja.
- Comportamiento alimentario utilizando la gráfica de penetración eléctrica (EPG), el cual permitiría cuantificar y realizar

comparaciones estadísticas de los distintos comportamientos que ocurren dentro de la planta

2) Interacciones alfalfa-*P.guildinii*-enemigos naturales

- Especies de predadores y parasitoides, fundamentalmente de huevos, que habitan las leguminosas forrajeras en primavera en la región Litoral Sur, previo a la colonización de la soja, con el objetivo de conocer cuáles especies predominan y su estacionalidad. La predación de huevos de la primera generación puede tener efectos en la ecología de *P. guildinii* de dos maneras, puede reducir el tamaño de la población que coloniza la soja, pero también podría disminuir la abundancia de los parasitoides de huevos.
- Impacto de las prácticas de manejo de la vegetación espontánea y de la alfalfa (pastoreo y/o los cortes en franjas) aplicadas en la primavera, sobre la dinámica poblacional de *P. guildinii*, de los predadores y de los parasitoides de huevos.
- Interacciones tritróficas en el laboratorio. El estudio del complejo de semioquímicos relacionados a las plantas huéspedes puede ayudar a identificar compuestos químicos que sean atrayentes o repelentes de *P. guildinii* o que atraigan y retengan los enemigos naturales.

7. 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 Mestría]. Porto Alegre: 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.
- Arroyo L, Kamawura N. 2003. Biología y ecología de *Piezodorus guildinii* Westwood en soya. *Artículos de Investigación, Centro Tecnológico Agropecuario en Bolivia* N°2: 3 - 6.
- Backus EA, Cline AR, Ellerseick MR, Serrano MS. 2007. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. *Annals of the Entomological Society of America* 100(2): 296 - 310.
- Baur ME, Baldwin J. 2006. Red banded stink bug trouble in Louisiana. *Louisiana Agriculture* 49: 9 - 10.
- Beck SD. 1980. *Insect photoperiodism*. New York: Academic Press. 387 p.
- Bowling CC. 1980. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybean. *Journal of Economic Entomology* 73(1): 1 - 3.
- Bunde PRS, 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.

- 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.
- Castiglioni E, Ribeiro A, Silva H, Pereyra C, Cristino M. 2008. Algunas interrogantes y respuestas para el manejo de plagas en los sistemas agrícolas intensificados. *Cangüé* 30: 25 - 29.
- Cividanes FG, Parra JRP. 1994. Biología em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. III. *Piezodorus guildinii* (West., 1837) (Heteroptera: Pentatomidae). *Científica* 22(2): 177 - 186.
- 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.
- Cho JR, Minho L, Kim HS, Boo KS. 2008. Effect of photoperiod and temperature on reproductive diapause of *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(2): 53 - 57.
- 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.
- Chocorosqui VR, Panizzi AR. 2002. Influência da temperatura na biologia de ninfas de *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Ciências Agrárias* 23(2): 217 - 220.

- Chown SL, Gaston KJ. 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Review* 85(1): 139 - 169.
- Danks HV. 2007. The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomologist* 139(1): 1 - 44.
- Danks HV. 2003. Studying insect photoperiodism and rhythmicity: Components approaches, and lessons. *European Journal of Entomology* 100(2): 209 - 221.
- Danks HV. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. Canadá: Biological Survey of Canada (Terrestrial arthropods) Monographs series No 1. 439 p.
- 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(2): 197 - 203.
- Ehler LE. 2000. *Farmscape Ecology of stink bugs in Northern California*. Maryland: ESA. 59 p.
- 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.
- Ferreira BSC, Panizzi AR. 1982. Percevejos pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. *Anais II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja* 2: 140 - 151.
- Fraga CP, Ochoa LH. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). 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.
- 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(4181): 1045 - 1052.
- Gómez VA, Gaona EF, Arias OR, Lopez MB de, Ocampos OE. 2013. Aspectos biológicos de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) criados con diferentes dietas en condiciones de laboratorio. *Revista Sociedad Entomología Argentina* 72(1-2): 27 - 34.
- 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.
- Honěk A. 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66(3): 483 - 492.
- Ichimori JW, Ohtomo R, Suzuki K, Kurihara M. 1990. Specific protein related to adult diapause in the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea*. *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.
- Jones VP, Westcott D. 2002. The effect of seasonal changes on *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) and *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) in Hawaii. *Biological Control* 23(3): 115 - 120.
- 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.

- 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.
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS. 1993. The ecology of insect overwintering. Cambridge: Cambridge University Press. 255 p.
- Lopes OJ, Link D, Basso IV. 1974. Pentatomídeos de Santa Maria—lista preliminar de plantas hospedeiras. *Revista do Centro de Ciências Rurais* 4: 317 - 322.
- Mansingh A. 1971. Physiological classification of dormancies in insects. *Canadian Entomologist* 103(7): 983 - 1009.
- 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 INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2007. 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. Estación Experimental Agropecuaria 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.
- 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.
- Mourão APM, Panizzi AR. 2000. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euchistus heros* (Fabr.) (Hemiptera Pentatomidae) no norte do Paraná. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29(2): 205 - 208.

- 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. 2007. Insects in a warmer world: ecological, physiological and life-history responses of true bugs (Heteroptera) to climate change. *Global Change Biology* 13(8): 1565 - 1585.
- Musolin DL, Fujisaki K, Numata H. 2007. Photoperiodic control of diapause termination, color change and postdiapause reproduction in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Physiological Entomology* 32(1): 64 - 72.
- Musolin DL, Numata H. 2003a. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and color change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiological Entomology* 28(2): 65 - 74.
- Musolin DL, Numata H. 2003b. Timing of diapause induction and its life-history consequences in *Nezara viridula*: is it costly to expand the distribution range? *Ecological Entomology* 28(6): 694 - 703.
- Nakamura K. 2002. Effect of photoperiod on the size-temperature relationship in a pentatomid bug, *Dolycoris baccarum*. *Journal of Thermal Biology* 27(6): 541 - 546.
- Nakamura K, Numata H. 1998. Alternative life cycles controlled by temperature and photoperiod in the oligophagus bug, *Dybowskyi reticulata*. *Physiological Entomology* 23(1): 69 - 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.

- Numata H, Saulich AH, Volkovich TA. 1993. Photoperiodic responses of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, under conditions of constant temperature and under thermoperiodic conditions. *Zoological Science* 10(3): 521 - 527.
- Numata, H.; Yamamoto, K. 1990. Feeding on seeds induce diapauses in the cabbage bug, *Eurydema rugosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57(3): 281 - 284.
- Nylin S, Gotthard K. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology* 43: 63 - 83.
- Oliveira EDM, Panizzi AR. 2003. Performance of nymphs and adults of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean pods at different developmental stages. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology* 46(2): 187 - 192.
- 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, 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, 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, Niva CC, Hirose E. 1995. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. *Journal of Entomological Science* 30(3): 333 - 341.
- 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, 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.
- 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*). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 35: 429 - 438.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Saulich A KH, Musolin DL. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomological Review* 92(1): 1 - 26.
- Saulich A KH, Musolin DL. 2009. Seasonal Development and Ecology of Anthocorids (Heteroptera, Anthocoridae). *Entomological Review* 89: 501–528.

- Saulich A KH, Musolin DL. 2007. Times of the year: the diversity of seasonal adaptations and ecological mechanisms controlling seasonal development of true bugs (Heteroptera) in the temperate climate. *Trudy Biol NII SPbGU* 53: 25 - 106.
- Scheirs J, Jordaens K, De Bruyn L. 2005. Have genetic trade-offs in host use been overlooked in arthropods? *Evolutionary Ecology* 19(6): 551 - 561.
- Scheirs J, De Bruyn L, Verhagen R. 2000. Optimization of adult performance determines host choice in a grass miner. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 267(1457): 2065 - 2069.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M. 2005. *Insect-Plant Biology*. Oxford: University Press. 421 p.
- Scriber JM, Slansky F Jr. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology* 26: 183 - 211.
- Serra GV, La Porta NC. 2001. Aspectos biológicos y reproductivos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pentatomidae) en condiciones de laboratorio. *Agriscientia* XVIII: 51 - 57.
- Shearer PW, Jones VP. 1996. Diel feeding pattern of adult female southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* 25(3): 599 - 602.
- Silva FAC, Carrão-Panizzi MC, Moraes MCB, Panizzi AR. 2013. Influence of volatile and nonvolatile secondary metabolites from soybean pods on feeding and on oviposition behavior of *Euschistus heros* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* 42(6): 1375 - 1382.
- 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) Poster 266. 1CD.

- Silva FAC, Panizzi AR. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 52(1): 131 - 134.
- Simmons AM, Yeargan KV. 1988. Feeding frequency and feeding duration of the green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean. *Journal Economic of Entomology* 81(3): 812 - 815.
- Simpson SJ, Raumheimer D. 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiological Entomology* 18(4): 395 - 403.
- Simpson SJ, Simpson CL. 1990. The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insects. En: Bernays, EA. (Ed.). *Insect-plant interactions*. Boca Raton: CRC Press. 111 - 160.
- Slansky F Jr., Panizzi AR. 1987. Nutritional ecology of seed sucking insects. En: Slansky F Jr., Rodriguez JG. (Eds.). *Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates*. New York: Wiley. 283 - 320.
- Spurgeon DW, Brent CS. 2010. Morphological characters of diapauses in *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Entomological Science* 45(4): 303 - 316.
- Stacey DA, Fellowes DE. 2002. Temperature and the development rates of thrips: evidence for a constraint on local adaptation? *European Journal of Entomology* 99(3): 399 - 404.
- Stephens DW, Krebs JR. 1986. *Foraging theory*. Princeton: Princeton University Press. 247 p.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. New York: Oxford University Press. 411 p.
- Trudgill DL, Honek A, Li D, Van Straalen NM. 2005. Thermal time - concepts and utility. *Annals of Applied Biology* 146(1): 1 - 14.

- USNO (The United States Naval Observatory). 2012. Consulta (27/8/2013, http://aa.usno.navy.mil/data/docs/RS_OneYear.php)
- Ventura MU, Moltanvan R, Panizzi AR. 2000. Feeding preferences and related types of behaviour of *Neomegalotomus parvus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97(3): 309 - 315.
- Volkovich TA, Saulich AH. 1994. The predatory bug *Arma custos*: photoperiodic and temperature control of diapause and coloration. *Zoologicheskii Zhurnal* 73(10): 26 - 37.
- Zerbino MS. 2010. Manejo de chinches en soja. *Revista INIA* N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 N583.*
- Zerbino MS. 2007. Avances en el control químico de insectos en soja. En: *Jornada de Cultivos de Verano, 2007, Dolores. Actividades de difusión N 505.*
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014a. Nymph and adult seasonal occurrence on different plants and morphological and physiological changes of adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in Uruguay. *Journal of Pest Science*, aceptado para publicar 29/10/2014, DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2.
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR. 2014b. 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, Silva F.A.C, Panizzi AR. 2010. Avanos recentes sobre a interação plantas hospedeiras/percevejos no Uruguai. En: *Congresso Brasileiro de Entomologia. (XXIII, Natal, Brasil) Poster 968. 1CD.*

EFFECT OF PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE ON NYMPHAL
DEVELOPMENT AND ADULT REPRODUCTION OF *PIEZODORUS GUILDINII*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

MARIA S. ZERRINO¹, NORA A. ALTIER¹ AND ANTÓNIO R. PANIZZI²
¹INIA La Estanzuela, Ruta 50 km 11, CP 70000, Colonia, Uruguay

²EMBRAPA Trigo, Caixa Postal 451. 990012-970, Passo Fundo, RS, Brazil

*Corresponding author; E-mail: szebino@inia.org.uy

ABSTRACT

The effect of photoperiod and temperature on the biology of nymphs and adults of *Piezodorus guildinii* (Westwood) was studied in the laboratory. Four different conditions were tested (14:10, 12:12 and 10:14 h L:D at 25 °C, and 10:14 h L:D at 20 °C), at 80 ± 10% RH. The shortest nymph development time was recorded at 14:10 h L:D (25 °C) (21.5 days) and the longest at 10:14 h L:D (20 °C) (42 days). The highest nymph mortality rate was recorded at 10:14 h L:D (20 °C) and the lowest at 14:10 h L:D (25 °C) (84.5 vs. 24.2%). Newly emerged females reared at 14:10 h L:D (25 °C) were heavier than those of the remaining treatments. Fresh body weight gain (mg) occurred only during the 1st week of adult life. Adult survivorship was highest at 10:14 h L:D (20 °C) and lowest at 14:10 h L:D (25 °C). Total longevity was shortest when adults were held at 14:10 h L:D (25 °C) and longest at 10:14 h L:D (20 °C) (38.6 vs. 98.8 days). The maximum percentage of ovipositing females occurred at 14:10 h L:D (25 °C) and the minimum at 10:14 h L:D (20 °C). Females maintained at 14:10 h L:D (25 °C) and 12:12 h L:D (25 °C) produced similar and greater number of egg masses than females at 10:14 h L:D (25 °C) and 10:14 h L:D (20 °C). The number of eggs/female was the greatest at 14:10 h L:D (25 °C) and the lowest at 10:14 h L:D (20 °C) (196.2 vs. 21.7 eggs/♀). Egg viability was similar under different photophases at 25 °C, while significantly reduced at 10:14 h L:D (20 °C) (54 vs. 4.1%). The longest egg incubation period was recorded at 10:14 h L:D (20 °C) and the shortest at 14:10 h L:D (25 °C) (7 vs. 4.1 days). These laboratory results suggest that *P. guildinii* does not reproduce during the time its preferred host soybean is unavailable at latitude 30°-35° S, which corresponds approximately to the conditions tested at 10:14 h L:D (20 °C).

Key Words: *Piezodorus guildinii*, biology, photoperiod, temperature

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del fotoperiodo y la temperatura en la biología de ninfas y adultos de *Piezodorus guildinii* (Westwood). Fueron consideradas cuatro condiciones (14:10, 12:12, 10:14 h L:D a 25 °C, y 10:14 h L:D a 20 °C), manteniendo la humedad relativa a 80 ± 10%. El estado de ninfa tuvo una menor duración a 14:10 h L:D y 25 °C (21.5 días), mientras que la mayor duración se registró a 10:14 h L:D y 20 °C (42 días). La mayor y menor mortalidad de ninfas fue registrada en 10:14 h L:D a 20 °C y 14:10 h L:D a 25 °C (73.8 y 23.4% respectivamente). El peso promedio de las hembras adultas recién emergidas registrado en el tratamiento 14:10 h L:D a 25 °C fue significativamente superior a los correspondientes en los restantes tratamientos, los cuales fueron similares entre sí. No fueron detectadas diferencias en la ganancia de peso de los adultos. Los menores valores de longevidad de adultos se registraron a 14:10 h L:D a 25 °C, mientras que los mayores se registraron a 10:14 h L:D y 20 °C (38.6 vs. 98.8 días). El comportamiento reproductivo de las hembras varió con las condiciones evaluadas. El máximo porcentaje de oviposición se registró a 14:10 h L:D y 25 °C, y el mínimo a 10:14 h L:D y 20 °C (84.5 vs. 24.2%). El número de posturas sólo fue afectado por el fotoperiodo; las hembras criadas a 14:10 h L:D y 12:12 h L:D a 25 °C realizaron más posturas que en las condiciones de 10:14 h L:D a 25 y 20 °C. El número de huevos por hembra varió con el fotoperiodo y la temperatura; el mayor valor se registró a 14:10 h L:D y 25 °C y el menor a 10:14 h L:D y 20 °C (196.2 vs. 21.7 huevos/♀). El porcentaje de huevos eclosionados fue similar en los diferentes fotoperiodos a 25 °C, y significativamente superior al de 10:14 h L:D y 20 °C. El periodo de incubación fue más largo a 10:14 h L:D y 20 °C, y más corto a 14:10 h L:D y 25 °C (7 vs. 4.1 días). Los resultados obtenidos indican que *P. guildinii* no se reproduce en la entrefaja del cultivo de soja entre S 30°-35° de latitud, que se corresponde aproximadamente con las condiciones de 10:14 h L:D y 20 °C evaluadas en este estudio.

Palabras Clave: *Piezodorus guildinii*, biología, fotoperiodo, temperatura

Insects have developed various physiological adaptation strategies to survive adverse environments. Diapause is an important adaptive mechanism for dormancy during periods of unfavorable conditions (Tauber et al. 1986). The most conspicuous aspect of reproductive diapause in females is a halt in the process of oogenesis. Environmental factors, especially photoperiod and temperature, influence insect biology and behavior, and can be considered the main abiotic factors regulating diapause (Ali & Ewiess 1977; Ichimori et al. 1990). Temperature acts both in isolation and in conjunction with other cues. Thermoperiod fluctuates between years, which make it a less important seasonal indicator than photoperiod. However, temperature acts to modify or reinforce the effects of photoperiod (Leather et al. 1993).

Studies that associate photoperiod and temperature with reproductive diapause have been conducted with several species of pentatomids (Saulich & Musolin 2012). Albuquerque (1993) observed under laboratory conditions that diapause was induced in *Oebalus poecilus* (Dallas) under short days. Hodek & Hodková (1993) established that photoperiod is an important factor for the diapause regulation of *Dolycoris baccarum* (L.). Adults of *Aelia fieberi* (Scott) were induced to diapause under short photophases (Nakamura & Numata 1997). Mourão & Panizzi (2002) observed that *Euschistus heros* (F.) underwent reproductive diapause, induced by a photophase of 12 h or less. Chocorosqui & Panizzi (2003) determined that *Dichelops melacanthus* (Dallas) presented reproductive oligopause under laboratory conditions, induced by 11 and 12 h light and characterized by the occurrence of periodic feeding, even under typical winter photophases. *Nezara viridula* (L.) responds to photoperiod not only qualitatively (diapause versus reproduction), but also quantitatively: photophase duration results in a graded response in the beginning of copulation and oviposition (Musolin & Numata 2003).

Piezodorus guildinii (Westwood) (common names: Neotropical green stink bug and small green stink bug in South America; red-banded stink bug in the USA) is a Neotropical stink bug species ranging from Argentina to the southern United States (Panizzi & Slansky 1985a). It is an important pest of soybean in the Southern Cone of South America and the most abundant stink bug in Uruguay and Argentina, being more common than the cosmopolitan southern green stink bug, *N. viridula*. In this geographic region, *P. guildinii* causes the largest economical losses to soybean crops (Zerbino 2010). In the United States it has been reported since the early 1900's (Kirkaldy 1909), and since then it has been reported in several states including South Carolina, Florida, Georgia, and New Mexico (McPherson & McPherson 2000). Several authors had previously reported the red-banded stink bug on soybean in

the United States (references in Panizzi and Slansky 1985a; Panizzi & Slansky 1985b, c; McPherson et al. 1993), though it was not considered an economic pest. However, during the last decade it reached threshold levels and required insecticide sprays in southern Louisiana soybean crops (Baur & Baldwin 2006). More recently, it was considered a top soybean pest in southern USA (Kamminga et al. 2012). Feeding on a wide range of cultivated and non-cultivated plant hosts, with a particular fondness for legumes, the red-banded stink bug is capable of causing severe economic damage in soybean, alfalfa, and other bean crops (Panizzi & Slansky 1985a).

A considerable amount of work has been done on this species in Brazil (references in Panizzi et al. 2000, and in McPherson & McPherson 2000). Although several authors have studied its biology (Fraga & Ochoa 1972; Panizzi & Smith 1977; Panizzi et al. 1980; Costa & Link 1982; Panizzi & Slansky 1985a, b; Panizzi 1992; Cividanes & Parra 1994; Serra & La Porta 2001; Arroyo & Kamawura 2003; Massoni & Frana 2007), there is limited available information about the ecology of this insect. An understanding of the biotic and abiotic factors involved in the seasonality of this bug is essential to implement holistic and environmentally compatible soybean pest management programs. This laboratory study was carried out to evaluate the influence of photoperiod and temperature on nymph development, adult longevity, weight gain, and reproductive performance of *P. guildinii*.

MATERIAL AND METHODS

Insects, Origin and Routine Maintenance

Adults of *P. guildinii* were collected in 2011 at INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S 34° 20' W 57° 41'). They were taken to the laboratory and 20 pairs were placed in a clear plastic box (25 × 20 × 20 cm) to obtain eggs (Silva & Panizzi 2008). They were fed with green bean pods *Phaseolus vulgaris* (L.), dry soybean seeds *Glycine max* (L.) Merrill, and raw shelled peanuts *Arachis hypogaea* (L.). Insects were maintained at 25 ± 1 °C, 80 ± 10% RH, and 14 h photophase. Food was replaced on alternate days and distilled water was supplied every day by using moistened cotton in a plastic container (1.0 cm diameter). Egg masses were removed daily, mixed to avoid genetic effect, and divided into four groups in order to assign the treatments. To evaluate the effect of photoperiod and temperature on egg, nymph and adult biology, four different conditions (treatments) were tested: 14:10, 12:12, and 10:14 h L:D at 25 ± 1 °C, and 10:14 h L:D at 20 ± 1 °C. A photoperiod of 14:10 h L:D at 25 °C represents the approximate conditions recorded at the summer solstice, while a photoperiod of 10:14 h L:D at 20 °C represents

the approximate conditions recorded at the winter solstice at a range of latitude between 30° to 35° S.

Egg and Nymph Biology

Eggs were held in Petri dishes (9.0 × 1.5 cm) lined with moistened filter paper and maintained at the four conditions of photoperiod and temperature (treatments) described. Relative humidity was kept constant at 80 ± 10%. Chamber temperatures were monitored daily using HOBO® data loggers, model U23-001 (Onset Computer, Pocasset, Massachusetts) at 1h intervals. During the 1st instar, nymphs were maintained only with distilled water. On the first day of the 2nd stadium, nymphs from each treatment were individualized in plastic boxes (11.0 × 11.0 × 3.5 cm) lined with moistened filter paper. They were fed the same food as adults and distilled water was supplied as described above. Nymphs were maintained at the same conditions tested for the egg stage. Instar change and mortality were recorded daily. Upon emergence, adults were separated by sex and weighed on an electronic scale (OHAUS Pioneer™) (to the nearest 0.1 mg).

Egg and instar duration, total development time and nymph mortality were calculated for each treatment, and weight was measured at adult emergence. Treatments were set up in a completely randomized design. Each nymph that reached the adult stage was considered a replicate ($n > 30$). The experiment was repeated twice.

Adult Biology

Egg masses were obtained as described above, and maintained under the four conditions of photoperiod and temperature (treatments). Relative humidity was kept constant (80 ± 10%). Chamber temperatures were monitored every day using HOBO® data loggers, model U23-001 at 1 h intervals. During the 1st instar, nymphs were maintained only with distilled water. On the first day of the 2nd instar, groups of 10 nymphs were placed in a plastic box (11.0 × 11.0 × 3.5 cm) lined with filter paper. They were supplied with the food described above. Nymphs were reared under the same photoperiod as that of the egg stage. Food was renewed on alternate days and distilled water was supplied daily. At adult emergence, more than 30 pairs were formed for each treatment. Each pair was held in a plastic box lined with moistened filter paper, and fed the same food as nymphs. They were supplied distilled water on a daily basis and food was renewed on alternate days. Fresh body weight (mg) for both sexes was

taken at the moment of emergence and once a week thereafter until mortality, using an electronic scale (OHAUS Pioneer™) (to the nearest 0.1 mg). Males and females that died were not replaced.

The reproductive performance was evaluated using the following parameters: percentage of females ovipositing, preoviposition and oviposition period, number of egg masses/female, number of eggs/female, and egg viability. Survivorship and longevity of males and females were also evaluated. Treatments were set up in a completely randomized design, and each pair ($n > 30$) was considered a replicate. The experiment was replicated twice.

Statistical Analyses

Egg and instar duration and development time (in days) were analyzed with the generalized linear model with the Poisson distribution and logarithmic function (PROC GENMOD, SAS Institute, version 9.2), as they are discrete variables and an association between means and variance was detected. The percentages of nymph survivorship in each instar and the total mortality were analyzed using generalized linear model with distribution binomial (PROC GENMOD, SAS Institute, version 9.2). In both cases, results are presented as the likelihood ratio statistics of the Chi-square distribution.

Weight at adult emergence was analyzed with the general linear model (PROC GLM, SAS Institute, version 9.2), due to the fact that the variance was homogeneous and there was no association between means and variance. Means were compared using Tukey-Kramer honestly significant (HSD) test for significance ($P \leq 0.05$). The differences between male and female fresh body weight were compared using Student's *t*-test ($P \leq 0.05$).

Data of adult survivorship over the time of the four treatments were analyzed by simple linear regression. To comply with the assumptions of linear regression, the data were transformed to LN ($x + 1$). Slope coefficients were compared using Student's *t*-test ($P \leq 0.05$).

The percentage of females ovipositing was analyzed using generalized linear model with distribution binomial and the link function logit (PROC GENMOD, SAS Institute, version 9.2). The results are presented as the likelihood ratio statistics of the Chi-square distribution. Preoviposition and oviposition period, number of egg masses and eggs per female, and longevity were analyzed with the generalized linear model with the Poisson distribution and logarithmic function (PROC GENMOD, SAS Institute, version 9.2), as they are discrete variables and a strong association between means and variance was detected.

The results are presented as the likelihood ratio statistics of the Chi-square distribution.

Egg viability was analyzed with the general linear model (PROC GLM, SAS Institute, version 9.2), due to the fact that the variance was homogeneous and there was no association between means and variance. Means were compared using Tukey-Kramer honestly significant (HSD) test for significance ($P \leq 0.05$).

Data regarding change in fresh body weight were analyzed using the mixed model (Proc MIXED, SAS Institute, version 9.2), with initial body weight measured at day one as a covariate and the subsequent weights as repeated measures in the analysis. The covariance structure that fitted the data was ANTE (1). The model statement included the interaction term (gain*treat) to test for heterogeneity of slopes.

RESULTS AND DISCUSSION

Because results from the two experiments were similar, data were combined in the final statistical analyses.

Eggs

There was a highly significant effect ($\chi^2 = 23.39$; $df = 3$; $P < 0.0001$) of treatments on the incubation period. The results indicated that there was a negative correlation between photophase duration and temperature with the incubation period. Eggs held at 14:10 h L:D (25 °C) had the shortest incubation period (4.1 days), while those held at 10:14 h L:D (20 °C) had the longest (7.0 days) (Table 1). Mourão & Panizzi (2000) working with *E. heros*, at 25 °C and under different photoperiods observed that the incubation period was longer under short photophase (10 h) in comparison with long photophase (14 h). In turn, Ali & Ewies (1977) for *N. viridula* and Albuquerque (1993) for *O. poecilus* found no effect of the photoperiod on the incubation period of eggs. The results obtained in this study and those obtained by the aforementioned authors may indicate that the embryos of different species during egg incubation have different sensitivity to photoperiod. Moreover, the time required to hatch increased significantly when the temperature decreased from 25 to 20 °C under short photoperiod conditions (10:14 h L:D).

Cividanes & Parra (1994) reported that *P. guildinii* eggs hatched faster as temperature increased from 20 to 26 °C; however, they did not find differences within the range of 26 to 28 °C. Values obtained in this study under the longest photophase at 25 °C (4.1 days) were similar with those reported by Cividanes & Parra (1994) at 26 °C (4.2 days). The results obtained by these authors at 14 h L and 20 °C (9 days) were slightly higher

TABLE 1. MEAN (\pm SEM) DEVELOPMENT TIME, SURVIVORSHIP AND MORTALITY OF *PIEZODORUS GUILDINII* EGGS AND NYMPHS AT DIFFERENT PHOTOPERIODS AND TEMPERATURES UNDER LABORATORY CONDITIONS.

Conditions	Eggs	Stadium duration (days)					Total development time (1 st -5 th instars) (days)		% Total mortality
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	Female	Male	
10:14 L:D 20 °C	7.0 \pm 0.2 a ¹	4.6 \pm 0.2 a [149] ²	9.3 \pm 0.3 a [83]	8.7 \pm 0.5 a [64]	8.0 \pm 0.3 a [48]	11.7 \pm 0.4 a [39]	41.9 \pm 0.9 a	42.2 \pm 1.2 a	73.8 a
10:14 L:D 25 °C	5.8 \pm 0.1 b	3.4 \pm 0.1 b [75]	5.5 \pm 0.2 b [68]	4.8 \pm 0.2 b [57]	4.9 \pm 0.2 b [50]	6.3 \pm 0.2 b [37]	24.5 \pm 0.5 b	25.1 \pm 0.4 b	50.7 b
12:12 L:D 25 °C	5.4 \pm 0.1 b	2.8 \pm 0.1 b [55]	5.3 \pm 0.2 b [46]	4.6 \pm 0.2 b [41]	4.5 \pm 0.2 bc [37]	6.7 \pm 0.2 b [32]	24.5 \pm 0.5 b	23.9 \pm 0.4 bc	40.0 b
14:10 L:D 25 °C	4.1 \pm 0.1 c	3.1 \pm 0.2 b [47]	5.3 \pm 0.4 b [44]	4.7 \pm 0.5 b [42]	3.7 \pm 0.3 c [39]	5.1 \pm 0.4 c [36]	21.2 \pm 0.8 b	22.0 \pm 0.5 c	23.4 c

¹Means in each column followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

²Number of nymphs that complete each instar is given in brackets.

than the corresponding results of this study at 10 h L and 20 °C (7 days). This difference could be attributed to the fact that the bugs of both studies were collected from two regions with different climatic regimes, subtropical and temperate (23° 18' and 34° 20' S, respectively). The temperature threshold for development and/or the degree day required to complete development may vary with the latitude as result of local adaptation to climatic conditions (Stacey & Fellowes 2002). Species with a lower threshold temperature for development have a greater rate of development at low temperatures (Trudgill et al. 2005). As in this study, several authors working with different species of pentatomids, found that when temperature decreased egg development time increased. Ali & Ewies (1977) for *N. viridula* found that the incubation period was significantly longer at 20 °C than at 25 °C, under short photophase (10 h). Chocorosqui & Panizzi (2002) reported that no nymphs of *D. melacanthus* hatched when eggs were incubated at a temperature lower than 20 °C under long photophase (14 h).

Nymphs

Nymph Survivorship and Total Mortality. There were significant effects of the treatments on nymph survivorship between 2nd-4th instars (2nd $\chi^2 = 51.25$, $df = 3$; $P < 0.0001$, 3rd $\chi^2 = 9.3$; $df = 3$; $P = 0.0256$, 4th $\chi^2 = 9.25$; $df = 3$; $P = 0.0261$), whereas for the 5th instar there was not ($\chi^2 = 4.61$; $df = 3$; $P = 0.2027$). The greatest differences in nymph survivorship among treatments occurred in the 2nd instar, with the temperature decrease under short photophase having a more conspicuous negative effect on survivorship than the decrease in photophase at 25 °C (Fig. 1). According to the likelihood ratio statistics of the Chi-square

distribution, the lowest value of nymph survivorship was obtained under the photoperiod of 10:14 h L:D (20 °C) (55.7%), whereas in the other treatments nymph survivorship, which varied from 83.6 to 93.6% (Fig. 1). During the 3rd to 5th instars under 10:14 h L:D (20 °C), nymph survivorship was greater than that recorded for the 2nd instar. For the rest of the treatments nymph survivorship for instars 3rd to 5th was similar to that of the 2nd instar. Results obtained suggest that the 2nd instar is very sensitive to the decrease of temperature under short photophase. Panizzi & Smith (1977) also recorded high mortality in 2nd instar, but they explained that the high mortality appeared to be caused by nymphs falling onto their back and being unable to right themselves. *Dichelops melacanthus* showed the same sensibility when was reared under long photoperiod and 20 °C (Chocorosqui & Panizzi 2002). In the 3rd and 4th instars the nymph survivorships recorded under short photophase (10 h) at 20 °C were lower than those recorded under long photophase (14 h) at 25 °C (Fig. 1).

Total nymph mortality (instars 2-5) was affected by photoperiod and temperature ($\chi^2 = 46.99$; $df = 3$; $P < 0.0001$) (Table 1). Total nymph mortality increased when photophase decreased at 25 °C; the value recorded at 14:10 h L:D (23.4%) was lower than those recorded at 12:12 and 10:14 h L:D (40 and 50.7%, respectively), which were similar. However, differences between treatments under the short photophase (10 h) at different temperatures were greater; when temperature decreased from 25 to 20 °C, total nymph mortality increased significantly from 50.7 to 73.8%. (Table 1). Cividanes & Parra (1994) did not find differences in nymph mortality of *P. guildinii* when reared at 25 °C and 20 °C under long photoperiod conditions (14:10 h L:D). These results suggest that nymphs of this insect have low adaptability to temperatures below 20 °C under short photophase. Therefore, in temperate regions, nymphs are unlikely to survive during mid-autumn and winter. Similar results were obtained by Ali & Ewies (1977), who established that photoperiod did not exert a conspicuous effect on the mortality of nymphs of *N. viridula* at the same temperature, and that the nymph mortality at 20 °C was higher than at 25 °C.

Other species of pentatomids also showed variation in total nymph mortality induced by the length of the photophase. Mourão & Panizzi (2000) for *E. heros* observed higher mortality under short photophase in comparison to long photophase (56.7 vs. 28.3%). Chocorosqui & Panizzi (2003) for *D. melacanthus* recorded the highest total nymph mortality (60%) under short photophase at 25 °C. They also found almost 100% mortality when nymphs were reared at 20 °C under long photophase (Chocorosqui & Panizzi 2002).

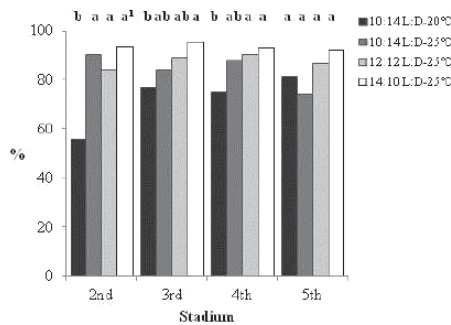


Fig. 1. Survivorship of *Piezodorus guildinii* nymphs at different instars under variable conditions of light and temperature regimes in the laboratory. Means in each instar followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

Nymph Development Time. There were highly significant effects of treatments on nymph development time (1st instar $\chi^2 = 18.33$; $df = 3$; $P = 0.0004$) (2nd $\chi^2 = 66.70$, 3rd $\chi^2 = 66.49$, 4th $\chi^2 = 58.57$, and 5th $\chi^2 = 115.97$; $df = 3$; $P < 0.0001$). During the first three instars, no differences were recorded in the development rate under different photoperiod at 25 °C. The length of photophase only affected development of 4th and 5th instars, which were completed faster under long photophase. Similar results were obtained by Chocorosqui & Panizzi (2002) for *D. melacanthus*. In contrast, Mourão & Panizzi (2000) reported that 2nd and 3rd instar nymphs of *E. heros* exposed to short photophase needed more time to complete their development.

For both genders, the mean number of days to complete the nymphal stage varied with the environmental conditions used (females $\chi^2 = 156.24$, males $\chi^2 = 155.34$; $df = 3$; $P < 0.0001$) (Table 1). The decrease of photophase did not exert an important effect in total nymph development time, for the three photoperiods at 25 °C; total development time of females was similar and shorter than that recorded at 10:14 h L:D (20 °C). For males total nymph development time at 25 °C was shorter at 14:10 h L:D than at 10:14 h L:D (Table 1). Albuquerque (1993) reported that the length of photophase at 25 °C did not significantly affect the nymph development time of *O. poecilus*. In contrast, nymph development time of *N. viridula*, *E. heros* and *D. melacanthus* was reduced significantly when photophase increased (Ali & Ewies 1977; Mourão & Panizzi 2000; Chocorosqui & Panizzi 2003). The differences found by different authors on the effect of photoperiod on nymph development of different species of pentatomids indicate that sensitivity to day length is variable and may appear at different stages of development (Saulich & Musolin 2012). This illustrates the importance of performing studies locally in order to determine the influence of the abiotic factors on the insect biology and behavior (Ali & Ewies 1977).

The decrease in temperature significantly increased the effect of the short photophase on nymph development time (Table 1). Both genders reared at 10:14 h L:D required 40% more time to complete the nymphal stage at 20 °C than at 25 °C. The values of the total nymph development time determined by Cividanes & Parra (1994) for *P. guildinii* reared at 14:10 h L:D (26 °C) (20.2 days) and 20 °C (44.2 days) were similar to those obtained in this study for 14:10 h L:D (25 °C) (21.2 days) and 10:14 h L:D (20 °C) (41.9 days). This similarity may suggest that the temperature exerts a more conspicuous effect than photoperiod in total nymph development time.

Chocorosqui & Panizzi (2003) also detected effects of temperature on the nymph development time of *D. melacanthus*, stating that values

tended to be longer when temperature decreased and no nymphs developed when temperature was lower than 20 °C. Ali & Ewies (1977), working with a range of temperature between 20 and 30 °C, determined that the rate of nymph development time of *N. viridula* decreased as the temperature increased.

Fresh Body Weight at Adult Emergence. The fresh body weight of females varied with the conditions tested ($F_{3,151} = 10.43$; $P < 0.0001$). Photoperiod affected fresh body weight of newly emerged females. They were heaviest when reared under long photophase (14 h) (25 °C), probably because nymphs reared under these conditions fed more than those that developed under short photophase (Table 2). The fresh body weight of males was not affected by photoperiod or temperature ($F_{3,143} = 2.2$; $P = 0.0908$). Females were heavier than males in all conditions tested (Table 2).

Ali & Ewies (1977) did not find great variation in body weight for newly emerged *N. viridula* when nymphs were reared under different photoperiods, but they reported that adults were heavier at 20 °C than at 25 °C. Other authors studying other species of pentatomids obtained different results. Mourão & Panizzi (2000) for *E. heros*, and Chocorosqui & Panizzi (2003) for *D. melacanthus* established that the weight of females tended to be higher with long photophase, although no statistically significant differences were recorded.

Adults

Adult Survivorship and Longevity. Adult survivorship gradually decreased over time in all treatments. The effects of the treatments were different on both genders (Fig. 2). The decrease of survivorship of females under different photoperiods at 25 °C was similar and higher than the decrease recorded under short photophase (10 h) (20 °C) (Table 3). In contrast, the decrease of survivorship of males was affected by photoperiod and temperature. The slope obtained under long

TABLE 2. MEAN (\pm SEM) FRESH BODY WEIGHT AT ADULT EMERGENCE OF *PIEZODORUS GUILDINII* AT DIFFERENT PHOTOPERIODS AND TEMPERATURES UNDER LABORATORY CONDITIONS.

Conditions	Fresh body weight (mg)	
	Female	Male
10:14 L:D 20 °C	49.84 \pm 0.69 bA ¹	43.71 \pm 0.54 aB
10:14 L:D 25 °C	51.55 \pm 1.07 bA	45.34 \pm 0.96 aB
12:12 L:D 25 °C	49.93 \pm 0.72 bA	46.37 \pm 0.66 aB
14:10 L:D 25 °C	56.70 \pm 1.37 aA	46.68 \pm 1.68 aB

¹Means followed by the same lowercase letters in each column and uppercase letters in each row do not differ significantly ($P < 0.05$) using Tukey's test and t test, respectively.

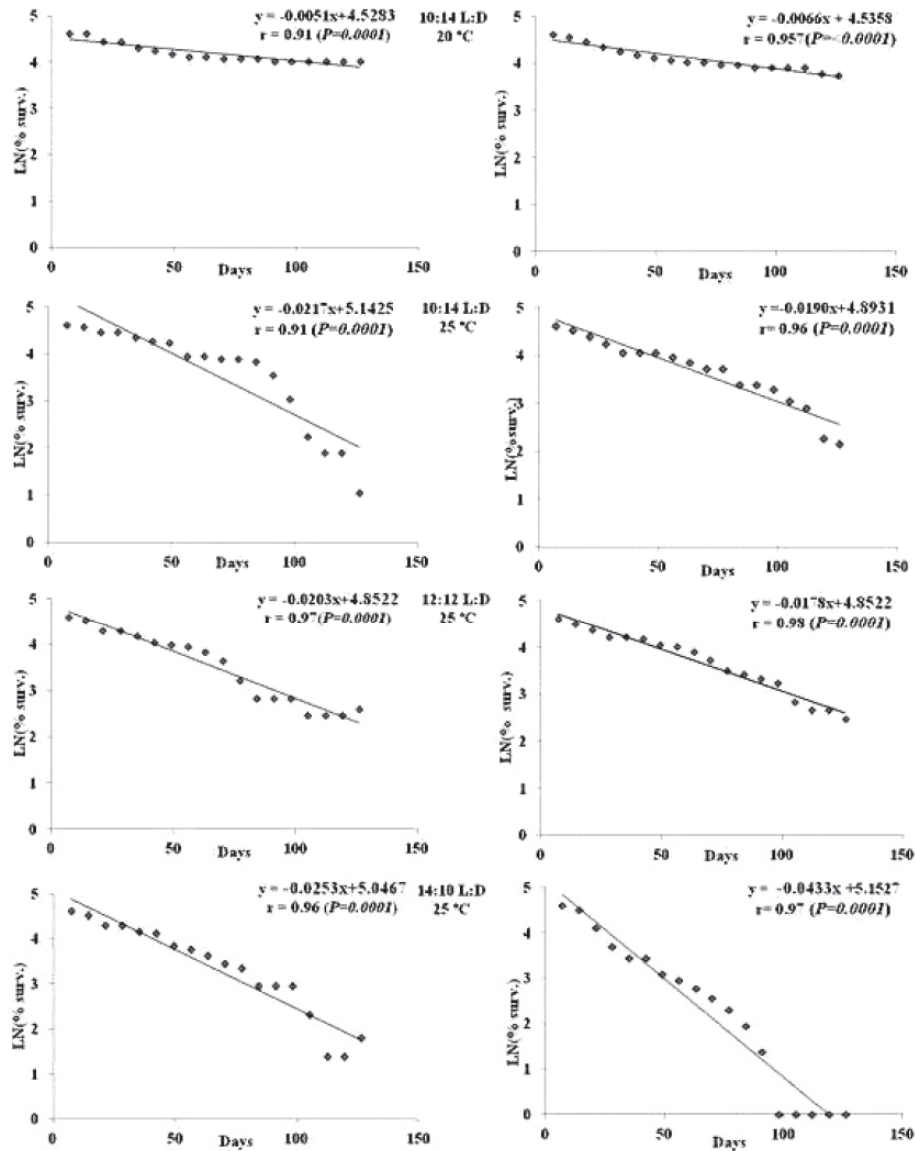


Fig. 2. Survivorship up to 126 days of adult *Piezodorus guildinii*, expressed as logarithm (LN) (%+1). Females right figures; males left figures.

photophase (14 h) (25 °C) was higher than those obtained at 12 h and 10 h (25 °C), whereas under short photophase (10 h) the decrease of survivorship was higher at 25 °C than at 20 °C (Table 3).

Total mean longevity was affected by the photoperiod and the temperature, with a similar response for both genders (females $\chi^2 = 21.73$, males $\chi^2 = 29.69$; $df = 3$; $P < 0.0001$) (Table 3). Adults

TABLE 3. SLOPE (b) OF DE SIMPLE LINEAR REGRESSION OF SURVIVORSHIP AND MEAN (\pm SEM) LONGEVITY OF *PIEZODORUS GUILDINII* ADULTS AT DIFFERENT PHOTOPERIODS AND TEMPERATURES UNDER LABORATORY CONDITIONS.

Conditions	b LN (% Survivorship+1) ¹		Longevity (days) ²	
	Female	Male	Female	Male
10:14 L:D 20 °C	0.0051 \pm 0.0012 b	0.0067 \pm 0.0010 c	107.4 \pm 12.9 a [33] ³	94.1 \pm 11.9 a [33]
10:14 L:D 25 °C	0.0217 \pm 0.0049 a	0.0190 \pm 0.0032 b	62.8 \pm 6.13 b [33]	63.4 \pm 7.1 b [35]
12:12 L:D 25 °C	0.0203 \pm 0.0022 a	0.0178 \pm 0.0017 b	50.8 \pm 5.7 bc [37]	60.3 \pm 6.3 b [37]
14:10 L:D 25 °C	0.0253 \pm 0.0037 a	0.0433 \pm 0.0053 a	46.1 \pm 5.4 c [32]	31.2 \pm 3.8 c [32]

¹Slopes in each column followed by the same letters are not significantly different at $P < 0.05$ based on t test.

²Means in each column followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

³Number of adults in brackets.

lived longer under short photoperiod conditions (10:14 h L:D) (20 °C) (females = 107.0 days; males 94.1 days); rather, adults reared with long photoperiod (14:10 h L:D) (25 °C) had the shortest lifespan (females = 46.1 days; males = 31.2 days) (Table 3). When adults of *P. guildinii* were reared in greenhouse in summer and winter in Curitiba - Brazil, Panizzi & Smith (1977) reported similar values of total longevity to those obtained in this study. Females held under summer and winter conditions lived 41.2 and 96.6 days, respectively; while males lived 34.0 and 112.5 days, respectively. In contrast, Cividanes & Parra (1994) found that under long photophase (14 h) the longevity of adults of *P. guildinii* at 20 °C was less than at 26 °C. The results obtained for longevity in this study and those reported by Panizzi & Smith (1977) and Cividanes & Parra (1994) may likely suggest the occurrence of an interaction in the response of this variable to both, photoperiod and temperature. The greater longevity under winter conditions (shorter photoperiod and lower temperature) may be due to a decrease in neuro-hormonally mediated metabolic activity (Tauber et al. 1986). Particularly, females spend less reserve in egg production by decreasing their reproductive activity (Slansky & Panizzi 1987).

Adult Reproduction. Photoperiod and temperature affected the percentage of ovipositing females ($\chi^2 = 27.19$; $df = 3$; $P < 0.0001$) (Table 4). Temperature decrease had a more conspicuous negative effect on the percentage of ovipositing females than the decrease in photophase at 25 °C. The maximum value was obtained at 14:10 h L:D (25 °C) (84.5%), and the minimum at 10:14 h L:D (20 °C) (24.2%). Similar values were recorded at 12:12 h L:D (25 °C) (61.5%) and 10:14 h L:D (25 °C) (62.1%), which were different from the other two treatments. Cividanes & Parra (1994) evaluating the percentage of ovipositing *P. guildinii* females under long photophase (14 h) at 20 °C, reported similar values (24%) than those obtained in this work under the same temperature and short photophase (10 h). These results suggest that the temperature has a more important

role than photoperiod on percentage of females ovipositing.

Photoperiod and temperature affected the reproductive performance of females (Table 4). There were highly significant effects of treatments for preoviposition period, egg masses and number of eggs/female ($\chi^2 = 62.86$; $\chi^2 = 60.58$; $\chi^2 = 29.92$; $df = 3$; $P < 0.0001$), and viability ($F_{3,77} = 14.99$; $P < 0.001$) (Table 4).

The preoviposition period was affected by photophase and temperature, the effect of temperature being greater under short photophase (Table 4). Minimum preoviposition values occurred when females were maintained at 14:10 h L:D (25 °C) (8.0 days), and the maximum value was obtained at 10:14 h L:D (20 °C) (50.1 days). No differences were recorded for female preoviposition period at 25 °C under 12:12 h L:D (11.3 days) and 10:14 h L:D (14.5 days) (Table 4).

Cividanes & Parra (1994) determined that the preoviposition period for *P. guildinii* females under long photophase (14 h) was longer at 20 °C (47 days) than at 26 °C (13 days). Hodek & Hodková (1993) for *D. baccarum* reported longer preoviposition period for bugs reared at shorter photophase. Musolin & Numata (2003) established that photoperiod had more pronounced effects on the preoviposition period at 20 °C.

Photoperiod and temperature had different effects on the egg masses and number of eggs/female. The number of egg masses was affected only by photoperiod. Females maintained under 14:10 h L:D (25 °C) and 12:12 h L:D (25 °C) produced a similar and greater number of egg masses (8.8 and 6.9, respectively) than females reared under 10:14 h L:D (25 and 20 °C), (3.6 and 3.1 egg masses, respectively) (Table 4). All treatments had a significantly different number of eggs/female, with the greatest value corresponding to 14:10 h L:D (25 °C) (196.2), and the lowest recorded under 10:14 h L:D (20 °C) (21.7) (Table 4). Cividanes & Parra (1994) observed under long photophase that temperature affected the number of eggs/female of *P. guildinii*, with means values significantly higher at 26 °C (310 eggs/female) than at 20 °C (28 eggs/female).

TABLE 4. REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF FEMALE *PIEZODORUS GUILDINII* AT DIFFERENT PHOTOPERIODS AND TEMPERATURES UNDER LABORATORY CONDITIONS.

Conditions	Females ovipositing (%)	Preoviposition period (days)	Number/female		Egg hatchability (%)
			Egg masses	Eggs	
10:14 L:D 20 °C	24.2 c [33] ^a	50.1 ± 22.0 a ¹ [8]	3.1 ± 1.0 b [7]	21.7 ± 5.0 d [7]	4.1 ± 4.5 b ² [7]
10:14 L:D 25 °C	62.1 b [30]	14.5 ± 2.2 b [16]	3.6 ± 0.6 b [16]	48.2 ± 7.9 c [16]	54.6 ± 9.1 a [19]
12:12 L:D 25 °C	61.5 b [39]	11.3 ± 1.4 b [19]	6.9 ± 0.9 a [25]	106.3 ± 29.5 b [22]	43.6 ± 5.3 a [24]
14:10 L:D 25 °C	84.5 a [33]	8.0 ± 0.4 c [26]	8.8 ± 1.4 a [27]	196.2 ± 34.7 a [27]	64.2 ± 3.7 a [27]

¹Means in each column followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

²Means followed by the same letters do not differ significantly ($P < 0.05$) using Tukey's test.

³Number of females in brackets.

Chocorosqui & Panizzi (2003) reported that females of *D. melacanthus* reared under long photoperiods (14:10 and 13:11 h L:D) had a better reproductive performance, high percentage of females ovipositing, more number of eggs masses and number of eggs, in comparison to females under short photoperiods (12:12 and 10:14 h L:D). Similar results were obtained by Mourão & Panizzi (2002), studying the biology of *E. heros*; they indicated that females reared under 10:14 h L:D produced infertile eggs. For another pentatomid, *D. baccarum*, Hodek & Hodková (1993) reported greater fecundity for bugs reared at longer than those reared at shorter photophase. However, Ali & Ewiess (1977) did not observe significant differences in the reproductive parameters of *N. viridula* at different photoperiods (10:14 h L:D and 14:10 h L:D).

Egg viability was not significantly affected by different photoperiod conditions at 25°C. However, under 10 h of photophase, it decreased significantly when temperature decreased from 25 °C to 20 °C (Table 4). On the other hand, under long photophase (14 h), Cividanes & Parra (1994) did not find an effect on egg viability of *P. guildinii* when temperatures decrease from 26 °C to 20 °C. The results of this study and those obtained by Cividanes & Parra (1994) may likely suggest the occurrence of an interaction in the response of egg viability with photoperiod and temperature.

Adult Body Weight Gain. Both males and females of *P. guildinii* gained weight during their first week of adult life (Fig. 3 A, B). However, changes in fresh body weight thereafter were similar for all tested conditions (interaction gain weight*treatment $F_{3, 949} = 1.48$; $P = 0.2180$). Females gained significantly more weight than males. Chocorosqui & Panizzi (2003) reported no significant differences in weight gain/ week for both sexes of *D. melacanthus* under different photoperiods at 25 °C, during a 4-wk evaluation period.

CONCLUSIONS

Results obtained in this study indicate that photoperiod and temperature had different effects

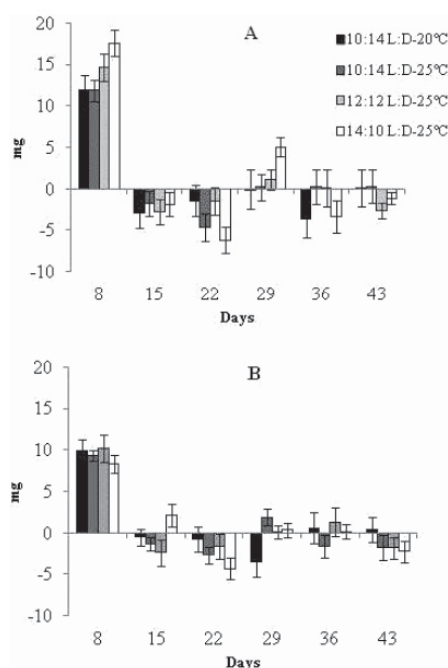


Fig. 3. Mean (+SEM) percentage change of fresh body weight during the first six weeks of adult life of *Piezodorus guildinii*. A) females; B) males.

on the several variables evaluated. Differences, particularly for reproductive performance of females, demonstrate the importance and the role of temperature and photoperiod as environmental factors regulating the development and seasonality of *P. guildinii*. These laboratory results suggest that, in the geographic region between 30°-35° S latitude this insect may hibernate as

an adult and may not perform reproductive activity from mid-fall to mid-spring, when it preferred host soybean is unavailable, which corresponds approximately to the conditions tested at 10:14 h L:D and 20 °C.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Paula Mitchel and Silvia Pereyra for their critical reading of the manuscript. This research is part of a project sponsored by the National Research Council of Brazil (CNPq) in collaboration with INIA of Uruguay. We also thank Mabel Pessio and Eduardo García for their support working in the laboratory.

REFERENCES CITED

- ALBUQUERQUE, G. S. 1993. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. *Crop Prot.* 12: 627-630.
- ALI, M., AND EWIESS, M. A. 1977. Photoperiodic and temperature effects on rate of development and diapause in the green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). *Z. Ang. Entomol.* 84: 256-264.
- ARROYO, L., AND KAMAWURA, N. 2003. Biología y ecología de *Piezodorus guildinii* Westwood en soya. *Art. Invest. Centr. Tecnol. Agropec. Bolivia* 2: 3-6.
- BAUR, M. E., AND BALDWIN, J. 2006. Red banded stink bug trouble in Louisiana. *Louisiana Agric.* 49: 9-10.
- CHOCOROSQUI, V. R., AND PANIZZI, A. R. 2002. Influência da temperatura na biologia de ninfas de *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Semina* 23: 62-65.
- CHOCOROSQUI, V. R., AND PANIZZI, A. R. 2003. Photoperiodic influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian J. Biol.* 63: 655-664.
- CIVIDANES, F. G., AND PARRA, J. R. P. 1994. Biología em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. III. *Piezodorus guildinii* (West., 1837) (Heteroptera: Pentatomidae). *Científica* 22: 177-186.
- COSTA, E. C., AND LINK, D. 1982. Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. *Rev. Centr. Cien. Rur.* 12: 51-57.
- FRAGA, C. P., AND OCHOA, L. H. 1972. Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). *IDIA-Supl.* 28: 103-117.
- HODEK, I., AND HODKOVÁ, M. 1993. Role of temperature and photoperiod in diapause regulation in Czech populations of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *European J. Entomol.* 90: 95-98.
- ICHIMORI, J. W., OHTOMO, R., SUZUKI, K., AND KURIHARA, M. 1990. Specific protein related to adult diapause in the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea*. *J. Insect Physiol.* 36: 85-91.
- KAMMINGA, K. L., DAVIS, J. A., STOCK, S. P., AND RICHTER, A. R. 2012. First report of a mermithid nematode infecting *Piezodorus guildinii* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) in the United States. *Florida Entomol.* 95: 214-217.
- KIRKALDY, G. W. 1909. *Catalogue of the Hemiptera* (Heteroptera). Volume I. Cimicidae, Berlin, Felix L. Dames, 392p.
- LEATHER, S. R., WALTERS, K. F. A., AND BALE, J. S. 1993. *The ecology of insect overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 255 pp.
- MASSONI, F., AND 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 INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2007. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea N° 108 p. 153-161.
- MCPHERSON, R. M., DOUCE, G. K., AND HUDSON, R. D. 1993. Annual variation in stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) seasonal abundance and species composition in Georgia soybean and its impact on yield and quality. *J. Entomol. Sci.* 28: 61-72.
- MCPHERSON, J. E., AND MCPHERSON, R. M. 2000. *Piezodorus guildinii* (Westwood), pp. 177-179 In J. E. McPherson and R. M. McPherson [eds.], *Stink Bugs of Economic Importance in America North of Mexico*, CRC Press, Florida, USA. 253 pp.
- MOURÃO, A. P. M., AND PANIZZI, A. R. 2000. Estágios ninfaís fotossensíveis à indução da diapausa em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 219-225.
- MOURÃO, A. P. M., AND PANIZZI, A. R. 2002. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1788) (Hemiptera: Pentatomidae). *Brazilian J. Biol.* 62: 231-238.
- MUSOLIN, D. L., AND NUMATA, H. 2003. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and colour change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiol. Entomol.* 28: 65-74.
- NAKAMURA, K., AND NUMATA, H. 1997. Seasonal life cycle of *Aelia fieberii* (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to the phenology of its host plants. *Ann. Entomol. Soc. America* 90: 625-630.
- PANIZZI, A. R. 1992. Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of *Indigofera* legumes. *Entomol. Exp. Appl.* 63: 221-228.
- PANIZZI, A. R., MCPHERSON, J. E., JAMES, D. G., JAVAHERY, M. AND MCPHERSON, R. M. 2000. Economic importance of stink bugs (Pentatomidae), pp. 421-474. In Schaefer, C. W. & Panizzi, A. R. [eds.], *Heteroptera of Economic Importance*, CRC Press, Boca Raton, FL., USA. 828 pp.
- PANIZZI, A. R., GALILEO, M. H., GASTAL, H. A. O., TOLEDO, J. F. F., AND WILD, C. H. 1980. Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybeans. *Environ. Entomol.* 9: 293-297.
- PANIZZI, A. R., AND SLANSKY, F. JR. 1985a. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomol.* 68: 184-214.
- PANIZZI, A. R., AND SLANSKY, F. JR. 1985b. New host plant records for the stink bug *Piezodorus guildinii* in Florida (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomol.* 68: 215216.
- PANIZZI, A. R., AND SLANSKY, F. JR. 1985c. *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) an unusual host of the tachinid *Trichopoda pennipes*. *Florida Entomol.* 68: 485486.
- PANIZZI, A. R., AND SMITH, J. G. 1977. Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex-ratio, and longevity. *Ann. Entomol. Soc. America* 70: 35-39.
- SAS INSTITUTE. 2008. *SAS user's guide*, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.

- SAULICH, A. KH., AND MUSOLIN, D. L. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomol. Rev.* 92:1-26.
- SERRA, G. V., AND LA PORTA, N. C. 2001. Aspectos biológicos y reproductivos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pentatomidae) en condiciones de laboratorio. *Agriscientia* XVIII: 51-57.
- SILVA, F. A. C., AND PANIZZI, A. R. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Rev. Brasil. Entomol.* 52: 131-134.
- SLANSKY, F. JR, AND PANIZZI, A. R. 1987. Nutritional ecology of seed-sucking insects, pp. 283-320 *In* F. Slansky Jr and J. G. Rodriguez [eds.], *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates*, J. Wiley, New York, USA. 1016 pp.
- STACEY, D. A., AND FELLOWES, D. E. 2002. Temperature and the development rates of thrips: evidence for a constraint on local adaptation? *European J. Entomol.* 99: 399-404.
- TAUBER, M. J., TAUBER, C. A., AND MASAKI, S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, New York, USA. 411 pp.
- TRUDGILL, D. L., HONER, A., LI, D., AND VAN STRAALEN, N. M. 2005. Thermal time - concepts and utility. *J. App. Biol.* 146:1-14.
- ZERBINO, M. S. 2010. Manejo de chinches en soja. *Revista INIA* 23:24-27.

Copyright of Florida Entomologist is the property of Florida Entomological Society and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

PHENOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN ADULT *PIEZODORUS GUILDINII* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) DUE TO VARIATION IN PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE

MARIA S. ZERBINO¹, NORA A. ALTIER¹ AND ANTÓNIO R. PANIZZI²
¹INIA La Estanzuela. Ruta 50 km 11, CP 70000, Colonia, Uruguay

²EMBRAPA Trigo. Caixa Postal 451. 990012-970, Passo Fundo, RS, Brazil

*Corresponding author; E-mail: szerbino@inia.org.uy

ABSTRACT

The effect of photoperiod and temperature on *Piezodorus guildinii* (Westwood) adult body morphometry, color, lipid content, development of reproductive organs, and feeding activity at different ages was studied in the laboratory. Three different conditions were tested, each at $80 \pm 10\%$ RH: 14:10 h L:D at 25 °C, 10:14 h L:D at 25 °C, and 10:14 h L:D at 20 °C. Adults at 25 °C under 14 h photophase were larger and exhibited lower lipid content than those held at 20 °C under 10 h photophase. Highest percentages of females with clear pronotum band and connexivum were recorded at 10 h photophase regardless of the temperature. Development of the ovary was affected by both photoperiod and temperature. At 15, 30 and 45 days of age under 14 h photophase at 25 °C, the percentage of females with immature ovaries remained constant at 0%; in contrast, at 10 h (20 °C) this percentage declined from 60 to 33%. Testes size was affected by photoperiod and temperature; males at 14 h (25 °C) and at 10 h (20 °C) showed the largest and the smallest testes, respectively. The ectodermal sac condition was affected starting with males 15 days of age; the percentage of males with an expanded ectodermal sac was greater under the 14 h (25 °C) treatment than under the 10 h (20 °C) treatment. Feeding activity of adults under short photophase conditions (10 h) decreased. These laboratory results indicate that adults of *P. guildinii* maintained under a short (10 h) photophase at 20 °C enter into reproductive diapause, accumulate energetic reserves (lipids), show undeveloped reproductive structures and smaller size, clear coloration of the pronotum band and connexivum, and less feeding activity.

Key Words: *Piezodorus guildinii*, diapause, feeding activity, photoperiod, temperature

RESUMEN

El objetivo de este estudio de laboratorio fue evaluar el efecto del fotoperiodo y la temperatura en: la morfometría, el color del cuerpo, contenido de lípidos, desarrollo de los órganos reproductivos y la actividad alimentaria de *Piezodorus guildinii* (Westwood). Fueron evaluadas tres condiciones diferentes (14:10 y 10:14 h L:O a 25 °C, y 10:14 h L:O a 20 °C), a $80 \pm 10\%$ HR. Los adultos en 14 h de fotofase (25 °C), fueron más grandes y tuvieron menor contenido de lípidos que en 10 h (20 °C). La mayor proporción de hembras con banda del pronoto y conectivo claro fue registrada en 10 h de fotofase (20 y 25 °C). La condición del ovario fue afectada por el fotoperiodo y la temperatura. A los 15, 30 y 45 días de edad, en 14 h de fotofase (25 °C), 0% de las hembras exhibió el ovario inmaduro; por el contrario en 10 h (20 °C), durante ese período el porcentaje de hembras con ovario inmaduro disminuyó de 60 a 33%. El fotoperiodo y la temperatura afectaron el tamaño de los testículos; siendo mayor y menor a 14 h (25 °C) y a 10 h (20 °C), respectivamente. La condición del saco ectodérmico fue afectada a partir de los 15 días de edad; la proporción de machos con saco ectodérmico expandido fue mayor a 14 h (25 °C) que a 10 h (20 °C). La actividad alimentaria de los adultos disminuyó en condiciones de fotofase corta (10 h). Los resultados obtenidos indican que los adultos de *P. guildinii* en condiciones de 10 h de fotofase y 20 °C ingresan en diapausa reproductiva, acumulan reservas energéticas (lípidos), tienen estructuras reproductivas inmaduras, cuerpo más pequeño, banda del pronoto y conectivo de coloración clara, y actividad alimentaria menor.

Palabras Clave: *Piezodorus guildinii*, diapausa, actividad alimentaria, fotoperiodo, temperatura

Piezodorus guildinii (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) (common names: Neotropical green stink bug and small green stink bug in South America, and red-banded stink bug in the USA) is a Neotropical stink bug species that ranges from Argentina to the southern United States (Panizzi & Slansky 1985). It is an important pest of soybean in the Southern Cone of South America. It is the most abundant stink bug in Uruguay and Argentina, causing the largest economic loss in soybean (Zerbino 2010). It is an economically important pest of soybean production in the southern United States (Baur & Baldwin 2006; Kamminga et al. 2012).

Current knowledge about the ecology of *P. guildinii* is limited. Some information is available on the effect of photoperiod and temperature on nymph and adult biology (Zerbino et al. 2013). Recently, Saulich & Musolin (2012) reviewed winter diapause in the seasonal cycle of stink bugs from the temperate zone. However, for Neotropical stink bug species, little is known about their ability to enter reproductive diapause and pass through adverse environmental periods.

The great majority of stink bugs enter diapause during the winter as adults (Saulich & Musolin 2012). Accumulation of energetic reserves, undeveloped reproductive structures, and changes in size, shape and coloration body, are among the most conspicuous alterations that occur among pentatomids during winter diapause (McPherson 1974; Ali & Ewiess 1977; Ito 1985; Albuquerque 1993; Hodek & Hodková 1993; Kobayashi & Numata 1995; Nakamura & Numata 1997; Musolin & Numata 2003; Mourão & Panizzi 2002; Chocorosqui & Panizzi 2003; Niva & Takeda 2003). In climates with moderate winters, adults of some heteropterans continue feeding (Shearer & Jones 1996; Mourão & Panizzi 2002; Chocorosqui & Panizzi 2003; Saulich & Musolin 2012).

Environmental factors, especially photoperiod and temperature, are the main abiotic factors regulating diapause (Ali & Ewiess 1977; Ichimori et al. 1990). Studies with different species of pentatomids that evaluated the effect of photoperiod on reproductive diapause, showed that it is induced by a 12-hour or less photophase (Ali & Ewiess 1977; Albuquerque 1993; Hodek & Hodková 1993; Kobayashi & Numata 1995; Nakamura & Numata 1997; Musolin & Numata 2003; Mourão & Panizzi 2002; Chocorosqui & Panizzi 2003; Niva & Takeda 2003). In some species, the photoperiodic response of diapause induction within a range of temperatures is thermostable (Musolin & Numata 2003); however, in other species temperature also plays a role in triggering diapause, modifying the photoperiodic effect (Numata et al. 1993; Hodek & Hodková 1993; Kobayashi & Numata 1995; Niva & Takeda 2003; Saulich & Musolin 2012). The main function of temperature is to shape the optimal timing of diapause during

the season. In warm years winter diapause shifts to later dates, whereas in cold years an earlier induction of diapause takes place. The interaction of photoperiod and temperature creates a reliable ecological mechanism to regulate the timely onset of diapause (Saulich & Musolin 2012).

In this laboratory study we evaluated the influence of photoperiod and temperature on phenological and physiological changes, and on the feeding activity, of *P. guildinii*.

MATERIAL AND METHODS

Three different treatments were applied to evaluate the effect of photoperiod and temperature on adult body morphometry, color, lipid content, development of reproductive organs, and on feeding activity of *P. guildinii*: 14:10 h L:D at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 10:14 h L:D at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and 10:14 h L:D at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. The photophase of 14 h at 25°C represents the conditions recorded at the beginning of the summer, while the photophase of 10 h at 20°C represents the conditions recorded at the beginning of the winter at the site where the study was conducted (latitude S 30-35°).

Insects, Origin and Rearing Procedure

Adults of *P. guildinii* ($n = 400$) were collected during summer 2012 at INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (S 34° 20' W 57° 41'). They were taken to the laboratory and 20 pairs were placed into each of 20 clear plastic boxes (25 × 20 × 20 cm) to obtain eggs (Silva & Panizzi 2008). They were fed green bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.), dry soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and raw shelled peanuts (*Arachis hypogaea* L.), all equally available. Insects were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ RH, and 14:10 h L:D. Food was replaced every other day and distilled water was supplied every day by moistening cotton in a plastic container (1.0 cm diam).

Egg masses were removed, mixed to avoid genetic effects, and divided into three groups. Each group was taken to a different growth chamber in order to assign the photoperiod/temperature treatments. Insects were kept at the same photophase and temperature conditions from egg to adult. During the 1st instar, nymphs were maintained only with distilled water. On the first day of the 2nd instar, groups of 10 nymphs were placed in a clear plastic box (11.0 × 11.0 × 3.5 cm) lined with filter paper. They were supplied with the same food of adults, described above. Food was renewed every other day and distilled water was supplied every day. Relative humidity was kept constant at $80 \pm 10\%$. Chamber temperatures were monitored every day using HOBO loggers, model U23-001 (Onset Computer, Pocasset, Massachusetts).

Seasonal Morph and Lipid Content

At adult emergence, females and males were paired for each treatment. Each pair was placed into a clear plastic box lined with moistened filter paper and fed the same food offered to the nymphs. They were supplied daily with distilled water and food was renewed every other day. On days 1, 15, 30, and 45 of adult life, ca. 30 pairs from each treatment were killed by freezing at -20 °C. After adults were killed, digital pictures of each adult were taken, and measurements of the body were made using the software Image Pro-Express 5.1 (MediaCybernetics, Silver Spring, Maryland). The variables evaluated were: body length, pronotum width, and length of lateral margin of the pronotum. Females were also characterized by the color of the pronotum band and the connexivum. The color of the pronotum band varied from cream to purple. Females were typified as clear type when the color of the pronotum band was either cream, yellow or orange, and as dark type when the color was pink or purple. The color of the connexivum was recorded as clear when it was whitish-pink or as dark when it was blackish-pink.

Adult pairs were divided into two groups. In the first group, lipid content was measured using the method of Panizzi & Hirose (1995): insects were held in an oven (60 °C) for about 48 h, and then dry weight (DW) was recorded to the nearest 0.01 mg using an electronic scale. For lipid extraction a Twisselman extractor (IVA Co., Argentina) with 6 extraction tubes was used. Insects were individually identified with a unique number and placed in a cotton cloth bag (3.0 × 4.0 cm). Six bags were conditioned in each extraction tube (7.5 × 3.0 cm); 250 mL of the extraction solvent (hexane) was added to a volumetric flask and placed in the Twisselman extractor. The equipment was heated to approximately 120 °C, after which the extraction process was continued for 2 h. After that, each adult was placed back into the oven (60 °C) for 15 h and then weighed once more to obtain its weight without lipid (TW). The following formula was applied to obtain percentage of stored lipids: % lipid = [(DW-TW)/DW] × 100.

Adults associated with the second group were dissected and the developmental stage of each adult's reproductive organs was evaluated. Ethyl alcohol (70%) was used to clean the abdominal cavity of the insects to allow the best view of the reproductive organs. Females were ranked according to Mourão & Panizzi (2002) in one of three categories: immature = ovaries with no differentiation or no development, and no vitellary constriction; intermediate = ovaries with differentiation with visible chambers and vitellary constrictions with oocytes; and mature = ovaries totally developed with oocytes well-developed. For males the condition of the ectodermal sac

(collapsed or expanded) was evaluated according to Esquivel (2009). In addition, testes were extracted from the abdominal cavity and measured using the software Image Pro-Express 5.1. They were ranked as developed (values falling within the range of the highest mean ± one SEM and higher), and immature (values falling within the range of the lowest mean ± one SEM).

Feeding Activity

On the first day of the emergence, ca. 76 adults from each treatment were transferred individually into a clear plastic box (11.0 × 11.0 × 3.5 cm) lined with moistened filter paper, recording the gender of each adult. The feeding activity of adults was measured at days 10, 20, 30 and 40 of adult life. Prior to each evaluation they were fasted for 48 h in the presence of water, and then an immature soybean pod (R 5.5) was offered for 24 h. During the first seven days of adult life, and between each feeding activity evaluation, adults were allowed to feed on green bean pods, dry soybean seeds, and raw shelled peanuts, all equally available. Food was replaced every other day and distilled water was supplied every day by moistening cotton in a plastic container (1.0 cm diam).

After 24 h of feeding activity, the immature soybean pods were taken out and immersed in an acid fuchsin solution (1g of fuchsin + 2 ml of alcohol + 300 mL of water) for 1 h to stain the stylet sheaths. After that, the pods were washed with running tap water and the number of stylet sheaths was enumerated under magnification with a stereomicroscope (Bowling 1980).

Statistical Analyses

Each experiment was run twice, and photoperiod and temperature conditions were randomly re-assigned subsequent runs. The experimental design was factorial split plots in randomized blocks, with a different number of subsamples per treatment because of mortality. The whole plots were the treatments, and the split plots where the eight combinations given by gender and age. Morphometric data (body length, pronotum width, and length of the lateral margin of the pronotum), lipid content, and testes size were analyzed with general linear mixed model (PROC MIXED, SAS Institute 2008). Means were compared by contrasts ($Pr > |t| < 0.05$).

The percentages of females that displayed the pronotum band and connexivum type clear or dark were analyzed using the generalized linear model with the binomial distribution (PROC GENMOD, SAS Institute 2008). The model considered the main effects of treatment, age and age*treatment interaction. The percentages of the females with different ovarian developmental

stages were also analyzed using this generalized linear model. Data corresponding to 1 day-old adults were analyzed using the binomial distribution and the link function logit because at this age only intermediate and immature stages were recorded. Data obtained at 15, 30, and 45 days were analyzed using a multinomial distribution and the link function cumlogit. Each age was analyzed individually. The percentages of males with different developmental stage of testes and different conditions of the ectodermal sac were analyzed using the generalized linear model with binomial distribution and the link function logit. Each age was analyzed individually. The results are presented as the likelihood ratio statistics of the Chi-square distribution.

Feeding activity data were analyzed using the generalized linear mixed model (PROC GLIMMIX, SAS Institute, version 9.2) with the Poisson distribution and logarithmic function, with the number of stylet sheaths measured at day 10 of adulthood as a covariate and the subsequent assessments at day 20, 30 and 40 as repeated measures in the analysis. The covariance structure that fitted the data was AR (1). The model statement included the interaction term (age*treatment) to test for heterogeneity of slopes. Means of treatments were compared by contrasts ($\text{Pr} > |t| < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Seasonal Morph and Lipid Content

Size and Coloration of the Body. Treatments (photophase/temperature) had a significant effect on body length ($F_{2,2} = 61.7, P = 0.01$), pronotum width ($F_{2,2} = 44.2, P = 0.02$), and lateral margin length of the pronotum ($F_{2,2} = 29.1, P = 0.03$). The analyses also indicated that morphometric variables were significantly different for genders (body length: $F_{1,683} = 394.7, P < 0.0001$; pronotum width: $F_{1,684} = 314.1, P < 0.0001$; lateral margin length of the pronotum: $F_{1,684} = 156.9, P < 0.0001$).

Photophase and temperature had a similar effect on both sexes for each variable; the interaction treatment*gender was not significant (body length: $F_{2,683} = 1.5, P = 0.21$; pronotum width: $F_{2,684} = 2.63, P = 0.07$; lateral margin length of the pronotum: $F_{2,684} = 1.4, P = 0.26$). There was a significant effect of age on body length ($F_{3,683} = 21.9, P < 0.0001$), on pronotum width ($F_{3,684} = 13.2, P < 0.0001$), and on the lateral margin length of the pronotum ($F_{3,684} = 12.6, P < 0.0001$); although this was not expected and biologically not explained, that may be due to the group assignment. Adult insects do not grow, and the size of an adult insect is determined by the size of the last instar (Nijhout 2003). However, for these variables, the effects of the treatment were similar at the different ages; the interaction treatment*age was not significant (body length: $F_{6,683} = 1.5, P = 0.18$; pronotum width: $F_{6,684} = 1.4, P = 0.22$; lateral margin length of the pronotum: $F_{6,683} = 0.9, P = 0.51$). The interaction treatment*age*gender was not significant for all variables (body length: $F_{6,683} = 0.5, P = 0.80$; pronotum width: $F_{6,684} = 0.5, P = 0.84$; lateral margin length of the pronotum: $F_{6,684} = 0.4, P = 0.86$).

Results of the morphometric evaluation indicated that body size of *P. guildinii* adults was under photoperiod control but not temperature, at least under the short photoperiod treatment. Values of body length, pronotum width and lateral margin length of the pronotum recorded at 14 h of photophase at 25 °C were significantly greater than those recorded under short (10 h) photophase at 25 and 20 °C, which were similar. Females were larger than males (Table 1).

A review of nine studies on the effects of temperature on body size of heteropterans concluded that in 78% of the cases decreases in temperature led to smaller size (Atkinson 1994). Few studies were found that assessed the effects of abiotic factors on the size or shape of pentatomids. In species with a shoulder spine [such as *Euschistus servus* (Say), *E. heros* (Fabr.), *Oebalus poecilus* (Dallas), and *D. melacanthus* (Dallas)], the size and shape of the spine were affected by photoperiod

TABLE 1. SIZE OF ADULTS (MM) OF *PIEZODORUS GUILDINII* (MEAN \pm SEM) AT THREE SETS OF PHOTOPHASE AND TEMPERATURE CONDITIONS IN THE LABORATORY.

Conditions/ gender	Mean \pm SEM (mm) ¹			
	Body length	Pronotum width	Lateral margin pronotum length	Testes length
10h, 20 °C	9.52 \pm 0.04 b [227]	5.03 \pm 0.01 b [227]	1.96 \pm 0.01 b [227]	1.37 \pm 0.02 c [75]
10h, 25 °C	9.50 \pm 0.04 b [240]	5.01 \pm 0.01 b [240]	1.96 \pm 0.01 b [240]	1.50 \pm 0.02 b [75]
14h, 25 °C	9.83 \pm 0.04 a [245]	5.17 \pm 0.01 a [245]	2.04 \pm 0.01 a [245]	1.71 \pm 0.02 a [71]
Females	9.88 \pm 0.04 A [360]	5.20 \pm 0.01 A [360]	2.04 \pm 0.01 A [360]	
Males	9.36 \pm 0.04 B [352]	4.94 \pm 0.01 B [352]	1.94 \pm 0.01 B [352]	

¹Means followed by the same lowercase letter or uppercase letter in each column are not significantly different ($\text{Pr} > |t| < 0.05$). Consult text for ANOVA details.

(McPherson 1974; Albuquerque 1993; Mourão & Panizzi 2002; Chocorosqui & Panizzi 2003). Niva & Takeda (2003) showed for *Halyomorpha halys* (Stål) that under a short photophase the head and pronotum widths were significantly reduced. Nakamura (2002) reported that *Dolycoris baccarum* (L.) adults held at 25 °C under long photophase conditions (16:8 h L:D) were larger than those raised under short photophase (12:12 h L:D).

Body size is one of the most important life-history traits because it is correlated with numerous physiological and fitness traits including fecundity and survivorship (Danks 1987; Honěk 1993; Nylin & Gotthard 1998). The results reported by Zerbino et al. (2013) suggest that body size of *P. guildinii* is associated with reproductive performance, survivorship, and growth rate.

The analyses of the data on the color of the pronotum band of females indicated that there was a significant effect of the interaction treatment*age ($\chi^2 = 26.99$; df = 6; $P < 0.0001$). At 25 °C, the percentage of females with a clear pronotum band was higher under short (10 h) compared to long (14 h) photophase, particularly at day 1. From day 15 on, the percentages obtained under short photophase at different temperatures (25 and 20 °C) were similar and higher than those recorded under long photophase (25 °C) (Fig. 1A). While the percentages observed over time did not vary significantly under different photophases at 25 °C, they decreased significantly under short photophase (20 °C) between ages 1 to 15 from 100 to 63%, and, thereafter, values were similar (Fig. 1A).

The analyses of the percentages of females with different connexivum colors indicated a significant effect of the interaction treatment*age ($\chi^2 = 35.45$; df = 6; $P < 0.0001$). The percentage of females with a clear connexivum generally followed what was observed for the pronotum band color pattern. At day 1, the percentage of females with a clear connexivum was significantly higher under short (10 h) photophase at 20 °C compared to the other treatments. From day 15 on, the percentages with clear connexivum under short photophase were similar at 25 and 20 °C and higher than those recorded under long (14 h) photophase at 25 °C (Fig. 1B). While the percentages of females with a clear connexivum did not vary significantly over time under different photophases at 25 °C, under short photophase at 20 °C significant differences were found over time (Fig. 1B).

Results obtained for the color of the pronotum band and connexivum indicate that these color variables were a consequence of both photophase and adult age. Abdominal coloration of the pentatomid *D. melacanthus* was found to be related to photoperiod and age (Chocorosqui & Panizzi 2003). In contrast, Mourão & Panizzi (2002) reported that although *E. heros* adults

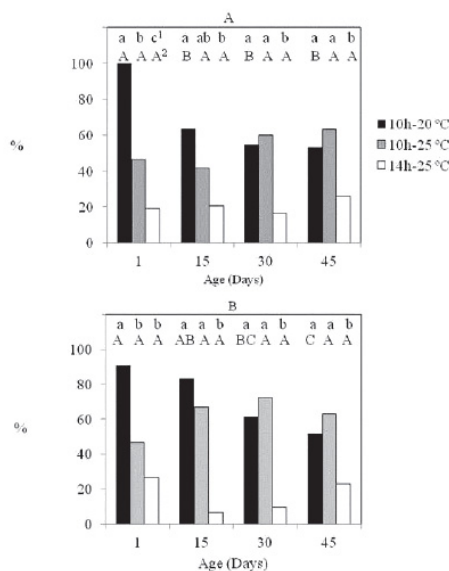


Fig. 1. Percentage of *Piezodorus guildinii* adult females at different ages with a clear type pronotum band (A) and clear type connexivum (B), maintained under 3 sets of photophase and temperature conditions in the laboratory. Means followed by the same letter within each age are not significantly different ($p < 0.05$) based on the likelihood ratio. Means followed by the same uppercase letters between ages do not differ significantly ($p < 0.05$ based on likelihood ratio).

with two different colors were observed, color was not related to variation in the photophase. Changes in body coloration during the season are typical of many true bugs, and are often controlled by photophase and usually related to diapause (Saulich & Musolin 2012). Musolin & Numata (2003) and Musolin et al. (2007) stated that the color changes are regulated by day length and associated with the physiological state of the individuals.

Several works with different species of pentatomids established that color changes were related to diapause, as in the case of *E. servus* (Say), *E. tristigmus tristigmus* (Say), *N. viridula*, *Oebalus ypsilongriseus* (DeGeer), *Plautia stali* (Scott), and *Thyanta calceata* (Say) (references in Saulich & Musolin 2012). In general, the main trend in seasonal coloration change is the prevalence of brown coloration or dull texture of the integument in overwintering insects. This makes them less conspicuous, providing them passive protection from predators (Saulich & Musolin 2012).

Lipid Content. The analyses of the data on the body lipid content of *P. guildinii* adults indicated that the effects of treatment ($F_{2,2} = 3.4, P = 0.23$), gender ($F_{1,355} = 2.8, P = 0.09$), and the interactions gender*age ($F_{3,355} = 0.23, P = 0.87$) and treatment*age*gender ($F_{6,355} = 1.3, P = 0.24$) were not statistically significant, while the interaction treatment*age had a significant effect ($F_{6,355} = 2.3, P = 0.035$).

For adults 1 and 15 days old, there was no effect of treatment on the lipid content. At days 30 and 40 of adulthood, adults maintained under short (10 h) photophase at 20 °C had higher lipid content than those held under a 14 h photophase at 25 °C (Fig. 2). While the lipid contents recorded under short photophase at 20 and 25 °C were different for 30 day-old adults, at day 45 of adulthood the percent values were similar (Fig. 2). Results obtained indicated that lipid accumulation in *P. guildinii* was more pronounced for adults kept at a 10 h photophase at 20 °C; while for those kept at 14 h photophase at 25 °C the levels of lipid storage remained the same across all ages (Fig. 2).

Adult pentatomids have been shown to have larger amounts of body fat in winter than in summer including *N. viridula* and *E. heros* in Londrina, Brazil (Panizzi & Hirose 1995) and *N. viridula* in Hawaii (Jones & Westcott 2002). Other authors who studied the effect of photoperiod on the lipid content of adults of different species of pentatomids in the laboratory found that under short photophase, adults accumulated lipids (Niva & Takeda 2003; Chocorosqui & Panizzi

2003). Changes in length of photophase and temperature had the same effect on adult *P. guildinii* regardless of gender, similar to other pentatomids (Panizzi & Hirose 1995; Mourão & Panizzi 2002; Chocorosqui & Panizzi 2003).

Degree of Development of Reproductive Organs. The development of the ovaries was affected by the photophase and temperature. At day 1, no differences were detected between treatments ($\chi^2 = 5.31; df = 2; P = 0.07$), and almost no females showed ovarian development (Fig. 3). In contrast, at days 15, 30 and 45, there was a significant effect of the treatments (15 days $\chi^2 = 24.6, 30$ days $\chi^2 = 42.40, 45$ days $\chi^2 = 33.90; df = 2; P < 0.0001$). From day 15 on, the percentages recorded under a long (14 h) photophase at 25 °C were different than those under a short (10 h) photophase at 20 °C (Fig. 3). For instance, under long (14 h) photophase at 25 °C the proportion of females with immature ovaries was 0% from day 15 to day 45, while under short (10 h) photophase and 20 °C during the same time-period, the percentage of females exhibiting immature ovaries declined from 60 to 33%.

The decrease of the photophase reduced the maturity of the ovaries. The photoperiodic response was influenced by the decrease of temperature as in others insect species (Danks 1987; Cho et al. 2008; Saulich & Musolin 2012). For adult females 15 to 30 days old, under short photophase, the percentages with immature ovaries were higher at 20 °C than at 25 °C. These results suggest that *P. guildinii* does not have thermostability of photoperiodic responses, such as *N. viridula* and *Arma custos* (F.) (Musolin 2012; Volkovich & Saulich 1994).

The slow decline in the percentage of females that contained undeveloped ovaries under a 10 h photophase at 20 °C, combined with the contin-

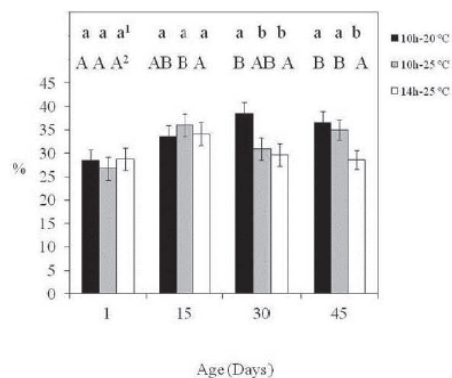


Fig. 2. Percentage of lipid content ($X \pm SEM$) of *Piezodorus guildinii* adults at different ages, maintained under 3 sets of photophase and temperature conditions in the laboratory. Means followed by the same lowercase letters within each age are not significantly different ($Pr > |t| < 0.05$). Means followed by the same uppercase letters for the same treatment between ages are not significantly different ($Pr > |t| < 0.05$).

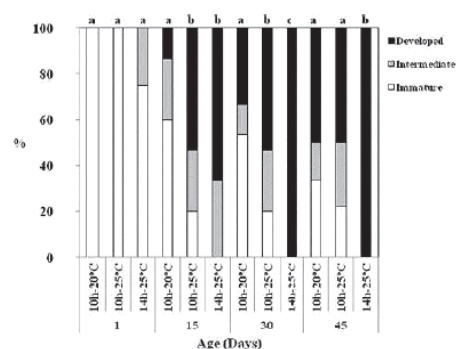


Fig. 3. Percentage of *Piezodorus guildinii* females with ovaries at different degrees of development at different ages, maintained under 3 sets of photophase and temperature conditions in the laboratory. Means followed by the same letters in each age do not differ significantly ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

ued occurrence of intermediate ovaries, suggest that the exposure to the short photoperiod and 20 °C delayed but did not prevent ovarian development, as determined by Spurgeon & Brent (2010) for *Lygus hesperus* (Knight). Saulich & Musolin (2009) established that in species that overwinter as adults, the absence of oviposition is caused by direct suppression of maturation and/or oviposition due to low temperature, rather than by induction of reproductive diapause. Zerbino et al. (2013), studying the reproductive performance of *P. guildinii* found that the preoviposition period was five times shorter under long (14 h) photophase at 25 °C compared to short (10 h) photophase at 20 °C; under long photophase at 25 °C *P. guildinii* had the highest percentages of ovipositing females, number of egg masses, and number of total eggs/female, while a decrease in temperature increased the negative effect of the short photophase – females under short photophase at 20 °C showed the lowest values for all variables, including percentage of egg hatchability (4%).

The percentage of females with undeveloped ovaries recorded in the present study was smaller than those obtained for other pentatomids. Higuchi (1994) working with *P. hybneri* reported that under a short photophase (≤ 12 h), more than 80% of 15 day-old females had immature ovaries. Mourão & Panizzi (2002) determined for *E. heros* that 90% of 30 day-old females had immature ovaries when were maintained under a short (10 h) photophase at 25 °C. Moreover, Chocorosqui & Panizzi (2003), studying *D. melacanthus*, found that under a short (11 h) photophase and 25 °C, 80% of 20 day-old females had immature ovaries. Musolin & Numata (2003) established that 60 day-old *N. viridula* females held under a short (10 h) photophase at 25 °C had 100% of undeveloped ovaries.

There was significant effect of the treatments ($F_{2,2} = 93.3, P = 0.01$) and age ($F_{3,202} = 22.8, P < 0.0001$) on testes size; while the treatment*age interaction was not significant ($F_{6,202} = 1.9; P = 0.08$). The values of testes size for the three treatments were significantly different (Table 1). Males maintained under long (14 h) photophase

at 25 °C had the largest testes, and those held under short (10 h) photophase at 20 °C had the smallest. Testes size of males 1-day old were significantly smaller (1.38 ± 0.02 mm) than those at 15 (1.55 ± 0.02 mm), 30 (1.57 ± 0.02 mm), and 45 (1.60 ± 0.02 mm) days of adulthood, which were not different from each other.

Results showed that testes with a size between 1.21 to 1.54 mm were immature, and those ≥ 1.55 mm were developed. The analyses of the percentages of the testes ranking indicated that there was a significant effect of treatments of adults at the four ages (1 day $\chi^2 = 9.7; df = 2; P = 0.008$, 15 days $\chi^2 = 25.63; df = 2; P < 0.0001$, 30 days $\chi^2 = 11.40; df = 2; P = 0.003$, 45 days $\chi^2 = 13.89; df = 2; P = 0.001$). Regardless of age, the proportion of males with developed testes was significantly greater under long photophase at 25 °C than under short photophase at 20 °C (Fig. 4A).

TABLE 2. FEEDING ACTIVITY OF ADULTS OF *PIEZODORUS GUILDINII* DURING 24 H AT THREE SETS OF PHOTOPHASE AND TEMPERATURE CONDITIONS IN THE LABORATORY.

Conditions	Number of stylet sheaths/adult/day ¹	
	Slope LN(x)	(Mean \pm SEM)
10 h, 20 °C	-0.044 a	1.43 \pm 0.18 b [221] ²
10 h, 25 °C	-0.035 a	1.90 \pm 0.20 b [263]
14 h, 25 °C	-0.011 b	2.77 \pm 0.25 a [225]

¹Means followed by the same letters in each column are not significantly different ($Pr > |t| < 0.05$).
²Number of adults in brackets.

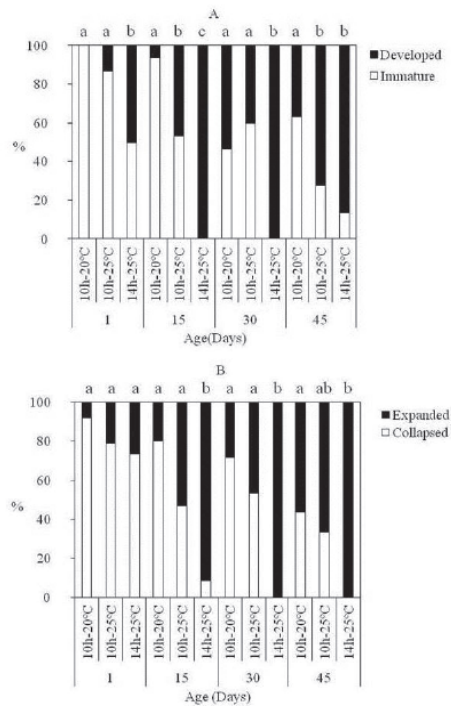


Fig. 4. Percentage of males of *Piezodorus guildinii* with different degree of development of the reproductive organs of males at different ages, maintained under 3 sets of photophase and temperature conditions in the laboratory; A) testes; B) ectodermal sac. Means followed by the same letters in each age do not differ significantly ($P < 0.05$) based on likelihood ratio.

The decrease in photophase and temperature reduced the size of the testes; they occupied a small portion of the abdominal cavity, but otherwise their appearance was normal. Males of *N. viridula* held under short photophase also showed testes with normal appearance (Ali & Ewies 1977; Esquivel 2009). In others pentatomids the difference between immature and developed testes is considerable, so no measurements are necessary to evaluate their condition. For instance, Mourão & Panizzi (2002) observed for *E. heros* that undeveloped testes were 1 mm or less in length; Chocorosqui & Panizzi (2003) for *D. melacanthus* established that immature males showed testes with normal appearance, but smaller size. In the last two studies, under short (< 12 h) photophase conditions at day 20, 90% of males had immature testes.

When measurement of the testes size is not feasible, it is useful to evaluate the condition of the ectodermal sac (Esquivel 2009; Spurgeon & Brent 2010). There was no significant difference among treatments with respect to the condition of the ectodermal sac at day 1 of adulthood ($\chi^2 = 1.64$; $df = 2$; $P = 0.44$), but there were significant treatment effects at 15, 30 and 45 days of age (15 days $\chi^2 = 16.61$; $df = 2$; $P = 0.0002$, 30 days $\chi^2 = 14.34$; $df = 2$; $P = 0.0008$, 45 days $\chi^2 = 6.44$, $df = 2$; $P = 0.04$). Across all ages, the proportion of males with an expanded ectodermal sac was greater under long (14 h) photophase at 25 °C than under short (10 h) photophase at 20 °C; no differences were detected between values recorded under a short photophase at the two temperatures (Fig. 4B). Similar results were obtained by Spurgeon & Brent (2010) for the heteropteran *L. hesperus*.

Results obtained in this study and those reported by Zerbino et al. (2013) indicate that *P. guildinii* increases the tendency to enter into a reproductive diapause with short day length (10 h) and low temperature (20 °C). Preliminary results (M. S. Zerbino, unpublished data) suggest that field-collected insects exhibit a greater and more consistent diapause response to short photophase and low temperature than do laboratory-reared insects. Similar results were reported by Spurgeon & Brent (2010) for *L. hesperus*.

Feeding Activity. The numbers of feeding sites (stylet sheaths) recorded on soybean pods varied according to the treatments at different ages (interaction of treatment*age $F_{3,478} = 11.89$, $P < 0.0001$), and to the genders ($F_{1,222} = 23.38$, $P < 0.0001$). The interaction treatment*gender ($F_{2,222} = 2.48$, $P = 0.09$) was not statistically significant.

Results of analyzes indicate that feeding activity was under photoperiod control but not temperature at least under the short photoperiod treatment. The number of feeding sites recorded did not decline significantly over time when adults were held under long (14 h) photophase and 25 °C (slope ≈ 0 $Pr > |t| = 0.14$). However, it decreased

significantly when adults were maintained at 10 h photophase under different temperatures (25 and 20 °C) (slope ≈ 0 $Pr > |t| = < 0.0001$, both treatments); the slopes been similar in these cases (Table 2). The mean number of stylet sheaths recorded under long photophase and 25 °C was significantly higher than those at short photophase treatments (20 and 25 °C), which did not differ (Table 2).

Few studies were found in the literature on the effect of photoperiod and temperature on feeding activity of pentatomids. Adults of *E. heros* increase their feeding activity with increasing photophase, and decrease it with age (Mourão & Panizzi 2002). These authors found that under short (≤ 12 h) photophase this decline occurred between the 1st and 2nd week of adult life, and under long (14 h) photophase it occurred between the 2nd and 3rd week of adult life. Niva & Takeda (2003) found that the 5th instar nymphs of *H. halys* showed less feeding activity under short (12 h) than under a long (16 h) photophase.

A greater number of feeding sites were associated with males than females regardless of age (2.6 vs 1.47 stylet sheaths/adult/day, respectively). The fact that *P. guildinii* males fed more than females is in accordance with previous data (Panizzi et al. 1995). In other pentatomids, such as *N. viridula*, *E. heros* and *Acrosternum hilare* (Say), both genders showed similar feeding activity (Bowling 1980; Simmons & Yeargan 1988; Panizzi et al. 1995).

CONCLUSIONS

Results obtained in this study indicate that phenology and physiology of *P. guildinii* adults are affected by the length of photophase and temperature. Under short (10 h) photophase at 20 °C they display particular traits: accumulation of energy reserves (lipids); undeveloped reproductive organs; smaller body size; change in the coloration of the pronotum band and connexivum; and reduced feeding activity, all of which indicative of reproductive diapause.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is part of a project sponsored by the National Research Council of Brazil (CNPq) in collaboration with INIA of Uruguay. We thank Mabel Pessio and Eduardo García for their labor support in the laboratory. We gratefully acknowledge reviewers for improving the manuscript.

REFERENCES CITED

- ALBUQUERQUE, G. S. 1993. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. Crop Prot. 12: 627-630.

- ALI, M., AND EWIESS, M. A. 1977. Photoperiodic and temperature effects on rate of development and diapause in the green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). *Z. Ang. Entomol.* 84: 256-264.
- ATKINSON, D. 1994. Temperature and organism size—A biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25: 1-58.
- BAUR, M. E., AND BALDWIN, J. 2006. Red banded stink bug trouble in Louisiana. *Louisiana Agric.* 49: 9-10.
- BOWLING, C. C. 1980. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybean. *J. Econ. Entomol.* 73: 1-3.
- CHO, J. R., MINHO, L., KIM, H. S., AND BOO, K. S. 2008. Effect of photoperiod and temperature on reproductive diapauses of *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 11: 53-57.
- CHOCOROSQUI, V. R., AND PANIZZI, A. R. 2003. Photoperiodic influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian J. Biol.* 63: 655-664.
- DANKS, H. V. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. <http://www.biology.ualberta.ca/bsc/englissh/insectdormancy.htm>.
- ESQUIVEL, J. F. 2009. Stages of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae): Improved visualization. *Ann. Entomol. Soc. America* 102: 303-309.
- HIGUCHI, H. 1994. Photoperiodic induction of diapause hibernation and voltinism in *Piezodorus hybneri* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl. Entomol. Zool.* 29: 585-592.
- HODEK, I., AND HODKOVÁ, M. 1993. Role of temperature and photoperiod in diapause regulation in Czech populations of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *European J. Entomol.* 90: 95-98.
- HONEK, A. 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66: 483-492.
- ICHIMORI, J. W., OHTOMO, R., SUZUKI, K., AND KURIHARA, M. 1990. Specific protein related to adult diapauses in the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea*. *J. Insect Physiol.* 36: 85-91.
- ITO, K. 1985. Seasonal changes of lipid content in adult *Cletus punctiger*. *Appl. Entomol. Zool.* 20: 350-351.
- JONES, V. P., AND WESTCOTT, D. 2002. The effect of seasonal changes on *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) and *Trissolcus basalus* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) in Hawaii. *Biol. Control* 23: 115-120.
- KAMMINGA, K. L., DAVIS, J. A., STOCK, S. P., AND RICHTER, A. R. 2012. First report of a mermithid nematode infecting *Piezodorus guildinii* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) in the United States. *Florida Entomol.* 95: 214-217.
- KOBAYASHI, S., AND NUMATA, H. 1995. Effects of temperature and photoperiod on the induction of diapause and the determination of body coloration in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Zool. Sci.* 12: 343-348.
- MCPHERSON, J. E. 1974. Photoperiodic effects in a southern Illinois population of the *Euschistus tristigmus* complex (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. America* 67: 943-952.
- MOURÃO, A. P. M., AND PANIZZI, A. R. 2002. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1778) (Hemiptera: Pentatomidae). *Brazilian J. Biol.* 62: 231-238.
- MUSOLIN, D. L. 2012. Surviving winter: diapause syndrome in the southern green stink bug *Nezara viridula* in the laboratory, in the field, and under climate change conditions. *Physiol. Entomol.* 37: 1-14.
- MUSOLIN, D. L., FUJISAKI, K., AND NUMATA, H. 2007. Photoperiodic control of diapauses termination, color change and postdiapause reproduction in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Physiol. Entomol.* 32: 64-72.
- MUSOLIN, D. L., AND NUMATA, H. 2003. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and colour change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiol. Entomol.* 28: 65-74.
- NAKAMURA, K. 2002. Effect of photoperiod on the size-temperature relationship in a pentatomid bug, *Dolycoris baccarum*. *J. Therm. Biol.* 27: 541-546.
- NAKAMURA, K., AND NUMATA, H. 1997. Seasonal life cycle of *Aelia fieberi* (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to the phenology of its host plants. *Ann. Entomol. Soc. America* 90: 625-630.
- NIJHOUT, H. F. 2003. The control of body size in insects. *Dev. Biol.* 261: 1-9.
- NIVA, C. C., AND TAKEEDA, M. 2003. Effects of photoperiod, temperature and melatonin on nymphal development, polyphenism and reproduction in *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zool. Sci.* 20: 963-970.
- NUMATA, H., SAULICH, A. H., AND VOLKOVICH, T. A. 1993. Photoperiodic responses of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, under conditions of constant temperature and under thermoperiodic conditions. *Zool. Sci.* 10: 521-527.
- NYLIN, S., AND GOTTHARD, K. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 63-83.
- PANIZZI, A. R., AND HIROSE, E. 1995. Seasonal body weight, lipid content, and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezara viridula* and *Euschistus heros*. *Entomol. Ex. Appl.* 76: 247-253.
- PANIZZI, A. R., NIVA, C. C., AND HIROSE, E. 1995. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. *J. Entomol. Sci.* 30: 333-341.
- PANIZZI, A. R., AND SLANSKY, F. JR. 1985. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomol.* 68: 184-214.
- SAS INSTITUTE. 2008. SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- SAULICH, A. K. H., AND MUSOLIN, D. L. 2009. Seasonal development and ecology of anthocorids (Heteroptera, Anthocoridae). *Entomol. Rev.* 89: 501-528.
- SAULICH, A. K. H., AND MUSOLIN, D. L. 2012. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. *Entomol. Rev.* 92: 1-26.
- SHEARER, P. W., AND JONES, V. P. 1996. Diel feeding pattern of adult female southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* 25: 599-602.
- SILVA, F. A. C., AND PANIZZI, A. R. 2008. The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Rev. Brasileira Entomol.* 52: 131-134.

- SIMMONS, A. M., AND YEARGAN, K. V. 1988. Feeding frequency and feeding duration of the green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean. *J. Econ. Entomol.* 81: 812-815.
- SPURGEON, D. W., AND BRENT, C. S. 2010. Morphological characters of diapauses in *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *J. Entomol. Sci.* 45: 303-316.
- VOLKOVICH, T. A., AND SAULICH, A. H. 1994. The predatory bug *Arma custos*: photoperiodic and temperature control of diapause and coloration. *Zool. Zh.* 73: 26-37.
- ZERBINO, M. S. 2010. Manejo de chinches en soja. *Revista INIA* 23: 24-27.
- ZERBINO, M. S., ALTIER, N., AND PANIZZI, A. R. 2013. Effect of photoperiod and temperature on nymphal development and adult reproduction of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae). *Florida Entomol.* 96: 572-582.

Copyright of Florida Entomologist is the property of Florida Entomological Society and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

8.3. SEASONAL OCCURRENCE OF *PIEZODORUS GUILDINII* ON DIFFERENT PLANTS INCLUDING MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES

Journal of Pest Science, aceptado para publicar 29/10/2014, DOI: 10.1007/s10340-014-0630-2.

Authors

MARIA S. ZERBINO¹, NORA A. ALTIER¹ and ANTÔNIO R. PANIZZII²

Address

¹INIA La Estanzuela. Ruta 50 km 11, CP 70000, Colonia, Uruguay

²EMBRAPA Trigo. Caixa Postal 451. 990012-970, Passo Fundo, RS, Brasil

Correspondence: M.S. Zerbino, INIA La Estanzuela Ruta 50 km11, CP 70000, Colonia, Uruguay. Phone: 59845748000. Fax: 59845748000.

E-mail: szerbino@inia.org.uy

Author Contribution Statement: MSZ, NAA and ARP conceived and designed research. MSZ conducted experiments and analyzed data. MSZ, NAA and ARP wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Key Message

- *Piezodorus guildinii* is an important pest of soybean in the Americas.
- Knowledge about its ecology is limited.

- Implement holistic and sustainable pest management program requires understanding how biotic and abiotic factors regulate its seasonal occurrence.
- On alfalfa, adults were collected during almost the entire year
- In autumn and winter, adults were in reproductive diapause.
- Implement management tactics during spring on alfalfa may be successful to reduce population of bugs prior to their colonization of soybean.

Abstract

Piezodorus guildinii (Westwood) is an important soybean pest in the Americas. Current knowledge about its ecology is limited. To implement holistic and sustainable pest management programs it is necessary to understand how biotic and abiotic factors regulate its population. Seasonal occurrence on different host plants, and morphological (body morphometry and color) and physiological (lipid content and development of reproductive organs) changes in adults were studied. Weekly samples were conducted during two years on *Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus* (Leguminosae), *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae), *Ligustrum lucidum* (Oleaceae), *Phyllostachys* sp. (Poaceae), and in leaf litter of *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) at the survey sites (between 33° 55' and 34° 17' S). On forage legumes, both nymphs and adults were intercepted; whereas on shrubs, bamboo, and in eucalyptus litter only adults were captured. Alfalfa was the forage legume on which adults were collected during almost the entire year. In this plant species the abundance of adults and nymphs were higher in comparison with the other plants species and overwintering niches. From the beginning of autumn to the beginning of spring adults were observed on the foliage of shrubs and bamboo. During autumn and winter adults were observed underneath eucalyptus litter. In autumn and winter, adults had accumulated lipids reserves, showed undeveloped reproductive organs, smaller body size, and females showed clear coloration of the pronotum band and of the connexivum, indicating reproductive diapause. Results

suggest that the control of *P. guildinii* during spring on alfalfa may reduce the population of bugs before they colonize soybean.

Key words Hemiptera, Pentatomidae, Uruguay, host plants, seasonality, diapause, morphology, physiology, polymorphism, polyphenism.

Introduction

The Redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Westwood) is a Neotropical pentatomid, found from southern United States to the South Cone of South America. It is known mainly because it is one of the most damaging pests of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Like most phytophagous stink bugs, *P. guildinii* spends only about a third of its lifetime feeding on spring/summer crops (Panizzi 2000; Panizzi and Silva 2009), usually on immature pods of soybean in summer to early autumn. When food (soybean plant) and abiotic factors turn unfavorable, it moves to alternate host plants or shelters (Panizzi 1997). Alternate host plants, shelters and overwintering sites are essential links in the intricate net of the life history of phytophagous hemipterans (Panizzi 2000).

The list of food plants of *P. guildinii* includes some economically important plants in addition to soybean, mostly legumes such as common bean *Phaseolus vulgaris* (L.), pea *Pisum sativum* (L.), lentil *Lens culinaris* (Medikus), alfalfa *Medicago sativa* (L.), and other forage legumes (Panizzi et al. 2000). Native plants include indigo legumes, *Indigofera* spp., reported in Colombia, southern United States, and Brazil (Hallman 1979; Panizzi and Slansky 1985b; Panizzi 1992, respectively). It also feeds on legumes of the genera *Sesbania*, *Crotolaria* and *Cajanus* (Panizzi 1985, 1987; Panizzi and Slansky 1985b; Panizzi et al. 2000). On the other hand, several authors have reported the presence of *P. guildinii* on different plant species belonging to several families, which are probably used as shelter (Lopes et al. 1974; Ferreira and Panizzi 1982; Panizzi and Slansky 1985a; Costa et al. 1995; Panizzi and Grazia 2001; Bunde et al., 2010; Garlet et al. 2010).

The knowledge of the seasonality of insect pest species and the factors involved in seasonality control are critical to make an accurate analysis of the pest problem, and to develop pest management strategies (Giese et al. 1975; Panizzi 1997). In order to do so, it is necessary to know the sequences of hosts used by sequential generations, and when dispersal occurs from wild hosts to crop plants and vice versa. One important aspect is to determine the spring hosts where populations can build up before dispersing to the crop (Panizzi and Silva 2009). Even though many stink bugs can breed on a wide variety of plants, they may require a specific sequence of host plant species to succeed (Jones and Sullivan 1982).

The great majority of stink bugs diapause as adults (Saulich and Musolin 2012), and the main diapause inductive factors are photoperiod and in some cases temperature or food quality/shortages (Panizzi and Silva 2009). Accumulation of energetic reserves, undeveloped reproductive structures, and variation in body size, coloration and shape are among the most conspicuous alterations that occur in pentatomids during diapause (McPherson 1974; Ali and Ewies 1977; Albuquerque 1993; Hodek and Hodková 1993; Nakamura and Numata 1997; Mourão and Panizzi 2002; Chocorosqui and Panizzi 2003; Musolin and Numata 2003; Niva and Takeda 2003). Recently, Zerbino et al. (2014) in the laboratory observed several morphological and physiological changes of *P. guildinii* adults as a consequence of the effect of photoperiod and temperature. They reported the occurrence of reproductive diapause under short photophase (10 h) and under typical temperatures of autumn (20°C) at southern South America; adults had immature reproductive organs and high body lipid content. Two morphological characteristics were proved to determine seasonal forms in the laboratory: body size in both sexes and coloration of the pronotum band of the connexivum in females.

In this study the seasonal occurrence on different plant species and/or in overwintering niches, sequence of colonized hosts, and the occurrence of reproductive diapause and different seasonal forms of *P. guildinii* in the field were investigated. This information is needed to determine the most important alternate host plants in *P. guildinii* life history and to develop tactics to mitigate the impact of this species on soybean.

Material and Methods

Seasonal occurrence of adults and nymphs

During two years (May 2011 to April 2013) weekly samples were taken on different plant species, which include cultivated legumes: alfalfa *Medicago sativa* (L.), red clover *Trifolium pratense* (L.), birdsfoot trefoil *Lotus corniculatus* (L.) (Leguminosae); shrubs: sweet pittosporum *Pittosporum undulatum* (Ventenat) (Pittosporaceae) and privet trees *Ligustrum lucidum* (Aiton) (Oleaceae); and bamboo *Phylllostachys* sp. (Poaceae). In addition, leaf litter of *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) stand was sampled. Sampling sites were located in the South West of the Department of Colonia in Uruguay (between 33° 55' and 34° 17' S, and between 57° 13' and 57° 46' W).

Different sampling methods were used according to the type of vegetation (legume crops and perennial uncultivated plants). On forage legumes, two different sampling methods were used. From the end of the winter (September) to the end of the autumn (June) a 38 cm diameter sweep net (100 sweeps / crop was used). Between June and September (winter time), when insects were not caught by sweep net because they stayed on the soil surface, samplings consisted of counting the number of insects in an area selected at random using a 1 m² iron frame. Ten sampling units were taken in each crop. For each plant species five different sites were sampled.

In the case of privet trees, bamboo and sweet pittosporum, weekly samples were taken by shaken foliage plants over a 1 m² white cloth. Ten sampling units were taken from each plant species. Eucalyptus litter was sampled using the iron frame, in a similar way as described for the forage legumes.

Adults and nymphs of *P. guildinii* caught in each sampling were identified as to their sampling site, date and plant species, and taken to the laboratory where they were killed by freezing. For the seasonal occurrence study, Constance of presence (C), % was calculated as following $C = (N \text{ of samplings where insects were present} / N \text{ of total samplings for each situation (plant species and litter)}) * 100$.

Seasonal morphological and physiological changes

After adults were killed, sexed and counted, individual digital pictures were taken, and the body measurements were evaluated using the software Image Pro-Express 5.1 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD). The variables considered were: body length, pronotum width, and length of lateral margin of the pronotum. Adult body color was evaluated. Whereas, males did not show noticeable changes in the body coloration, females may be characterized by the color of the pronotum band and of the connexivum as proposed by Zerbino et al. (2014) (Fig. 1). The color of the pronotum band varied from cream to purple. Females were typified as clear type when the color of the pronotum band was either cream, yellow or orange; and as dark type when they presented pink, red or purple band. The color of the connexivum varied from clear (whitish-pink) to dark (blackish-pink).

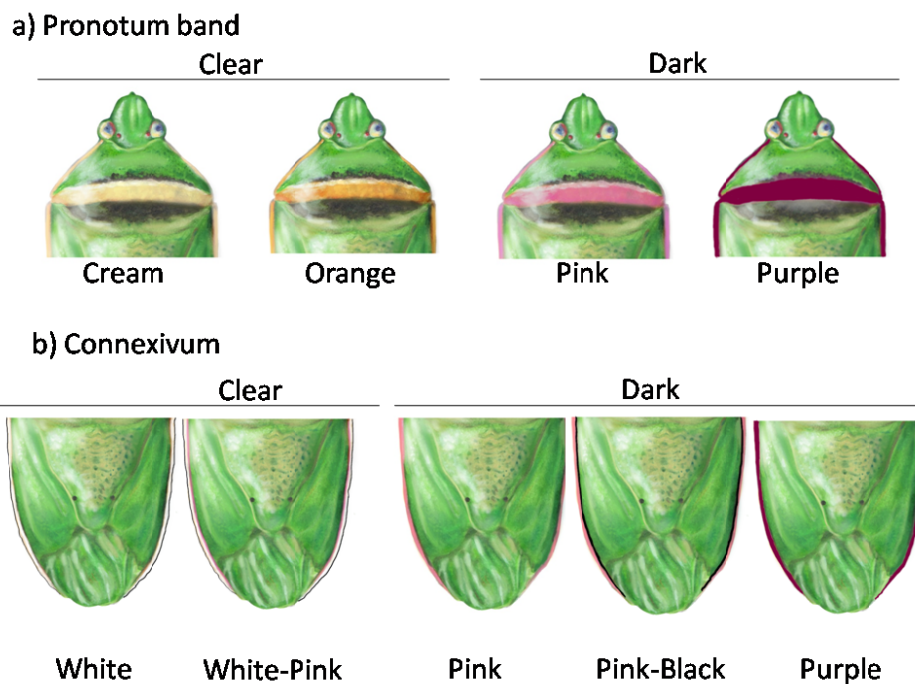


Fig. 1. Characterization of *Piezodorus guildinii* females by the color of a) pronotum band, and b) connexivum

After the morphometry assessment, females and males of each sampling date were divided into two groups. In the first one, lipid content was evaluated following Panizzi and Hirose (1995); insects were dried at 60 °C for 48 h, and dry mass (DW) was recorded to the nearest 0.01 mg (Scientech SA 210). For lipid extraction a Twisselman extractor (IVA Co., Argentine) with 6 extraction tubes was used. Insects were individually identified with a unique number and placed in a cotton cloth bag (3.0 × 4.0 cm). Six cotton bags were conditioned in each extraction tube (7.5 × 3.0 cm); 250 mL of the extraction solvent (hexane) was added to a volumetric flask and placed in the Twisselman extractor. The equipment was heated to approximately 120 °C, after which the extraction process was continued for 2 h. After that, each adult was placed back into the oven (60 °C) for 15 h and then weighed once more to obtain its weight without lipid (TW). The following formula was applied to obtain percentage of stored lipids: Lipid content (%) = ((DW - TW) / DW) x 100.

The second group of adults was dissected and the developmental stage of adult reproductive organs was evaluated. Alcohol (70 %) was used to clean the abdominal cavity of the insects to allow the best view of the reproductive organs. Females were ranked according to Mourão and Panizzi (2002) in one of three categories: immature (ovaries with no differentiation or no development, and no vitellary constriction), intermediate (ovaries with differentiation with visible chambers, and vitellary constrictions with oocytes), and mature (ovaries totally developed with oocytes well-developed). For males, the condition of the ectodermal sac (collapsed or expanded) was evaluated according to Esquivel (2009). In addition, testes were extracted from the abdominal cavity, a digital picture was taken and their length was measured using the software Image Pro-Express 5.1; they were ranked as developed or immature when values were ≥ 1.55 mm and ≤ 1.54 mm, respectively, following Zerbino et al. (2014) who determine these ranges from a sample of 217 testes.

Statistical Analysis

For each month means of all morphometric data (body length, pronotum width, and length of the lateral margin of the pronotum), lipid content, and testes size, were calculated and analyzed with general linear model (PROC GLM, SAS Institute, version 9.2). The variance was homogeneous and there was no association between means and variance. The models of morphometric and lipid data considered the effect of year, month, and sex, and their related interactions. In the case of the testes data, the effect of year and month was considered. Means were compared using Tukey-Kramer honestly significant difference (HSD) test for significance ($P < 0.05$). The percentages of females that displayed the pronotum band and connexivum type clear or dark were analyzed using the generalized linear model with the binomial distribution and the link function logit (PROC GENMOD, SAS Institute, version 9.2). The percentages of the females with different ovarian developmental stages were also analyzed using this generalized linear model using a multinomial distribution and the link function cumlogit. The percentages of males with different developmental stage of testes and different conditions of the ectodermal sac were analyzed using the generalized linear model with binomial distribution and the link function logit. In all cases, the model considered the month and year as fixed effect. The results are presented as the likelihood ratio statistics of the Chi-square distribution.

Results

Seasonal occurrence of adults and nymphs

A total of 4,470 insects were collected, 50% of which were adults (2,246), and both sexes were represented approximately half by half (1125 males and 1121 females). In the first year 1145 adults were collected, while in the second year 1101 adults were caught (Table 1).

Table 1. Total number of adults and nymphs of *Piezodorus guildinii* collected at different months during two years (2011-2013) at the south-western area of the Department of Colonia in Uruguay

Months	Year 1			Year 2		
	Males	Females	Nymphs	Males	Females	Nymphs
Oct	17	20	0	30	35	0
Nov	28	20	6	21	25	1
Dec	21	25	32	21	46	4
Jan	150	122	1432	38	54	6
Feb	74	69	110	120	119	187
Mar	64	65	163	31	49	74
Apr	148	115	82	38	52	119
May	66	67	4	138	129	4
Jun	8	6	0	40	30	0
Jul	19	25	0	22	28	0
Aug	6	2	0	13	10	0
Sept	4	4	0	8	4	0
Total	605	540	1829	520	581	395

The seasonal occurrence of adults and nymphs on different plant species and in overwintering niches is presented in Fig. 2. While on legumes both adults and nymphs were intercepted, only adults were observed on shrubs, bamboo and eucalyptus litter.

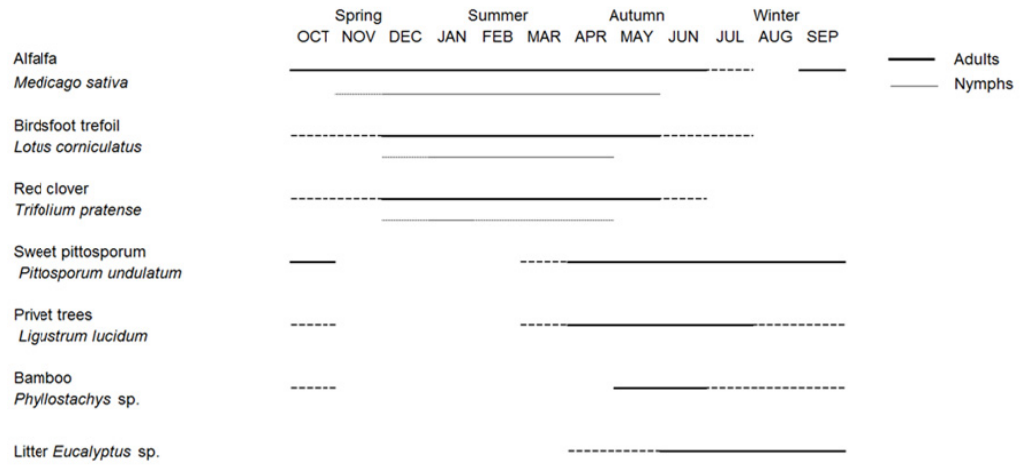


Fig. 2. Seasonal occurrence of adults and nymphs of *Piezodorus guildinii* on different plant species and in overwintering niches at the south-western area of the Department of Colonia in Uruguay. Dotted line represents occurrence in only one of two years

Table 2. Constance of presence (C), total number, percentage and period of maximal activity of adults and nymphs of *Piezodorus guildinii* collected on different plants and overwintering niches during two years (2011-2013) at the south-western area of the Department of Colonia in Uruguay

Plants/ overwintering niches	C (%) ¹	Adults			Nymphs		
		Total	%	Peak of presence ² (months)	Total	%	Peak of presence (months)
Alfalfa <i>Medicago sativa</i>	55.2	1624	72.3	Jan-Feb; Apr-May	2073	93.2	Jan-Feb; Mar-Apr
Birdsfoot trefoil <i>Lotus corniculatus</i>	30.8	193	8.6	Feb; Apr	107	4.8	Jan-Feb; Mar-Apr
Red clover <i>Trifolium pratense</i>	27.3	145	6.4	Jan-Feb; Apr-May	44	2.0	Jan-Feb; Apr
Sweet pittosporum <i>Pittosporum undulatum</i>	28.6	143	6.4	Apr	-	-	
Privet trees <i>Ligustrum lucidum</i>	18.4	55	2.4	Apr	-	-	
Bamboo <i>Phyllostachys</i> sp.	20.4	27	1.2	May-Jun	-	-	
Litter <i>Eucalyptus</i> sp.	29.0	59	2.6	Jul	-	-	
Total		2246	100		2224	100	

¹C (%) = (N of samplings where insects were collected/N of total samplings) * 100; ² Period of maximal caught

On alfalfa, *P. guildinii* adults were observed during 11 months, from the end of winter (September) to the beginning of the following winter (July), while nymphs were present from the middle of spring (November) to the middle of autumn (May) (Fig. 2). For this plant species, the Constance of presence and the total number of adults and nymphs caught were higher in comparison with other plants species or in overwintering niches (Table 2). Adults of *P. guildinii* on birdsfoot trefoil were observed during 10 months, from the beginning of spring (October) to the beginning of the winter (July), and nymphs were present from the end of spring (December) to early autumn (April) (Fig. 2). On red clover, adults were observed during 9 months, from early spring (October) to late autumn (June), while nymphs were recorded in a short period of time, from end of spring (December) to early autumn (April) (Fig. 2). The Constance of presence on birdsfoot trefoil and red clover were similar (Table 2).

For forage legumes, two periods were recorded in which the caught of adults and nymphs was maximal. In alfalfa, the first peak was higher than (data not shown), but in the other forage legumes (birdsfoot trefoil and red clover) no differences were observed. For the three species, the moments of maximum caught were similar (Table 2).

Adults of *P. guildinii* on shrubs (sweet pittosporum and privet trees) had a similar seasonal occurrence and moment of maximum caught; they were observed between the end of summer and the beginning of spring (March to October) (Fig. 2), and the maximum caught was recorded in April (Table 2). However, the percentage of constancy and the number of adults collected were different; they were higher in sweet pittosporum than on privet trees (Fig. 2, Table 2). In the other hand, on bamboo, adults began to be observed a month later than on shrubs (May), and they were collected until the beginning of spring (October) (Fig. 2). The peak of caught was recorded in May-June (Table 2). The lowest number of adults was collected on privet showing the lowest percentage of constancy.

On leaf litter of eucalyptus, adults were observed in autumn and winter, from April through September (Fig. 2). The maximum caught was recorded in July (Table 2). The percentage of constancy was similar to that in birdfoot trefoil, red clover, and sweet pittosporum (Table 2).

Seasonal morphological and physiological changes

Size and coloration of the body

Morphometric characteristics varied significantly from month to month (body length $F_{11, 23} = 8.37$, $P < 0.0001$; pronotum width $F_{11, 23} = 4.48$, $P = 0.0012$; lateral margin pronotum length $F_{11, 23} = 5.37$, $P = 0.0003$) and of sex (body length $F_{1, 23} = 64.02$, $P < 0.0001$; pronotum width $F_{1, 23} = 24.01$, $P < 0.0001$; lateral margin pronotum length $F_{1, 23} = 16.08$, $P = 0.0005$). There was no significant effect of year (body length $F_{1, 23} = 0.05$, $P = 0.8552$; pronotum width $F_{1, 23} = 0.3$, $P = 0.5925$; lateral margin pronotum length $F_{1, 23} = 0.00$, $P = 0.9762$); and the interaction month*sex was not significant (body length $F_{11, 23} = 1.27$, $P = 0.2993$; pronotum width $F_{11, 23} = 0.70$, $P = 0.7276$; lateral margin pronotum length $F_{11, 23} = 0.59$, $P = 0.8146$).

In Table 3, morphometric characteristics are presented for different months. Adults collected in mid-summer (February) had significantly longer body length than those caught in autumn (April to June), winter (July to September) or during two months of spring (October and November). Adults intercepted in late spring (December) had an intermediate body length. The pronotum width of adults collected in February was larger than those obtained in May/June; the lateral margin length of adults collected in February was larger than those obtained in May/July. Females had larger body size than males irrespective of season (mm \pm SE) (body length 10.51 ± 0.07 vs. 10.12 ± 0.04 ; pronotum width 5.44 ± 0.03 vs. 5.24 ± 0.04 ; lateral margin pronotum length 2.15 ± 0.02 vs. 2.08 ± 0.01).

Table 3. Mean monthly sunlight duration, size of adults and testes of males of *Piezodorus guildini* ($X \pm SE$) field-collected at different months during two years (2011-2013) at the south-western area of the Department of Colonia in Uruguay

Month	Sunlight duration (h)	Body length (mm)	Pronotum width (mm)	Lateral margin pronotum length (mm)	Testes length (mm)
Oct	12.98	10.23±0.14cd	5.30±0.07abc	2.10±0.02abcd	1.68±0.03ab
Nov	13.94	10.28±0.12bcd	5.30±0.04abc	2.10±0.02abcd	1.76±0.00a
Dec	14.43	10.35±0.19abcd	5.39±0.08ab	2.16±0.04abc	1.77±0.06a
Jan	14.16	10.69±0.19ab	5.50±0.10ab	2.21±0.05ab	1.81±0.05a
Feb	13.32	10.74±0.19a	5.55±0.08a	2.24 ±0.04a	1.82±0.04a
Mar	12.28	10.54±0.16abc	5.49±0.06ab	2.19±0.04ab	1.77±0.07a
Apr	11.20	10.27±0.12bcd	5.35±0.05abc	2.11±0.02abcd	1.58±0.06bc
May	10.31	10.03±0.08d	5.19±0.04bc	2.02±0.02cd	1.49±0.03dc
Jun	9.87	9.96±0.14d	5.01 ±0.18c	1.99 ±0.04d	1.35±0.04d
Jul	10.09	10.30±0.12bcd	5.33±0.07abc	2.05±0.03 bcd	1.39±0.00d
Aug	10.87	10.11±0.07d	5.32±0.04abc	2.09±0.01abcd	1.41±0.05d
Sept	11.90	10.27±0.09bcd	5.33±0.08abc	2.11±0.06abcd	1.46±0.21dc

¹Means followed by the same letter in each column do not differ significantly ($P < 0.05$) using Tukey's HSD. Total number of adults evaluated varied from 953 (478♀/478 ♂) (in summer) to 123 (58♀ / 65♂) (in winter)

In contrast to females, males did not show detectable changes in the body coloration. The analyses of the data for the color of the pronotum band of females indicated that while month had a significant effect ($\chi^2_{11} = 528.79$, $P < 0.0001$), year did not ($\chi^2_1 = 0.55$, $P = 0.4686$). From the end of autumn and during winter (June to September), more than 80% of females had clear pronotum band, while from mid-spring to mid-summer (November to February) more than 90% of females showed

dark pronotum band (Fig. 3a). In addition, the proportions of females with different connexivum color varied with month ($\chi^2_{11} = 633.94, P < 0.0001$), and the effect of year was not significant ($\chi^2_1 = 0.32, P = 0.5688$). These results were similar to those obtained for pronotum band: the high percentage of females with clear connexivum (> 85%) was observed at the end of autumn (June) and during winter (July to September), while most of the females (> 90%) collected from mid-spring to mid-summer (November to February) had a dark connexivum (Fig. 3b).

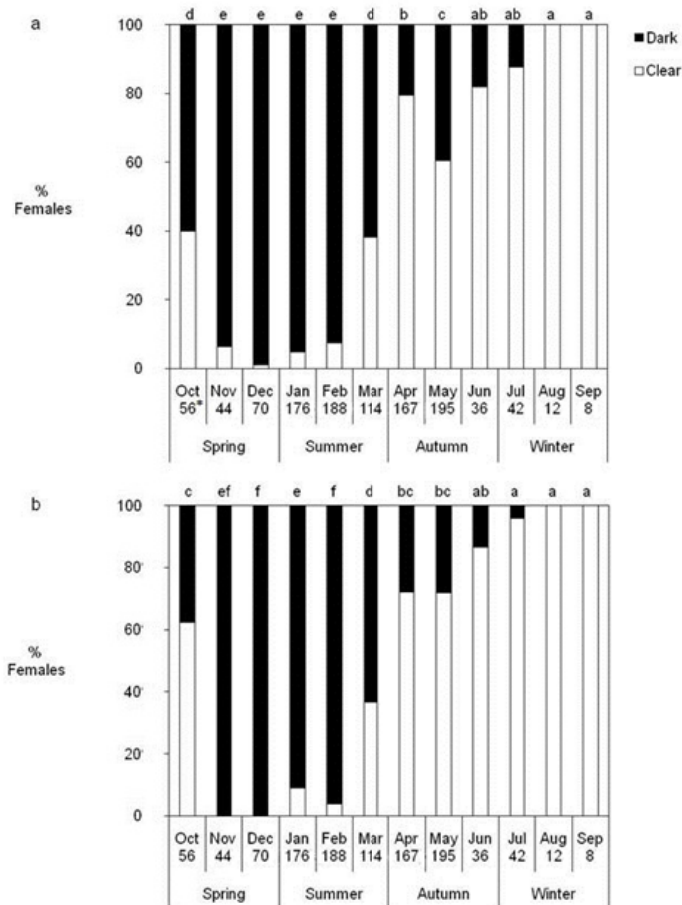


Fig. 3. Proportion of *Piezodorus guildinii* females of clear and dark types of pronotum band (a) and connexivum (b) in different months. Proportions followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio analysis. * Number of females evaluated in each month

Lipid content

Adult body lipid content of *P. guildinii* varied significantly from month to month ($F_{11,23} = 37.63$, $P < 0.0001$), whereas differences between sexes ($F_{1,23} = 1.54$, $P = 0.2272$) and year ($F_{1,23} = 0.35$, $P = 0.5577$) were not significant. There was no interaction month*sex ($F_{11,23} = 0.34$, $P = 0.9675$). Adults caught during autumn and winter (April to September) showed significantly higher lipid content than those collected in spring-summer (October to February) (Fig. 4).

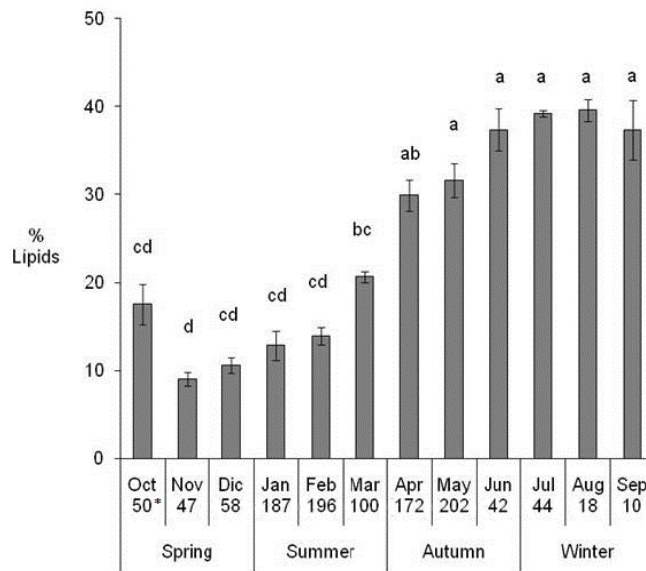


Fig. 4. Seasonal changes of lipid content (%) of *Piezodorus guildinii* adults (both sexes) ($X \pm SE$). Means followed by the same letter do not differ significantly ($P < 0.05$) using Tukey's HSD. * Number of adults evaluated in each month

Degree of development of reproductive organs

The degree of development of the ovaries changed significantly with month ($\chi^2_{11} = 455.96$, $P < 0.0001$), and the effect of the year was not significant ($\chi^2_1 = 0.11$, $P = 0.7426$). According to the proportions of females with different levels of ovary development, months were statistically separated into three groups (Fig. 5). In group

one (April to September, autumn to winter), when the photophase was < 11 h, a high proportion (> 80%) of females had immature ovaries. Group two (November to February, spring to summer), when the photophase was > 13 h, a high proportion (> 80%) of females had developed ovaries; during December and January, 0% of females showed immature ovaries. Group three (October, early spring, and March, late summer), when the photophase varied between 12 and 13 h, about 50% of females had developed ovaries.

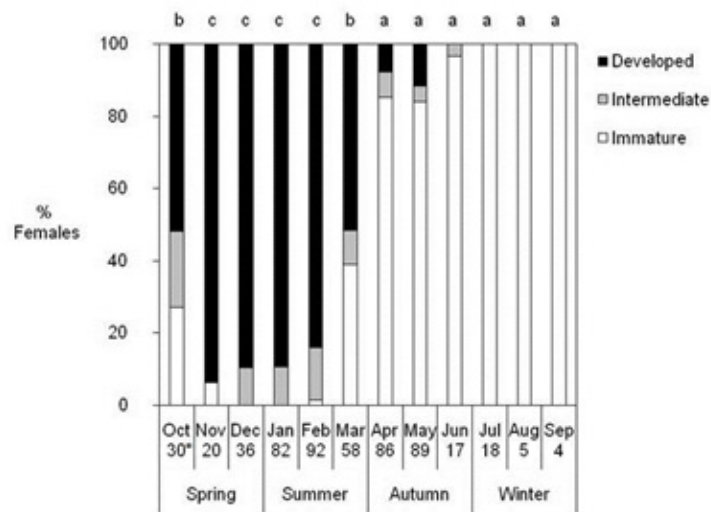


Fig. 5. Seasonal changes of the proportion of *Piezodorus guildinii* females with ovaries with different degree of development. Proportions followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio analysis.

*Number of females evaluated in each month

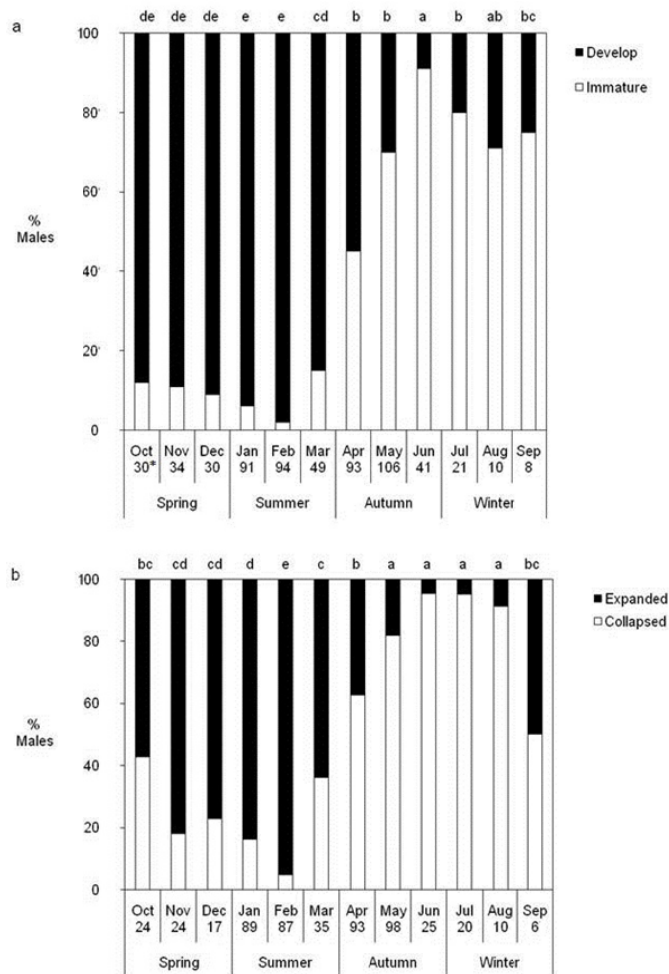


Fig. 6. Seasonal changes of the proportion of *Piezodorus guildinii* males with different degree of development of reproductive organs: testes (a) and ectodermal sac (b). Proportions followed by the same letters in each age are not significantly different ($P < 0.05$) based on likelihood ratio analysis. *Number of males evaluated in each month

The testes length varied with the month ($F_{11, 11} = 51.72$, $P < 0.0001$), and the effect of the year was not significant ($F_{1, 11} = 1.54$, $P = 0.2272$). Results indicated that males intercepted from November to March (middle spring and summer) had testes significantly larger than those caught from May to September (middle autumn and winter). Males collected in October and April (early spring and autumn, respectively) had an intermediate testes size (Table 3). Similar results were found for the

proportions of the testes development ranking (month $\chi^2_{11} = 225.09$, $P < 0.0001$; year $\chi^2_1 = 0.0$, $P = 0.9503$). From the middle of the autumn to late winter (May to September), when the length of photophase is < 12 h, most of males ($> 70\%$) had immature testes, while during spring and summer (October to March), when day light is > 12 h, a high proportion of males ($> 85\%$) had developed testes (Fig. 6a). The condition of the ectodermal sac also varied as a function of the month ($\chi^2_{11} = 274.26$, $P < 0.0001$), and the effect of the year was not significant ($\chi^2_1 = 0.76$, $P = 0.3832$). From May (mid-autumn) to August (mid-winter) 75% of males had ectodermal sac collapsed, while from November (mid-spring) to February (mid-summer) $> 80\%$ of males had ectodermal sac expanded; the highest value was recorded in February (95%) (Fig. 6b).

Discussion

Results of these studies demonstrated that environmental factors, particularly photoperiod, temperature and food availability, are the main factors regulating the seasonal occurrence of *P. guildinii*. In late summer and early autumn, when soybean is harvested, adults may disperse to forage legumes or move to perennial plants, which are probably used as shelter but not for overwintering. In late autumn, adults look for overwintering sites, like eucalyptus litter, where they remain until the next spring when they move to forage legumes again. Fraga and Ochoa (1972) and Ferreira and Panizzi (1982) mentioned that adult *P. guildinii* were found during winter under the bark of trees or other objects that offered protection. From late autumn to early spring (June to October), nymphs were not observed anywhere, what indicate that adults emerged from nymphs that reached adulthood in autumn do not start reproduction until the following spring. Results obtained in the laboratory (Zerbino et al. 2013, 2014) established that under short photophase (10 h) and 20 °C, similar to the autumn conditions, adults did not reproduce. Therefore, adults of *P. guildinii* overwinter in diapause during autumn and winter, similar to the great majority of stink bugs (Saulich and Musolin 2012).

Considering the seasonal occurrence of *P. guildinii* on alfalfa, in which adults

were collected for almost the entire year, and the highest Constancy of presence and number of adults and nymphs caught on different crops, alfalfa appears to be the preferred host plant and the main host prior to and after soybean infestation (Fraga and Ochoa 1972; Panizzi and Slansky 1985a). Adults in alfalfa fields were found from early spring until the end of autumn, and the greatest abundance was during late summer and early autumn, as also reported by Fraga and Ochoa (1972). August was the only month in which adults were not observed on this plant. Massoni and Frana (2005) suggested that adults observed on alfalfa during the end of winter and the beginning of spring (September and October), are winter survivors.

Although the period of year in which the number of adults of *P. guildinii* on sweet pittosporum and privet trees was similar, the higher constancy on sweet pittosporum suggests that adults preferred sweet pittosporum as an alternative plant. Panizzi and Grazia (2001) reported that *P. guildinii* occurred in small number on privet trees. The major caught of adult populations on sweet pittosporum, on privet trees and on bamboo during April and May was probably due to dispersion of bugs from areas where soybean was harvested to any available host (Panizzi and Grazia, 2001). In the different surveys that reported the presence of *P. guildinii* on different plant species belonging to several families (Ferreira and Panizzi 1982; Panizzi and Slansky 1985a; Costa et al. 1995; Bunde et al. 2010; Garlet et al. 2010), sweet pittosporum and bamboo were not mentioned.

The two periods with highest recorded caught on forage legumes indicate that at latitude between 33° 55' S and 34° 17' S during spring-summer, at least two generations of *P. guildinii* may occur. This is supported by the results obtained by Zerbino et al. (2013) in the laboratory when studied the *P.guildinii* biology under similar summer conditions (14 h of photophase and 25 °C), which showed that the time from eggs to adult death was approximately 63 days.

Piezodorus guildinii adults collected in different seasons showed differences in physiology and morphology. Adults collected in spring-summer and autumn-winter differed in body size, lipid content, degree development of the reproductive organs and (particularly females) in the color of the pronotum band and connexivum.

In autumn and winter, when the photophase is < 12 h and temperature decreases,

adults displayed particular traits, all of which indicate reproductive diapause. During autumn and winter a high proportion of females and males showed immature reproductive organs, confirming the results obtained in the laboratory by Zerbino et al. (2014), who demonstrated that the decrease in photophase and temperature prevents maturation of ovaries and testes by inducing reproductive diapause. The proportions of females and males with immature reproductive organs in autumn/winter months (April to September) suggest that diapause in males terminates earlier and/or it is less intense than that of females. Therefore, males are physiologically ready to start reproduction earlier in the season than females. Studies with different species of pentatomids showed that reproductive diapause is often induced by a photoperiod of about 12 h or less in many species (Ali and Ewiess 1977; Albuquerque 1993; Hodek and Hodková 1993; Kobayashi and Numata 1995; Nakamura and Numata 1997; Mourão and Panizzi 2002; Chocorosqui and Panizzi 2003; Musolin and Numata 2003; Niva and Takeda 2003).

When adults of *P. guildinii* had immature reproductive organs, the body lipid content in both sexes was higher than in spring and summer. Zerbino et al. (2014) in laboratory studies demonstrated that lipid accumulation was more pronounced in adults raised at 10 h photophase and 20 °C, than for those reared at a 14 h photophase at 25 °C, whose levels of lipid storage remained approximately at the same level during the whole adult life. Building up of lipid reserves is one of the most consistent features of insect entering diapause (Danks 1987; Ito 1985; Chocorosqui and Panizzi 2003), which enhances surviving and longevity under adverse conditions (Ito 1985; Panizzi and Hirose 1995).

At the same time when diapausing adults accumulate lipids, the structure of both external and internal systems may be modified, which often results in changes in color or size (Danks 1987). The maximum body size of adults was recorded during summer, and then it began to decrease gradually reaching the minimum size in late autumn. Zerbino et al. (2014) in the laboratory found that adult body size was under photoperiod control.

Few studies had been found that assessed the effects of abiotic factors on the size or shape of pentatomids. In species with shoulder spines, such as *Euchistus*

servus (Say), *Oebalus poecilus* (Dallas), *E. heros* (Fabr.), and *Dichelops melacanthus* (Dallas), the size and shape of the spines were affected by photoperiod (McPherson 1974; Albuquerque 1993; Mourão and Panizzi 2002; Chocorosqui and Panizzi 2003). Niva and Takeda (2003) showed for *Halyomorpha halys* (Stål) that under a short photophase the head and pronotum widths were significantly reduced. Nakamura (2002) reported that *Dolycoris baccarum* (L.) adults reared at 25 °C under long photoperiod conditions (16:8 h L:D) were larger than those raised under a short photoperiod (12:12 h L:D). Moreover, Musolin et al. (2010) determined that *N. viridula* adults were larger under naturally decreasing photoperiod and temperature when they had a longer developmental time.

Multiple environmental factors such as food, temperature, season length, photoperiod and humidity, affect body size producing recurrent patterns (Blanckenhorn 2009). In general, small body sizes are produced in unfavorable environment. Temperature is an exception, because low temperatures reduce growth but nevertheless result in larger body size (Danks 1987, Blanckenhorn 2009). Photoperiod may override the effect of temperature (Atkinson 1994).

Body size is one of the most important life-history traits because it is correlated with numerous physiological and fitness traits, such as fecundity and survivorship (Danks 1987; Honěk 1993; Nylin and Gotthard 1998). Results obtained in this study indicate that body size of *P. guildinii* may be associated with reproductive performance (Zerbino et al., 2013, 2014).

On the other hand, in late summer, when the proportion of females with immature reproductive organs began to raise, there was a substantial increase in the percentage of females that had clear pronotum band and clear connexivum, reaching values of 100% in winter (August and September). Takeda et al. (2010) determine that *N. viridula* started to change of body colour in the beginning of autumn, and the proportion of dark individuals peaked at the end of this season. The results obtained may indicate that the color changes are regulated by day light length and are correlated with the physiological state of the individuals (Musolin and Numata 2003; Musolin et al. 2007). Musolin (2012) reported that colour change in *N. viridula* adult is strongly associated with gonadal development. Changes in colour in diapause

individuals may result from different pigmentation (Danks 1987). Several works with different species of pentatomids established that color changes are related to diapause in general; the main trend in seasonal coloration change is the prevalence of dull texture of the integuments in overwintering insects. This makes them less conspicuous, providing passive protection from predators (Saulich and Musolin 2012).

The results obtained in these studies elucidate the seasonal occurrence year around and the main host plants and overwintering niches of *P. guildinii* in southern South America. Results demonstrated the existence of different seasonal forms and also showed that adults remain in diapause during autumn and winter. The diapause associated traits found in field-collected adults confirmed results previously obtained in the laboratory (Zerbino et al. 2014). Alfalfa appears to be the preferred host of Redbanded stink bug and is a breeding host prior to soybean infestation. Therefore, the management of *P. guildinii* population during spring on alfalfa may reduce the impact of this stink bug to the following crops, e.g., soybean.

Acknowledgments This research is a part of a project sponsored by the National Research Council of Brazil (CNPq) in collaboration with INIA of Uruguay. We thank Mabel Pessio and Eduardo García for their labor support in the field and laboratory. We gratefully acknowledge two anonymous referees for their critical reading and improving the manuscript.

References

- 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 Prot. 12: 627-630
- 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). Z. Ang. Entomol. 84: 256-264

- Atkinson D (1994) Temperature and organism size- A biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25: 1-58
- Blanckenhorn WU (2009). Causes and consequences of phenotypic plasticity in body size: The case of the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae). In: Whitman DW, Ananthakrishnan TN (eds) Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanism and Consequences, Enfield, USA, pp 313-366
- Bunde PRS, Grazia J, Mendonça MS Jr, Schwertner CF, Silva EJE, Garcia ÉN (2010) Pentatomídeas (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: 83-88
- Costa EC, Borgoni PC, Bellomo VH (1995) Percevejos coletados em copas de diferentes espécies florestais. Pentatomídeas-1. *Ciencia Florestal Santa Maria* 5: 123-128
- Chocorosqui VR, Panizzi AR (2003) Photoperiodic influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Braz. J. Biol.* 63: 655-664
- Danks HV (1987) Insect dormancy: an ecological perspective. *Biological Survey of Canada Monographs series No 1*
- Esquivel JF (2009) Stages of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae): Improved visualization. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102: 303-309
- Ferreira BSC, Panizzi AR (1982) Percevejos pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. *Anais II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja* 2:140-151
- Fraga CP, Ochoa LH (1972) Aspectos morfológicos y bioecológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera, Pent.). *Revista IDIA-Suplemento*, 28:103-117
- Garlet J, Roman M, Corrêa Costa E (2010) Pentatomídeos (Hemiptera) associados a espécies nativas em Itaara, RS, Brasil. *Revista Biotemas* 23:91-96

- 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
- Hallman G (1979) Importancia de algunas relaciones naturales plantas-artrópodos en la agricultura de la zona cálida del Tolima central. *Revista Colombiana de Entomología* 5: 19–26
- Hodek I, Hodková M (1993) Role of temperature and photoperiod in diapause regulation in Czech populations of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *Eur. J. Entomol.* 90: 95-98
- Honěk A (1993) Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66: 483-492
- Ito K (1985) Seasonal changes of lipid content in adult *Cletus punctiger*. *Appl. Entomol. Zool.* 20:350-351.
- Jones WA Jr, Sullivan MJ (1982) Role of host plants in population dynamics of stink bug pests on soybean in South Carolina. *Environ. Entomol.* 11: 867–875
- 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*. *Zool. Sci.* 12:343-348
- Lopes OJ, Link D, Basso IV (1974). Pentatomídeos de Santa Maria—lista preliminar de plantas hospedeiras. *Revista do Centro de Ciências Rurais* 4: 317–322
- Massoni F, Frana J (2005) Si no es en soja ¿las chinches dónde están? INTA – Información técnica cultivos de verano. Campaña 2005. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea 104: 100-102
- McPherson JE (1974) Photoperiodic effects in a southern Illinois population of the *Euschistus tristigmus* complex (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67: 943-952
- Mourão APM, Panizzi AR (2002) Photophase influence on the reproductive diapauses, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1978) (Hemiptera Pentatomidae). *Braz. J. Biol.* 62: 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. *Physiol. Entomol.* 37: 309-322
- Musolin DL, Fujisaki K, Numata H (2007) Photoperiodic control of diapause termination, color change and postdiapause reproduction in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Physiol. Entomol.* 32: 64-72
- Musolin DL, Numata H (2003) Photoperiodic and temperature control of diapause induction and colour change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. *Physiol. Entomol.* 28: 65-74
- Musolin DL, Tougou D, Fujisaki K. 2010. Too hot to handle? Phenological and life history responses to simulated climate change of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera:Pentatomidae). *Glob. Change Biol.* 16:73-87
- Nakamura K (2002) Effect of photoperiod on the size-temperature relationship in a pentatomid bug, *Dolycoris baccarum*. *J. Therm. Biol.* 27:541-546
- Nakamura K, Numata H (1997) Seasonal life cycle of *Aelia fieberi* (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to the phenology of its host plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 625-630
- Niva CC, Takeda M (2003) Effects of photoperiod, temperature and melatonin on nymphal development, polyphenism and reproduction in *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zool. Sci.* 20: 963-970
- Nylin S, Gotthard K (1998) Plasticity in life-history traits. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 63-83
- Panizzi AR (1985) *Sesbania aculeata*: nova planta hospedeira de *Piezodorus guildinii* no Paraná. *Pesqui. Agropecuária Brasileira* 20: 1237-1238
- Panizzi AR (1987) Impacto de leguminosas na biologia de ninfas e efeito da troca de alimento no desempenho de adulto de *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira Biologia* 47: 585-591

- Panizzi AR (1992) Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of Indigofera legumes. Entomol. Exp. Appl. 63: 221-228
- Panizzi AR (1997) Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. Annu. Rev. Entomol. 42: 99-122
- 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, Grazia J (2001) Stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) and an unique host plant in the Brazilian subtropics. Iheringia, Sér. Zool. 90: 21-25
- 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*. Entomol. Exp. Appl. 76: 247-253
- Panizzi AR, McPherson DG, Javahery JM, McPherson RM (2000) Stink bugs (Pentatomidae). In: Schaefer CW, Panizzi AR (eds) Heteroptera of Economic Importance, CRC Press, Boca Raton, pp 421-474
- Panizzi AR, Silva FAC (2009) Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). In: Panizzi AR, Parra JRP (eds) Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas, Embrapa Informação Tecnológica, Brazil, pp 465-522
- Panizzi AR, Slansky F Jr (1985a) Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. Fla. Entomol. 68: 184-214
- Panizzi AR, Slansky F Jr (1985b) New host plants records for the stink bug *Piezodorus guildinii* in Florida (Hemiptera: Pentatomidae). Fla. Entomol. 68: 215-216
- SAS Institute (2008) SAS user's guide, release 9.2 ed. SAS Institute, Cary, NC
- Saulich AKh, Musolin DL (2012) Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone. Entomol. Rev. 92: 1-26

- Takeda K, Musolin DL, Fujisaki K (2010) Dissecting insect responses to climate warming: overwintering and post diapause performance in the southern green stink bug, *Nezara viridula*, under simulated climate change conditions. *Physiol. Entomol.* 35: 343-353
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR (2013) Effect of photoperiod and temperature on nymphal development and adult reproduction of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *Fla Entomol.* 96: 572-582
- Zerbino MS, Altier N, Panizzi AR (2014) Phenological and physiological changes in adult *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) due to variation in photoperiod and temperature. *Fla Entomol.* 97:734-743