

Dispersión de adultos de *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) entre cultivos de soja y de alfalfa

Miguel Lucía¹, Panizzi Antônio Ricardo², Zerbino María Stella^{3*}

¹Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas (MGAP-DGSA), Millán 4703, Montevideo

²EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Caixa Postal 3081. 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil

³INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay
Correo electrónico: mszerbino@gmail.com

Recibido: 11/08/2017 Aceptado: 20/06/2018

Resumen

Se estudió la dispersión de adultos de *Piezodorus guildinii* entre cultivos adyacentes de soja y alfalfa. Desde el inicio de la formación de vainas de la soja (R3) hasta semilla completamente desarrollada (R6), se aplicaron semanalmente en cada cultivo proteínas marcadoras (alfalfa = caseína bovina, soja = proteína de soja). En ambos cultivos se establecieron dos transectos separados por 12 m, con siete puntos de muestreo cada 7,5 m. Los insectos fueron colectados con red entomológica en las 48 horas posteriores a cada aplicación. Luego se realizaron inmunoensayos ELISA indirectos. En total se colectaron 464 adultos de *P. guildinii*, 166 en soja y 298 en alfalfa. El 72,41 % fueron positivos al menos para una proteína. La eficiencia de marcado fue 53,61 y 89,10 % para caseína bovina y proteína de soja, respectivamente. Los insectos se movieron de manera unidireccional y bidireccional entre los cultivos. Los movimientos unidireccionales predominantes fueron desde la soja, lo que sugiere que la presencia de un cultivo de alfalfa sin cortes cerca del cultivo de soja reduce la colonización de *P. guildinii* en este último cultivo. La distancia de dispersión varió entre 2,5 y 47,5 metros; con una media de 17,4 metros. Los resultados indican que la técnica de inmunomarcado de adultos de *P. guildinii* es útil para conocer cómo este insecto usa parches adyacentes de hábitat, lo que contribuirá a diseñar estrategias de manejo de plagas.

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

Dispersion of *Piezodorus guildinii* Adults (Hemiptera: Pentatomidae) between Soybean and Alfalfa Crops

Summary

We studied the dispersion of *Piezodorus guildinii* adults between adjacent soybean and alfalfa fields. From the beginning of soybean pod formation (R3) until fully developed seed (R6), marker proteins (alfalfa = bovine casein, soybean = soy protein) were applied weekly in each crop. In both crops, two transects were established separated by 12 m between each other, with seven sampling points established at every 7.5 m. Stink bugs were collected using a sweep net in the 48 hours after each application of protein markers. Immunoassays were performed using ELISA. In total, 464 adults of *P. guildinii* were collected, 166 from soybean and 298 from alfalfa. Seventy two point four per cent were positive for at least one of the proteins. The marking efficiency was 53.6 and 89.1 % for bovine casein and soy protein, respectively. Stink bugs moved unidirectionally and bidirectionally between crops. Predominant unidirectional movements were from soybean, suggesting that uncut alfalfa near the soybean crop during the reproductive period of soybean reduces the colonization of *P. guildinii* in the latter crop. Dispersion distances ranged from 2.5 to 47.5 m, with an average of 17.4 m. The results indicate that the immunomarking technique of *P. guildinii* adults may be used to learn how populations use adjacent patches of habitat and to design farmscape pest management strategies.

Keywords: red-banded stinkbug, movement between crops, immunomarking technique

Introducción

En Uruguay, al igual que en otros países de la región, el complejo de hemípteros fitófagos (Hemiptera: Pentatomidae) es un grupo de insectos que tiene potencial de causar importantes pérdidas económicas en el cultivo de soja, *Glycine max* L (Fabales: Fabaceae) (Panizzi et al., 2000; Panizzi, 1997). Las principales especies que colonizan este cultivo son *Dichelops furcatus* (Fabricius), *Edessa mediotabunda* (Fabricius), *Nezara viridula* (Linnaeus) y *Piezodorus guildinii* (Westwood). De todas ellas, *P. guildinii* se destaca particularmente, porque es la más abundante y la que causa los mayores daños en la superficie y profundidad de los granos (Zerbino, Altier y Panizzi, 2016; Depieri y Panizzi, 2011; Ribeiro y Castiglioni, 2009; Ribeiro et al., 2009; Zerbino y Alzugaray, 2003, 1994).

Piezodorus guildinii al igual que otros hemípteros fitófagos que se alimentan de semillas, coloniza distintas especies vegetales según su fenología. Recientemente en Uruguay se determinó que la alfalfa, *Medicago sativa* L. (Fabales: Fabaceae) es la principal planta huésped alternativa, la cual es colonizada antes y después del cultivo de soja. Por lo tanto, el desarrollo de tácticas de manejo a aplicar durante la primavera en alfalfa, podría interferir en el desarrollo de la población que posteriormente coloniza la soja (Miguel, 2017; Zerbino, Altier y Panizzi, 2016, 2015). Para ello es necesario conocer los patrones de movimiento de los insectos entre ambos cultivos, así como el momento y la manera en que se producen los mismos (Huang, 2012; Panizzi y Parra, 2009; Panizzi, 1997; Zerbino, Altier y Panizzi, 2015).

Para el estudio del movimiento de los insectos son utilizadas técnicas de marcación que consisten en la marca-liberación-recaptura o en la marca y captura (inmunomarcado). Los métodos de marca-liberación-recaptura de insectos tienen importantes limitaciones, que pueden conducir a conclusiones equivocadas. Se basan en liberar y recapturar insectos marcados en un número limitado de sitios (Pilkay, 2013; Hagler y Jackson, 2001; Reynolds et al., 1997) y en general las marcas son aplicadas a individuos que se crían en el laboratorio (Huang y Toews, 2012; Hagler y Jones, 2010; Boina et al., 2009; Tillman et al., 2009; Jones et al., 2006; Hagler y Jackson, 2001, 1998; DeGrandi-Hoffman y Hagler, 2000; Hagler, 1997; Hagler et al., 1992).

Estas restricciones fueron superadas por la técnica del inmunomarcado, que consiste en aplicar una proteína a un cultivo, la cual marca a los insectos por contacto o posteriormente por contaminación cuando se desplazan sobre las superficies marcadas. Las marcas de proteína de los

insectos recolectados son identificadas mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Blaauw, Jones y Nielsen, 2016; Jones et al., 2006; Hagler y Jackson, 1998; Hagler, 1997; Hagler et al., 1992). Las alteraciones que este método puede causar en el movimiento natural de los insectos y en su dispersión en el espacio y el tiempo son insignificantes. En la actualidad, este es el método que tiene menos sesgo y que permite determinar con mayor precisión el movimiento de los insectos entre las diferentes especies vegetales (Jones et al., 2006). Otras ventajas son que permite el uso simultáneo de distintas proteínas, por lo que es posible estudiar el movimiento inter o entre áreas, y que la técnica de ELISA se caracteriza por ser sencilla, sensible, de bajo costo y permitir el análisis simultáneo de un importante número de muestras (Blaauw, Jones y Nielsen, 2016; Bastola et al., 2014; Hagler et al., 2014; Sanders y Carpenter, 2014; Huang, 2012; Hagler y Jones, 2010; Horton, Jones y Unruh, 2009; Jones et al., 2006; Hagler y Miller, 2002; Hagler y Jackson, 2001). El inmunomarcado fue utilizado de manera eficiente en el estudio del movimiento de varios grupos de insectos, entre los que se incluyen diferentes especies de hemípteros fitófagos en diversos cultivos (Blaauw, Jones y Nielsen, 2016; Bastola et al., 2014; Hagler et al., 2014; Sanders y Carpenter, 2014; Huang, 2012; Irvin, Hagler y Hoodle, 2012; Hagler y Jones, 2010; Boina et al., 2009; Horton, Jones y Unruh, 2009; Shrestha et al., 2009; Jones et al., 2006; Hagler y Miller, 2002; DeGrandi-Hoffman y Hagler, 2000; Hagler et al., 1992).

Los estudios de ocurrencia estacional de *P. guildinii* realizados en el noroeste y suroeste de Uruguay (Miguel, 2017; Zerbino, Altier y Panizzi, 2015) sugieren que este insecto se dispersa entre cultivos de soja y alfalfa de acuerdo a la fenología, sin embargo estos estudios carecen de la evaluación cuantitativa o cualitativa del movimiento que realiza este insecto. El objetivo del este trabajo fue estudiar la dispersión local de *P. guildinii* entre cultivos de soja y alfalfa mediante la técnica de inmunomarcado.

Materiales y métodos

Área experimental

El experimento fue realizado en la Estación Experimental INIA- La Estanzuela, Colonia (34° 20'18" S, 57° 41'25" O) durante 2014/15. En dos parcelas de 45 por 36 m (1620 m²) separadas entre sí por 2,5 m, se sembraron un cultivo de alfalfa (CV Chaná) en setiembre y un cultivo de soja (CV NA5909) en diciembre. El manejo de fertilización y

herbicidas realizado en ambos cultivos fue el recomendado, y en ninguno de ellos se aplicó insecticidas. La alfalfa permaneció sin cortes durante el período de estudio.

Aplicación de proteínas

Entre los estados fenológicos de la soja, inicio de formación de vainas (R3) y semilla completamente desarrollada (R6) (según escala fenológica de Fehr et al., 1971), en seis momentos (9, 16, 22 y 29 de marzo; 7 y 15 de abril) se aplicaron las proteínas marcadoras en los cultivos.

Las proteínas utilizadas como antígenos fueron leche de soja en polvo (diluida al 10 % en agua) y leche bovina en polvo (diluida al 20 % en agua), las cuales fueron aplicadas sobre la soja y la alfalfa, respectivamente. La aplicación fue realizada con una pulverizadora de mochila de presión constante (CO₂) con una barra de aplicación de seis boquillas tipo abanico, con ángulo de 110°, separadas 50 cm entre sí. Luego de la aplicación de cada proteína, el equipo de aplicación fue lavado durante tres minutos, a efectos de evitar la contaminación entre proteínas. No se registraron precipitaciones entre el momento de aplicación de las proteínas y la colecta de los insectos durante las seis semanas de ejecución del experimento.

Colecta de insectos

En cada cultivo se establecieron dos transectos separados por 12 metros entre sí, y en cada uno de ellos se identificaron siete puntos de muestreo con es-

tacas (0-7,5-15-22,5-30-37,5-45 m) (Figura 1). En las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de las proteínas se realizó la colecta de adultos con red entomológica, para lo que se hicieron 20 redadas alrededor de la estaca de cada punto de muestreo. Los adultos fueron colocados individualmente en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con la respectiva identificación de procedencia (cultivo, transecto, punto de muestreo y fecha de colecta), para ser conservados a -20 °C hasta el momento de realizar los análisis de la determinación de las proteínas.

En la colecta de los adultos en cada cultivo se utilizaron redes entomológicas distintas, de modo de impedir la contaminación cruzada entre proteínas. Al finalizar los muestreos de cada aplicación, las redes fueron lavadas tres veces con agua y jabón.

ELISA

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

Los anticuerpos primarios utilizados fueron conejo anti-soja (R45254, R-Biopharm) diluido (1:4000) en Starting-Block (37538, Pierce Biotechnology) para leche de soja y

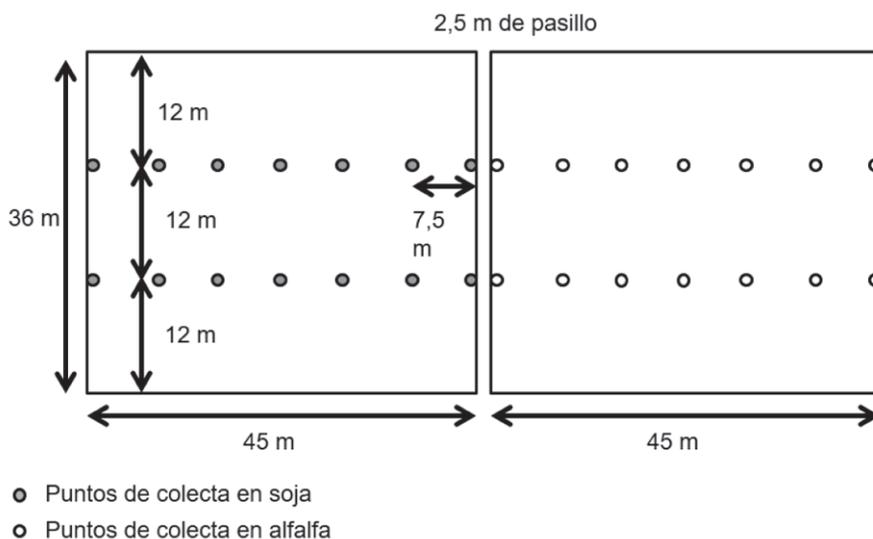


Figura 1. Diagrama de la instalación de parcelas de soja y alfalfa para estudiar la dispersión de *Piezodorus guildinii* ente los cultivos en diferentes distancias (m)

conejo anti-caseína bovina (ab166596, Abcam) diluido (1:500) en PBS + 20 % suero bovino (A9647, Sigma-Aldrich) para la leche bovina. En ambos protocolos, como anticuerpo secundario se utilizó burro anti-conejo IgG (H+L) (31458, Pierce Biotechnology) diluido (1:8000) en Starting-Block.

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

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

Posteriormente, las placas de los dos antígenos se lavaron una vez con 300 μ l de PBST por pocillo y se agregaron 80 μ l del anticuerpo primario correspondiente, y fueron incubadas nuevamente. En el caso de la leche de soja, la misma se realizó durante 30 minutos a 37 °C, mientras que para la leche bovina se efectuó durante la noche a 4 °C. Luego, los anticuerpos fueron descartados y las placas se lavaron cinco veces con PBST a razón de 300 μ l por pocillo. A continuación, se agregaron 80 μ l de la dilución del anticuerpo secundario y durante dos horas se incubaron a 37 °C. Después de descartar el anticuerpo secundario, cada pocillo de las placas se lavó tres veces con 300 μ l de PBS-SDS y a continuación dos veces con 300 ml de PBS. Seguidamente, se agregaron 80 μ l de TMB (ImmunoPure, kit de sustrato TMB Ultra 34028, Pierce Biotechnology) a cada pocillo.

Finalizado este proceso, las placas con proteína de soja y de leche bovina fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 y 30 minutos, respectivamente. Para detener la reacción colorimétrica, posteriormente se agregaron 80 μ l de H₂SO₄ 2N en cada pocillo. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió con un lector de placas de doble longitud de onda a 450 nm usando 490 nm como patrón de referencia (Termo Scientific Multiskan GO Micro-

plate Spectrophotometer). Todas las lecturas se corrigieron en función del valor del buffer de extracción (TBS + EDTA) (blanco). Cuando el valor de DO detectado fue mayor que el doble del control negativo, ese ejemplar fue considerado positivo para la proteína analizada.

Análisis de datos

A efectos de determinar el movimiento entre los cultivos, los adultos de *P. guildinii* colectados se tipificaron en cuatro categorías de acuerdo a las marcas detectadas: (I) *residentes*, aquellos marcados con la proteína aplicada en el cultivo donde fueron colectados. (II) *inmigrantes con una marca de proteína* diferente a la proteína aplicada en el cultivo donde se colectaron, que indica que se trasladaron de un cultivo a otro, (III) *inmigrantes con dos marcas de proteínas*, este grupo está integrado por aquellos que realizaron movimientos entre ambos cultivos (ida y vuelta), y los que fueron marcados durante la aplicación de la proteína y se trasladaron al otro cultivo y se marcaron con la proteína aplicada en este último (IV) *sin marca*, que incluye a los insectos que la técnica no detectó marca ya sea porque fue muy débil o porque no estaban marcados.

El análisis de los valores medios de colecta de las cuatro categorías se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, dado que son variables discretas, que tuvieron varianza heterogénea y se encontró asociación entre la media y la varianza. Cada momento de aplicación de las proteínas se consideró como repetición. El software utilizado en todos los análisis estadísticos fue InfoStat con interfaz con el software R.

Fue calculada la eficiencia de marcado (EfM) de las proteínas, que es el cociente entre el número total de insectos marcados con la proteína específica aplicada en ese cultivo (tMpe) (incluye residentes e inmigrantes con una y dos marcas), y la suma del total de insectos colectados en ese cultivo [tC (cultivo)] más los insectos inmigrantes en el otro cultivo [InMpe (otro cultivo)] (incluye inmigrantes con una y dos marcas). Por ejemplo, para la proteína aplicada en alfalfa este cálculo sería: tMleche de vaca (total de marcados con leche de vaca) / ([alfalfa (total colectado en alfalfa) + InMleche de vaca (individuos marcados con proteína de leche de vaca colectados en la soja)]. La comparación de la eficiencia media de marcado (EfmM) de las proteínas se realizó mediante una prueba t (Proc TTEST, SAS Institute, versión 9.2), donde la EfM de cada aplicación fue considerada una repetición.

El análisis del efecto de los cultivos y de la fenología de la soja en la colecta de las cuatro categorías se realizó

mediante modelos lineales generalizados (PROC Genmod, SAS Institute, versión 9.2). La separación de medias se realizó con una prueba de LSD con $\alpha = 0,05$.

En el estudio de la dispersión sólo fueron considerados los adultos inmigrantes con una sola marca de proteína. La distancia mínima de dispersión fue la variable considerada para el análisis. Esta es la distancia que existe entre el punto cero del cultivo donde el insecto obtuvo la marca (Figura 1) y el lugar de colecta en el otro cultivo. A efectos de determinar si la fenología de la soja tuvo efectos en la distancia mínima de dispersión, se realizó un análisis con modelos lineales generales (PROC GLM, SAS Institute, versión 9.2). El diseño experimental fue de bloques al azar y cada transecto fue considerado una repetición. Los valores de distancia fueron transformados a logaritmo a efectos de corregir la heterogeneidad de la varianza. Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey-Kramer Honestamente Significativa (HSD) ($P \leq 0,05$).

Resultados

Durante las seis semanas de estudio fueron colectados 464 adultos de *P. guildinii*, de los cuales 298 provenían de

la alfalfa y 166 de la soja. En promedio en cada muestreo el número de adultos colectados, con y sin marca de las proteínas fue semejante en ambos cultivos (Cuadro 1). Ambos sexos estuvieron representados en proporciones similares (57,3 % fueron hembras y 42,7 % machos).

Eficiencia de marcado

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

La EfM con proteína de soja fue superior a la de caseína bovina en cinco de las seis aplicaciones realizadas. En consecuencia, los valores medios de EfM de proteína de soja (89,1 %) y caseína bovina (53,6 %) fueron significativamente diferentes entre sí ($t = 3,25$; $gl = 10$; $P = 0,0088$) (Cuadro 2).

Movimiento entre cultivos

En alfalfa y soja se registraron las cuatro categorías de insectos establecidas (sin marca, residentes, inmigrantes con una y dos marcas de proteína). Los residentes fueron

Cuadro 1. Número medio de adultos (\pm EEM) de *Piezodorus guildinii* colectados en cultivos de alfalfa y de soja durante el período marzo-abril 2014 (La Estanzuela, latitud S 34° 20' y longitud W 57° 41').

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

¹ Número de aplicaciones de proteínas

² Estadístico de Kruskal-Wallis

Cuadro 2. Número de adultos total y marcados de *Piezodorus guildinii* colectados y eficiencia media de marcado (\pm EEM) de la caseína bovina y proteína de soja (La Estanzuela, latitud S 34° 20' y longitud W 57° 41').

Estado fenológico de la soja ¹	N° de adultos colectados		EfM ² (%)	
	Total	Marcados	Caseína bovina	Proteína de soja
R3	82	40	22,2	100,0
R4	81	56	47,1	78,7
R5.1	61	47	64	84,4
R5.3	81	61	45,7	86
R5.5	123	99	64,4	76,9
R6	36	33	78,3	70,8
Total	464	336	Promedio ³ 53,6 \pm 8,0 a	89,1 \pm 3,2 b

¹ Momentos en que fueron realizadas las aplicaciones de las proteínas

² Eficiencia de marcado

³ Eficiencia media de marcado

el grupo mayoritario en los dos cultivos durante todo el período de estudio. En ambos cultivos los valores registrados en los distintos momentos de aplicación fueron semejantes entre sí ($\chi^2 = 3,49$; $P = 0,0619$). En cada cultivo, hubo diferencias en el número de adultos colectados en las distintas aplicaciones ($\chi^2 = 11,67$; $P = 0,0396$) (Cuadro 3). En los dos cultivos, el número de adultos registrados en la quinta aplicación, cuando el cultivo de soja se encontraba en R5.5, fue significativamente mayor respecto al valor registrado en la primera y sexta aplicación, cuando la soja se encontraba en R3 y R6, respectivamente (Cuadro 3).

En los grupos de inmigrantes con dos marcas y una marca de proteína, la cantidad de adultos colectada fue significativamente mayor en alfalfa (dos marcas $\chi^2 = 22,91$; $P < 0,0001$; una marca $\chi^2 = 46,30$; $P < 0,0001$). Para los inmigrantes con dos marcas, las diferencias entre ambos cultivos fueron debidas a los valores obtenidos en la cuarta y quinta aplicación de proteínas, cuando la soja se encontraba en R5.3 y R5.5 (Cuadro 3). En el caso de los inmigrantes con una marca de proteína, las diferencias entre cultivos fueron registradas en todas las aplicaciones. En ambos grupos de inmigrantes, dentro de cada cultivo, el número de adultos colectados en las seis aplicaciones fue

Cuadro 3. Número medio de adultos de *Piezodorus guildinii* (\pm EEM) de las distintas categorías colectados en cultivos de alfalfa y soja de acuerdo al estado fenológico de la soja (La Estanzuela, latitud S 34° 20' y longitud W 57° 41').

Categoría	Estado fenológico de la soja	Nº	Alfalfa	Soja
Residentes	R3	14	0,79 \pm 0,33 a A ²	0,71 \pm 0,32 a A
	R4	14	1,29 \pm 0,29 ab A	1,50 \pm 0,40 ab A
	R5.1	14	0,79 \pm 0,35 ab A	1,93 \pm 0,56 ab A
	R5.3	14	0,71 \pm 0,27 ab A	2,07 \pm 0,62 ab A
	R5.5	14	2,14 \pm 0,45 b A	1,71 \pm 0,48 b A
	R6	14	0,64 \pm 0,17 a A	0,93 \pm 0,53 a A
	Promedio			1,06 \pm 0,23 A
Inmigrantes dos marcas	R3	14	0,21 \pm 0,011 a A	0,14 \pm 0,10 a A
	R4	14	0,43 \pm 0,17 a A	0 a A
	R5.1	14	0,14 \pm 0,10 a A	0,21 \pm 0,15 a A
	R5.3	14	0,64 \pm 0,25 a B	0,14 \pm 0,14 a A
	R5.5	14	1,93 \pm 0,55 a B	0,07 \pm 0,07 a A
	R6	14	0,57 \pm 0,25 a A	0 a A
	Promedio			0,66 \pm 0,27 B
Inmigrantes una marca	R3	14	1,00 \pm 0,38 a A	0 a B
	R4	14	0,79 \pm 0,33 a A	0 a B
	R5.1	14	0,29 \pm 0,22 a A	0 a B
	R5.3	14	0,79 \pm 0,33 a A	0 a B
	R5.5	14	1,21 \pm 0,33 a A	0 a B
	R6	14	0,14 \pm 0,09 a A	0,07 \pm 0,07 a B
	Promedio			0,70 \pm 0,17 B

¹ Momentos en que fueron realizadas las aplicaciones de las proteínas

² En cada categoría, Medias seguidas por la misma letra minúscula para las columnas y mayúsculas para las filas no son significativamente diferentes basado en el estadístico de máxima verosimilitud ($P \leq 0,05$)

³ Número de muestreos

semejante. En soja sólo se registró colecta de inmigrantes con una sola marca cuando se realizó la sexta aplicación de proteínas, cuando se encontraba en R6 (Cuadro 3).

Distancia

Como consecuencia de la ausencia de registro de movimiento desde la alfalfa hacia la soja, en la evaluación de la mínima distancia de dispersión sólo se tuvo en cuenta la colecta de los adultos inmigrantes con marca de proteína de soja. En el promedio de las seis aplicaciones, el 46 % del total de adultos realizaron movimiento hasta la distancia de 10 m de la alfalfa (Figura 2).

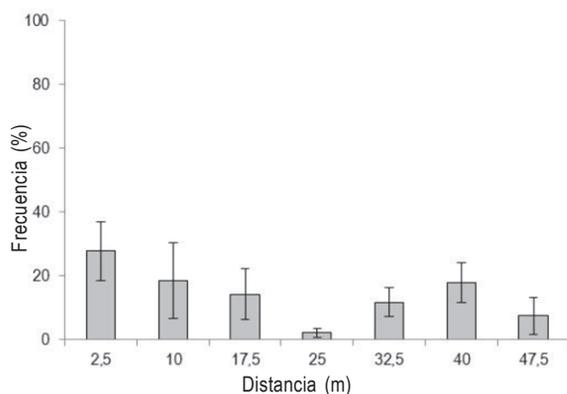


Figura 2. Frecuencia de colecta de adultos de *Piezodorus guildinii* con movimiento unidireccional (desde soja a alfalfa) en las diferentes distancias (La Estanzuela, S 34° 20' W 57° 41').

Los valores de distancia mínima de dispersión estimados en las distintas aplicaciones de proteínas fueron semejantes entre sí ($F_{5,5} = 1,93$; $P = 0,2435$). En promedio, la distancia de dispersión fue de 17,4 m, con un mínimo de 2,5 m y un máximo de 47,5 m (Cuadro 4). Si se considera que algunos de los adultos inmigrantes con dos marcas de proteína pueden haber realizado movimientos de ida y vuelta, la distancia mínima recorrida en este caso fue aproximadamente de 30,7 m.

Discusión

La técnica de inmunomarcado utilizada permitió determinar los patrones de movimiento de adultos *P. guildinii* silvestres entre cultivos de soja y de alfalfa. La dispersión de las poblaciones de hemípteros desde un hospedero a otro fue reportada previamente, aunque los movimientos generalmente fueron inferidos por las capturas temporales en diferentes cultivos (Miguel, 2017; Zerbino, Altier y Panizzi, 2015; Tillman et al., 2009; Tillman, 2006; Panizzi et al., 1980). Dado que la técnica de inmunomarcado es relativamente nueva, los escasos estudios de dispersión de pentatómidos realizados utilizaron el método de marca-liberación-recaptura con poblaciones de insectos provenientes de cría en laboratorio (Blaauw, Jones y Nielsen, 2016; Huang, 2012; Tillman et al., 2009; Tillman, 2006; Costa y Link, 1982; Panizzi et al., 1980). Jones et al. (2006) consideran que la tasa de recaptura del método de marca-liberación-recaptura es muy baja en general y además este método tiene como

Cuadro 4. Mínima distancia media de dispersión (\pm EEM) de adultos de *Piezodorus guildinii* desde la soja hacia la alfalfa en distintos estados fenológicos de la soja (La Estanzuela, latitud S 34° 20' y longitud W 57° 41').

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

¹ Momentos en que fueron realizadas las aplicaciones de las proteínas

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

inconveniente que la liberación de todos los individuos marcados se realiza desde un sólo sitio, por lo que analiza el comportamiento de la dispersión de manera sesgada.

El porcentaje de individuos marcados obtenido en este trabajo fue similar a los valores reportados para otros pentatómidos en otros sistemas agrícolas donde se utilizó la misma técnica. En este estudio el 58,8 % del total de los adultos capturados estuvo marcado con una proteína y el 13,6 % con dos proteínas. Blaauw, Jones y Nielsen (2016) cuando estudiaron los patrones de movimiento y distribución de *Halyomorpha halys* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) en el cultivo de duraznero, reportaron valores de 53,8 % y 9,5 %, con una y dos proteínas respectivamente. Huang (2012) en el cultivo de algodón determinó que el 57,3 % y el 23,6 % de los pentatómidos fitófagos tenía al menos una y dos marcas, respectivamente.

La EfM promedio fue superior con la proteína de soja. Estas diferencias pueden ser debidas a la proteína misma o a la arquitectura de planta de los cultivos. En este estudio ambos efectos están confundidos. La bibliografía disponible menciona que la detección y retención de la caseína bovina es mayor que la de proteína de soja (Hagler et al., 2014; Klick et al., 2014; Hagler y Jones, 2010; Jones et al., 2006). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el número de insectos no marcados colectados en ambos cultivos fue similar. Por lo anteriormente expuesto, este resultado podría ser atribuido a diferencias en la arquitectura de las plantas de la soja y la alfalfa.

Las hojas de soja (donde se aplicó proteína de soja) tienen un tamaño más grande que las de alfalfa (a las que se aplicó caseína bovina), esto pudo haber permitido que los insectos, al caminar sobre las hojas, se contaminaran con mayor facilidad (Boina et al., 2009; Jones et al., 2006). Por su parte Huang (2012), quien determinó menores EfM en soja y algodón que en maní, hipotetizó que los insectos en cultivos con hojas pequeñas y de crecimiento más postrado se encuentran más expuestos. Otro aspecto a considerar en las diferencias en la EfM de las proteínas es la interacción con los factores abióticos (temperatura, precipitación, humedad y viento). Los resultados obtenidos por Hagler et al. (2014) sugieren que la exposición directa a la luz solar tendría un efecto negativo en la adquisición y retención de las proteínas. Por su parte Jones et al. (2006) determinaron que ante precipitaciones copiosas la caseína bovina tiene mayor resiliencia que la proteína de soja. Es de destacar que, en los seis momentos evaluados durante la aplicación de las proteínas y los muestreos, no fueron registradas precipitaciones.

La técnica de marcación permitió establecer los patrones de dispersión local de adultos de *P. guildinii* entre los cultivos de soja y alfalfa. De acuerdo a los resultados obtenidos, una gran proporción permanece en el cultivo que primero coloniza. Los adultos que se dispersan pueden realizar movimientos uni o bidireccionales. En las condiciones de manejo del experimento, donde la alfalfa permaneció en estado de fructificación, la mayoría de los adultos que colonizaron este cultivo permanecieron en el mismo y no realizaron movimientos hacia la soja, como era esperado de acuerdo a estudios previos (Miguel, 2017; Zerbino, Altier y Panizzi, 2016). En base a esta información se puede inferir que el insecto, cuando tiene disponibilidad de ambos alimentos, tiene preferencia por las vainas inmaduras de alfalfa. Zerbino, Altier y Panizzi (2016) determinaron que la alfalfa es un alimento con excelente aptitud nutricional. 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.

La distancia de vuelo de los pentatómidos, asociada con el paisaje agrícola, es un aspecto poco estudiado a nivel mundial (Huang, 2012; Ehler, 2000). La mínima distancia media de dispersión de los adultos de *P. guildinii* (17,4 m) determinada en este estudio fue semejante a la establecida por Huang (2012) (13,7 m) en Estados Unidos. La mayor proporción de los adultos recorrió distancias menores a 10 m. Tillman et al. (2009) considera que la distancia de dispersión de los pentatómidos varía en función de la proximidad o lejanía del alimento. La mayor distancia mínima de dispersión registrada fue de 47,5 m (largo de las parcelas más separación distancia entre cultivos). Este valor podría variar en situaciones donde el largo de las parcelas y/o la distancia entre los cultivos fueran mayores. Estos son aspectos, a tener en cuenta en futuros estudios. A pesar de que los valores de mínima distancia media de dispersión registrados en las seis evaluaciones realizadas fueron semejantes, el rango de valores varió entre $5,0 \pm 5,0$ y $30,94 \pm 5,94$ m.

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

Conclusiones

Los resultados de este trabajo, inéditos en el país, demostraron que la técnica de inmunomarcado es una herramienta útil para medir la distancia de dispersión y caracterizar los movimientos de *P. guildinii* en el paisaje agrícola. Los adultos pueden realizar movimientos uni o bidireccionales. La menor y mayor distancia mínima de dispersión fueron 2,5 y 47,5 m, respectivamente, con una media de 17,4 m. Los movimientos desde la soja hacia la alfalfa fueron predominantes, por lo que se puede establecer que la siembra de una faja de alfalfa que permanezca en fructificación durante los estados reproductivos de la soja puede ser una táctica efectiva para disminuir la colonización del insecto en este cultivo. La técnica de inmunomarcado demostró ser sensible y sencilla, por lo que tiene potencial para ser utilizada en el estudio de otros sistemas planta-insecto.

Los valores de eficiencia de marcado obtenidos concuerdan con los de otros estudios que consideraron otras especies vegetales y otros insectos. La especie vegetal tuvo efectos en la eficiencia de marcado. Es necesario estudiar este aspecto con mayor profundidad, habría que determinar la eficiencia de marcado de cada proteína en la misma especie vegetal y evaluar la durabilidad de las proteínas en el follaje de la especie vegetal considerada.

Agradecimientos

A Mabel Pessio y Eduardo García por su permanente asistencia en el trabajo de campo. A la Lic. Marina Picón por su cooperación en el procesamiento de muestras en el laboratorio. A los revisores anónimos por su lectura crítica y valiosos aportes que permitieron mejorar este manuscrito.

Bibliografía

- Bastola, A., Parajulee, M. N., Porter, R. P., Shrestha, R. B., Chen, F. J. y Carroll, S. C. (2014). Intercrop movement of convergent lady beetle *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), between adjacent cotton and alfalfa. *Insect Science*, 23(1), 145–156.
- Blaauw, B. R., Jones, V. P. y Nielsen, A. L. (2016). Utilizing immunomarking techniques to track *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) movement and distribution within a peach orchard. San Diego: PeerJ.
- Boina, D. R., Meyer, W. L., Onagbola, E. O. y Steilinski, L. L. (2009). Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology*, 38(4), 1250–1258.
- Costa, E. C. y Link, D. (1982). Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, 12(1), 51–57.
- Crowther, J. R. (2001). *The ELISA guidebook*. Totowa: Humana Press.
- DeGrandi-Hoffman, G. y Hagler, J. (2000). The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux*, 47(4), 302–306.
- Depieri, R. A. y Panizzi, A. R. (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, L. E. (2000). *Farmscape ecology of stink bugs in Northern California*. Lanham: Memoirs Entomological Society of America.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. y Pennington, J. S. (1971). Stage of development description for soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11(6), 929–931.
- Hagler, J. R. (1997). Field retention of a novel mark-release-recapture method. *Environmental Entomology*, 26(5), 1079–1086.
- Hagler, J. R., Cohen, A. C., Bradley-Dunlop, D. y Enriquez, F. J. (1992). New approach to mark insects for feeding and dispersal studies. *Environmental Entomology*, 21(1), 20–25.
- Hagler, J. R. y Jackson, C. G. (1998). An immuno-marking technique for labeling minute parasitoids. *Environmental Entomology*, 27(4), 1010–1016.
- Hagler, J. R. y Jackson, C. G. (2001). Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology*, 46, 511–543.
- Hagler, J. R. y Jones, V. P. (2010). A protein-based approach to mark arthropods for mark-capture type research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135(2), 177–192.
- Hagler, J. R. y Miller, E. (2002). An alternative to conventional insect marking procedures: detection of a protein mark on pink bollworm by ELISA. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103(1), 1–9.
- Hagler, J. R., Naranjo, S. E., Machtley, S. A. y Blackmer, F. (2014). Development of a standardized protein immunomarking protocol for insect mark-capture dispersal research. *Journal of Applied Entomology*, 138(10), 772–782.
- Horton, D. R., Jones, V. P. y Unruh, T. R. (2009). Use of a new immunomarking method to assess movement by generalist predators between a cover crop and tree canopy in a pear orchard. *American Entomologist*, 55(1), 49–56.
- Huang, T. I. (2012). *Local dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in mixed agricultural landscape of the coastal plain* (Tesis doctoral). University of Georgia, Athens, Georgia.
- Huang, T. I. y Toews, M. D. (2012). Feeding preference and movement of *Nezara viridula* and *Euschistus serous* (Hemiptera: Pentatomidae) on individual cotton plants. *Journal of Economic Entomology*, 105(3), 847–853.
- Irvin, N. A., Hagler, J. R. y Hoodle, M. S. (2012). Laboratory investigation of triple marking the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* with a fluorescent dye and two animal proteins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(1), 1–12.
- Jones, V. P., Hagler, J. R., Brunner, J. F., Baker, C. C. y Wilburn, T. D. (2006). An inexpensive immunomarking technique for studying movement patterns of naturally occurring insect populations. *Environmental Entomology*, 35(4), 827–836.
- Klick, J., Lee, J. C., Hagler, J. R., Bruck, D. J. y Yang, W. Q. (2014). Evaluating *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) immunomarking for mark-capture research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152(1), 31–41.
- Miguel, L. (2017). *Ocurrencia estacional y dispersión de Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) (Tesis de maestría). Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Panizzi, A. R. (1997). Wild hosts of pentatomids: Ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42, 99–122.
- Panizzi, A. R., Galileo, M. H. M., Gastal, H. A. O., Toledo, J. F. F. y Wild, D. C. H. (1980). Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* nymphs in soybeans. *Environmental Entomology*, 9(3), 293–297.

- Panizzi, A. R., McPherson, D. G., Javahery, J. M. y McPherson, R. M. (2000). Stink bugs (Pentatomidae). En C. W. Schaefer y A. R. Panizzi (Eds.), *Heteroptera of Economic Importance* (pp. 421–474). Boca Raton: CRC Press.
- Panizzi, A. R. y Parra, J. R. P. (2009). A bioecología e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. En A. R. Panizzi y J. R. P. Parra (Eds.), *Bioecologia e nutrição de insetos; base para o manejo de pragas* (pp. 1107–1139). Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Pilkay, G. (2013). *Ecology and Management of Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in Southeastern Farmscapes* (Tesis doctoral). Clemson University, Clemson.
- Reynolds, D. R., Riley, J. R., Armes, N. J., Cooter, R. J. y Tucker, M. R. (1997). Techniques for quantifying insect migration. En D. R. Dent y M. P. Walton (Eds.), *Methods in Ecological and Agricultural Entomology* (pp. 111–145). Cambridge: CAB Int.
- Ribeiro, A. y 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(3), 429-438.
- Sanders, C. J. y Carpenter, S. (2014). Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of Culicoides biting midges. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 583–587.
- Shrestha, R. B., Parajulee, M. N., Carroll, S. C. y Bastola, A. (2009). Evaluation of intercrop movement of *Lygus* between cotton and roadside alfalfa. En *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences* (pp. 873-881). San Antonio: National Cotton Council of America.
- Tillman, P. G. (2006). Sorghum as a trap crop for *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) in cotton. *Environmental Entomology*, 35(3), 771–783.
- Tillman, P. G., Northfield, T. D., Mizell, R. F. y Riddle, T. C. (2009). Spatiotemporal patterns and dispersal of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in peanut-cotton farmscapes. *Environmental Entomology*, 38(4), 1038–1052.
- Zerbino, M. S., Altier, N. y Panizzi, A. R. (2015). Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes. *Journal of Pest Science*, 88(3), 495–505.
- Zerbino, M. S., Altier, N. y Panizzi, A. R. (2016). Performance of nymph and adult of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cultivated legumes. *Neotropical Entomology*, 45(2), 114–122.
- Zerbino, M. S. y Alzugaray, R. (1994). Plagas en soja. En A. Giménez y E. Restaino (Eds.), *Girasol y Soja: Algunos aspectos tecnológicos de producción para el Litoral Oeste del Uruguay* (pp. 119 – 142). Montevideo: INIA. (Boletín de Divulgación, N° 47).
- Zerbino, M. S. y Alzugaray, R. (2003). *Piezodorus guildinii* (Westwood) [Cd-Rom]. En C. M. Bentancourt e I. B. Scatoni (Eds.). *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. Montevideo: Facultad de Agronomía.