

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza - Escuela de
Postgrado

ABUNDANCIA DE COCCINÉLIDOS EN ALFALFA: ROL DEL TIPO DE HÁBITAT DE BORDE,
ABUNDANCIA DE PRESAS EN EL CULTIVO, DEL MOVIMIENTO HACIA Y DESDE LOS
BORDES Y DE LA ABUNDANCIA DE CONESPECÍFICOS EN LOS BORDES

Proyecto para optar al grado de Magíster en
Áreas Silvestres y Conservación de la
Naturaleza.

CONSTANZA MARÍA RODRÍGUEZ HERBACH

Licenciada en Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Teléfono: 92991169

correo: crodriguezherbach@gmail.com

Santiago, Chile

2014

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE GRADO

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

Profesor(a) Guía

Nombre: Audrey Grez

Nota:

Firma:

Profesor(a) Consejero(a)

Nombre: Tania Zaviezo

Nota:

Firma:

Profesor(a) Consejero(a)

Nombre: Cristián Estades

Nota:

Firma:

A Diego y Martín

Y a los que no están

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los que me ayudaron de alguna u otra manera durante estos años de tesis. Primero al gran equipo que me acompañó a terreno, con especial cariño a Elizabeth Gazzano, Rodrigo Barahona, Bernardo Segura, Andrés Fierro, Paola Andrade, Francisca Castillo, Fernando Ingles, Fernanda Romero y Pablo Gallis. También quiero agradecer al profesor Rodrigo Chorbadjian de la Pontificia Universidad Católica de Chile por facilitarme la máquina pulverizadora.

Agradezco también al laboratorio de Biotecnología Veterinaria (BIOVETEC) por acogerme mucho más del tiempo esperado y ayudarme tanto logísticamente como con su compañía durante el desarrollo de las pruebas de ELISA. En especial agradezco a Sonia Vidal, Cynthia Ortiz, Daniela Siel, Dinka Ivulic y José Álvarez; y sobre todo al profesor Leonardo Sáenz quien me permitió permanecer y utilizar su laboratorio.

También quisiera agradecer a todos los que me brindaron consejo y apoyo desinteresado en más de alguna oportunidad, ayudándome a desarrollar la tesis. Entre ellos agradezco con cariño a Denise Donoso, Benito González, María Paz Acuña, Lissette Cortés y Diego Valencia; y a los profesores Jaime Hernández, María Soledad Fernández y José Manuel Yáñez. También quiero extender los agradecimientos a los profesores de la Universidad de Talca Blas Lavandero, Eduardo Fuentes y Esteban Basoalto, por haberme facilitado información y consejos muy valiosos sobre el uso de la técnica de inmunomarcaje, y a James Hagler (USDA, Arizona USA) por entrenamiento inicial e información proporcionada a T. Zaviezo en relación a la técnica de inmunomarcaje.

Por último quisiera agradecer al profesor Pedro Cattán por haberme motivado a incursionar en ecología, a mis profesores correctores Tania Zaviezo y Cristián Estados por sus comentarios, y a mi profesora guía, Audrey Grez por su gran orientación y apoyo durante estos años de aprendizaje. Esta tesis fue posible gracias al proyecto FONDECYT 1100159.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
Abundancia de enemigos naturales de plagas en cultivos, y factores involucrados	8
Relación entre la abundancia de enemigos naturales y la de sus presas	8
El rol de los hábitats circundantes.....	10
Movimiento de enemigos naturales y efecto “de derrame”	11
Estudios previos de abundancia y movimiento de coccinélidos en alfalfa en Chile	13
HIPÓTESIS	16
PREDICCIONES	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Área de estudio	17
Diseño experimental.....	17
Caracterización de las unidades experimentales.....	18
Especies	19
Marcaje de coccinélidos	19
Muestreo de insectos	20
Detección de las marcas: pruebas de ELISA.....	22
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
Características de las unidades muestrales.....	25
Abundancia de coccinélidos en alfalfa y bordes, según tipo de borde	25
Abundancia de áfidos	26
Movimiento desde y hacia la alfalfa	26
Objetivo específico 1: evaluar si la abundancia de <i>H. variegata</i> en alfalfa varía en función de la abundancia de presas en ella.....	27
Objetivo específico 2: evaluar si la abundancia de <i>H. variegata</i> en los alfalfaes y en los bordes varía en función del tipo de borde.	28

Objetivo específico 3: evaluar si la abundancia de <i>H. variegata</i> en alfalfa varía en función de la abundancia en el borde y del movimiento desde y hacia los bordes.	29
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
APÉNDICES.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cartografía del área de estudio. Los números sobre las unidades experimentales identifican a cada experimento.

Figura 2. Fotografía aérea y posicionamiento de las trampas (puntos blancos) en el experimento 11.

Figura 3. Trampa pegajosa en tubo de PVC, colocada en un alfalfal.

Figura 4. Trampa colocada a aprox. 9 metros en borde de vegetación arbórea.

Figura 5. Relación entre la abundancia de *H. variegata* con la abundancia de áfidos en cada uno de los alfalfaes estudiados. La normalidad de los datos fue evaluada con una prueba de Shapiro-Wilk (abundancia de áfidos: $p = 0,5$; abundancia *H. variegata*: $p = 0,99$).

Figura 6. Abundancia de *H. variegata* en alfalfaes y bordes según tipo de borde. Se muestra el promedio de las réplicas ± 1 error estándar. CA: cultivos anuales, VA: vegetación arbórea. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* ($\chi^2 = 11,49$; 3 g.l.; $p = 0,009$).

Figura 7. Relación entre la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y el número de individuos que se movieron desde los bordes hacia la alfalfa. La normalidad de los datos fue evaluada con una prueba de Shapiro-Wilk (movimiento hacia alfalfa del total: $p = 0,16$; movimiento hacia alfalfa de *H. variegata*: $p = 0,16$).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño promedio (± 1 ee) de los alfalfaes y de sus bordes, en hectáreas, según tipo de borde (cultivo anual y vegetación arbórea).

Tabla 2. Abundancias totales y por especie en alfalfaes y bordes, según tipo de borde. Entre paréntesis se encuentra la abundancia relativa en alfalfa y bordes según cada tipo de borde.

Tabla 3. Tipo de borde, número de individuos que se movieron desde los bordes hacia la alfalfa (inmigrantes) y abundancia de áfidos en alfalfa para cada alfalfal (experimento). CA: cultivos anuales, VA: vegetación arbórea.

RESUMEN

La intensificación de las actividades agrícolas trae consigo la pérdida y aislamiento de hábitats que son imprescindibles para los enemigos naturales de plagas, lo que significa una amenaza para el control biológico en los sistemas agrícolas. Conocer qué factores modulan la abundancia de enemigos naturales en los cultivos es importante para la conservación de la diversidad asociada y su función. En Chile central los cultivos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) son uno de los principales componentes de las praderas mejoradas, y en ellos coexiste una gran diversidad de insectos herbívoros como los áfidos (Hemiptera: Aphididae), y de enemigos naturales, principalmente coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae). En este estudio se evaluó la relación entre el patrón de abundancia de coccinélidos nativos y exóticos en alfalfa con: a) la abundancia de presas (i.e., áfidos) en alfalfa, b) el tipo de hábitat adyacente (i.e. “tipo de borde”) y c) el movimiento desde y hacia ambos bordes junto con d) la abundancia de conespecíficos en ellos. El estudio se realizó entre enero de 2012 y enero de 2013 en 12 alfalfaes ubicados en el sector sur de Santiago, seis adyacentes a cultivos anuales y seis a vegetación arbórea. Los insectos fueron colectados en la alfalfa y en los bordes mediante trampas pegajosas transparentes, y el movimiento se evaluó mediante la técnica del “inmunomarcaje”, rociando los sitios de muestreo con soluciones de proteínas de origen animal (huevo y leche) diluida en agua y luego identificando los individuos marcados mediante una prueba de ELISA. La especie exótica *Hippodamia variegata* dominó el ensamble, con sobre un 80% de las capturas tanto en alfalfaes como en ambos tipos de borde, por lo cual sólo se analizó esta especie. Su abundancia fue aproximadamente cinco veces mayor en alfalfa que en ambos bordes, lo que muestra una clara preferencia por este tipo de cultivo. Sólo el movimiento desde los bordes hacia la alfalfa tuvo un efecto significativo en explicar la abundancia de *H. variegata* en este cultivo. En conclusión, en este trabajo se demostró la importancia que tiene el proceso de movimiento en la mantención de enemigos naturales a escala local.

PALABRAS CLAVE: control biológico de conservación, enemigos naturales, inmunomarcaje, movimiento.

ABSTRACT

The intensification of agriculture results in the loss and isolation of natural habitats which are crucial for natural enemies of pests, threatening biological control in agricultural systems. To evaluate the factors that modulate the abundance of natural enemies in crops is important for conserving the associated biodiversity and ecological functioning. In central Chile, alfalfa crops (*Medicago sativa* L.) are among the main components of improved prairies, and within them coexists a great herbivore insect biodiversity, including aphids (Hemiptera: Aphididae), and natural enemies, mainly coccinellids (Coleoptera: Coccinellidae). This study assessed the relation of native and exotic abundance pattern with a) abundance of prey (i.e. aphids) in alfalfa, b) the adjacent habitat type (i.e. annual crops and arboreal vegetation) and c) movement from and to adjacent habitats with d) the conspecific abundance in adjacent habitat. Field study was carried out from January 2012 to January 2013 in 12 alfalfa fields located south of Santiago, six adjacent to annual crops and six to arboreal vegetation. Insects were collected in alfalfa and borders with transparent sticky traps, and movement was evaluated using the “immunomarking” technique, spraying the alfalfa fields and borders with water solutions of animal proteins (egg and milk), and then detecting them with an ELISA test. The exotic *Hippodamia variegata* dominated the assemblage, with more than 80% of captures in alfalfa and in both borders, so only this species was analyzed. Their abundance was approximately five times larger than in both adjacent habitat types, which suggest a clear preference of *H. variegata* for this crop. Only the movement from adjacent habitat to alfalfa had a significant effect on the abundance of *H. variegata* in this crop. In conclusion, this work demonstrated the importance of movement process in maintaining local populations of natural enemies.

KEY WORDS: conservation biological control, immunomarking, natural enemies, movement.

INTRODUCCIÓN

El cambio del uso del suelo es uno de los principales factores que afecta la biodiversidad a nivel mundial, sobre todo en los biomas mediterráneos (Sala *et al.* 2000), lo que ha conllevado un aumento de las áreas productivas en desmedro de las naturales (Foley *et al.* 2005). De hecho, ya en el año 2000, el 55% de la superficie de la tierra sin hielo había sido transformada desde sistemas naturales a praderas mejoradas, pueblos, ciudades y cultivos agrícolas (Ellis *et al.* 2010), siendo esta última una de las prácticas que más pone en riesgo la biodiversidad a nivel mundial (Norris 2008).

La intensificación de la agricultura ha significado la fragmentación, aislamiento y pérdida de hábitats naturales (i.e. asociaciones vegetacionales nativas) y semi-naturales (i.e. asociaciones vegetacionales permanentes de especies introducidas), con una consecuente homogeneización de los usos de suelo a escala de paisaje (Tscharntke *et al.* 2005). Esta práctica pone en riesgo la permanencia de muchas especies nativas y de los servicios ecosistémicos que proveen, debido que los hábitats remanentes son tan pequeños y aislados que son incapaces de sostener una población local (Landis *et al.* 2000, Banks 2004, Foley *et al.* 2005, Tscharntke *et al.* 2005). Uno de los servicios ecosistémicos que corre este riesgo el control biológico de plagas (Banks 2004, Tscharntke *et al.* 2007).

La disminución de este servicio tiene consecuencias económicas para la agricultura. En Estados Unidos, las pérdidas económicas causadas por plagas de insectos herbívoros se estiman en 18,77 mil millones de dólares, y el control biológico “natural” (i.e. realizado por enemigos naturales presentes en los campos) de sus plagas nativas en 13,6 miles de millones de dólares (Losey & Vaughan 2006). Esta es una razón suficiente para que los agricultores deseen potenciar la permanencia de los enemigos naturales de plagas en el paisaje (Landis *et al.* 2000). Pensado de esta forma, la conservación de la biodiversidad y el control biológico pueden ser actividades compatibles (Straub *et al.* 2008), y la clave para compatibilizarlas está en comprender cómo una mayor biodiversidad de enemigos naturales se traduce en un control biológico más eficiente (Landis *et al.* 2000, Norris 2008).

La hipótesis del aseguramiento sugiere que mantener una mayor diversidad de enemigos naturales resulta en una mejor repartición del nicho, dado que distintas especies ocuparán el recurso (en este caso, las presas) de distintas formas, escalas espaciales y temporales, por lo

que las perturbaciones provocadas por las actividades agrícolas no se verían reflejadas en una disminución del control biológico (Shear 2000, Banks 2004, Tschardtke *et al.* 2007, Straub *et al.* 2008). De esta forma, conservar una mayor diversidad y abundancia de especies es clave para potenciar el servicio ecosistémico.

Una forma de conservar enemigos naturales en paisajes agrícolas es manejar su hábitat, actividad enmarcada en el Control Biológico de Conservación (CBC) (Landis *et al.* 2000). Este manejo tiene por objetivo mejorar la sobrevivencia, reproducción, longevidad y el comportamiento depredador de los enemigos naturales al proveerles recursos alternativos, controlar sus adversarios o proveer refugios para aquellos que huyen de áreas perturbadas por cosechas o aplicación de pesticidas, entre otros (Landis *et al.* 2000). Algunos manejos que se pueden realizar son la mantención de áreas naturales y la instalación de hileras de vegetación o bancos de insectos entre cultivos, los cuales son más estables y pueden proveer de recursos durante todo el año (Landis *et al.* 2000, Rand *et al.* 2006, Tschardtke *et al.* 2007).

Chile se encuentra en la obligación de fomentar la conservación de la biodiversidad en las actividades agrícolas al estar suscrito al Convenio de Diversidad Biológica. En este convenio se ha trazado un Plan Estratégico donde se han establecido veinte metas para el 2020 (i.e. Metas de Aichi). La meta 7 dice que “las zonas bajo prácticas agrícolas, acuícolas y forestales deberán ser manejadas de forma sustentable, asegurando la conservación de la biodiversidad” (Aichi Biodiversity Targets, <<http://www.cbd.int/sp/targets/default.shtml>>, en línea). De esta forma, potenciar la permanencia de enemigos naturales en los cultivos agrícolas contribuiría a alcanzar este objetivo en nuestro país al ser una forma de conservar biodiversidad.

Una de las actividades agrícolas importantes de la zona central son los cultivos de alfalfa (*Medicago sativa* L.). En ellos coexiste una gran diversidad insectos herbívoros como los áfidos, los que pueden causar la detención del crecimiento de las plantas de alfalfa, generando pérdidas económicas (Soto 2000). Los áfidos más comúnmente descritos en estos cultivos son *Aphis craccivora* (Kock), *Acyrtosiphon pisum* (Harris) y *Therioaphis trifolii* (Monell) (Grez *et al.* 2010), los que aumentan en abundancia en primavera y otoño. Mantener una entomofauna que los controle en estas épocas es fundamental. Entre sus controladores destacan los coccinélidos, existiendo al menos 19 especies, nativas y exóticas, que están presentes entre primavera y otoño en este cultivo (Zaviezo *et al.* 2004, Grez *et al.* 2010). Comprender los factores que determinan la permanencia de estos enemigos naturales en alfalfa es

fundamental para potencial el control biológico de áfidos. En este estudio se evaluó la relación entre el patrón de abundancia de coccinélidos nativos y exóticos en alfalfa con: a) la abundancia de presas (i.e., áfidos) en alfalfa, b) el tipo de hábitat adyacente (i.e., tipo de borde) y c) el movimiento desde y hacia ambos bordes junto con d) la abundancia de conespecíficos en ellos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Abundancia de enemigos naturales de plagas en cultivos, y factores involucrados

En el control biológico de conservación, es fundamental evaluar los factores que permiten una mayor abundancia de enemigos naturales en los cultivos para un buen manejo del hábitat (Landis *et al.* 2000). Entre estos factores se encuentran la abundancia de presas en los cultivos (Readshaw 1973, Honek 1982, Elliot *et al.* 2002, Schellhorn & Andow 2005), las características intrínsecas del cultivo (Honek 1982, Elliot *et al.* 2002, Langellotto & Denno 2004), las características de los hábitats circundantes (Dix *et al.* 1995, Grez & Prado 2000, Holland & Fahrig 2000, Elliot *et al.* 2002, Gardiner *et al.* 2009, Grez *et al.* 2010, Perovic *et al.* 2010, Fahrig *et al.* 2011) y el movimiento de individuos entre los cultivos y otros hábitats (Rand *et al.* 2006, Boina *et al.* 2009, Horton *et al.* 2009, Basoalto *et al.* 2010, Blitzer *et al.* 2012, Unruh *et al.* 2012, Villegas *et al.* 2013). Estos factores no son excluyentes entre sí y pueden interactuar de diversas maneras (Elliot *et al.* 2002).

Relación entre la abundancia de enemigos naturales y la de sus presas

Un aumento en la abundancia de presas en los cultivos puede provocar dos tipos de respuesta en los enemigos naturales, las cuales no son excluyentes entre sí. La primera corresponde a un aumento de la tasa de ataque per cápita (i.e. “respuesta funcional”, Murdoch 1973), lo que supone un cambio en la conducta de depredación. La segunda corresponde un aumento de la abundancia (i.e. “respuesta numérica”, Readshaw 1973), la cual se relaciona con un aumento en la longevidad, reproducción y/o sobrevivencia de los enemigos naturales en los cultivos.

Varios estudios han tratado de explicar la abundancia de coccinélidos en cultivos en función de la abundancia de presas (Honek 1982, Evans & Youssef 1992, Elliot *et al.* 2002). Por ejemplo, Honek (1982) concluyó que en cultivos de leguminosas forrajeras (i.e. alfalfa y trébol) y cereales, la densidad de áfidos era la variable más importante en explicar la densidad de *Coccinella septempunctata* (Mulsant) y *Propylaea quatuordecimpunctata* L. Pons *et al.* (2005) también encontraron una relación significativa entre la abundancia de áfidos y larvas de coccinélidos en alfalfa. Sin embargo, ellos obtuvieron coeficientes de determinación

relativamente bajos ($R^2 \leq 0,3$), lo que atribuyeron a otras variables que podrían estar interactuando.

Algunos mecanismos que pueden modular la respuesta de los depredadores a la densidad de sus presas son la escala en estudio (Elliot *et al.* 2002, Schellhorn & Andow 2005) y el grado de especialización del depredador hacia su presa (Evans & Youssef 1992, Snyder & Ives 2003, Slogget 2008). Sobre el efecto de la escala, se ha observado que no en todas las escalas se puede observar una asociación significativa entre el depredador y la presa. Esto puede tener relación con la forma en que los depredadores perciben y utilizan los recursos disponibles, y con las preferencias de hábitat. Schellhorn & Andow (2005) encontraron que el coccinélido *Coleomegilla maculata* De Geer respondía a una escala de grupo de plantas, mientras que las otras especies estudiadas (*Hippodamia tredecimpunctata* (L.), *Hippodamia convergens* (Guerin-Meneville) y *Adalia bipunctata* (Mulsant) lo hacían a una escala de planta, lo que atribuyeron a sus preferencias de hábitat y a que *C. maculata* es una especie más generalista. Por otra parte Elliot *et al.* (2002) hallaron que, si bien la abundancia de enemigos naturales en alfalfaes era dependiente de la abundancia de presas, la tasa de aumento de depredadores variaba en función de la composición y el tamaño de los parches que rodeaban el cultivo a una mayor escala. Esto sugiere que los enemigos naturales en este estudio no solo dependen de los recursos que les ofrecen los cultivos, sino también de los que ofrecen parches vecinos.

Por otra parte, se ha descrito que los depredadores especialistas poseen una relación denso-dependiente más estrecha con sus presas que los generalistas, por lo que esta relación sería más fácil de observar en especialistas (Snyder & Ives 2003, Slogget 2008). Si bien esto sigue siendo materia de debate, se ha usado como argumento para promover a las especies especialistas por sobre las generalistas en control biológico de plagas (Readshaw 1973, Riechert & Lockley 1984). Sin embargo, hoy en día este argumento ha perdido fuerza a la luz de los antecedentes de que una comunidad más diversa, compuesta por especialistas y generalistas, conlleva a un control biológico más efectivo. Esto bajo la hipótesis del aseguramiento, la que indica que una mayor diversidad de controladores biológicos asegurará que el servicio se cumpla a pesar de las perturbaciones, ya que si bien algunas especies pueden desaparecer otras más resistentes cubrirán la función (Shear 2000, Symondson *et al.* 2002, Banks 2004, Tscharrntke *et al.* 2007, Straub *et al.* 2008).

El rol de los hábitats circundantes

Potenciar la permanencia de enemigos naturales implica proveer de recursos para su sobrevivencia y reproducción, los cuales no necesariamente ocurren en un mismo lugar (Landis *et al.* 2000). Si bien los cultivos son sitios donde se concentra una gran cantidad de presas, estos típicamente son hábitats altamente perturbados y efímeros, por lo que los enemigos naturales necesitan de sitios estables para permanecer en el paisaje (Landis *et al.* 2000, Rand *et al.* 2006).

Por otra parte, los enemigos naturales perciben los recursos a diferentes escalas espaciales según la especie (Elliot *et al.* 2002), desde la de paisaje hasta la de una misma planta o incluso estructuras de ellas (Langellotto & Denno 2004), lo que puede traducirse en un control biológico más eficiente al complementarse sus efectos sobre las presas (Snyder *et al.* 2008). Sin embargo, los enemigos naturales también se afectan por perturbaciones dependiendo de la escala a la cual están percibiendo el paisaje. Localmente, la intensificación de los cultivos puede ocurrir a través del aumento del uso de pesticidas, del régimen de corte o al incrementar el área de los cultivos; mientras en el paisaje puede suceder por la simplificación o destrucción de hábitats de borde, como hileras de árboles o de la vegetación alrededor de arroyos (Tscharrntke *et al.* 2005).

Los hábitats de borde pueden sostener poblaciones que abandonan los cultivos cuando son cosechados (Dix *et al.* 1995, Landis *et al.* 2000), y pueden proveer de sitios de refugio, presas alternativas y/o de sitios de apareamiento, entre otros (Corbett & Rosenheim 1996, Rand *et al.* 2006, Blitzer *et al.* 2012). Por ejemplo, Corbett & Rosenheim (1996) encontraron que bordes compuestos por ciruelos rodeando viñas eran usados como refugio por parasitoides del género *Anagrus* (Hymenoptera: Mymaridae), y que tanto su presencia como distancia a las viñas eran factores determinantes en explicar su abundancia en ellas en la temporada productiva. Por otra parte, Duelli & Obrist (2003) especularon que probablemente el 63% de las especies capturadas en un transecto que atravesaban dos remanentes de vegetación semi-natural separados por cultivos anuales, no se hubieran encontrado en ausencia de estos hábitats de borde. Elliot *et al.* (2002a) encontraron una relación significativa entre la proporción de áreas boscosas y la abundancia de *C. maculata* en maizales, lo que concuerda con el hecho de que esta especie usa estos hábitats para hibernar. En Chile central se ha observado que los coccinélidos utilizan otros hábitats como refugio cuando los cultivos son cosechados, y también

cuando hibernan. *Cycloneda sanguinea* L. ha sido observada en troncos de falsa acacia (*Robinia pseudoacacia* L.), *A. bipunctata*, en eucalipto (*Eucalyptus* sp.), e *Hippodamia variegata* Goeze junto con *H. convergens* han sido observados agrupándose en cardos (*Sylibum marianum* (L.) Gaertn) (Grez *et al.* 2010, Villegas *et al.* 2013).

Movimiento de enemigos naturales y efecto “de derrame”

Los animales se mueven por varias razones, tales como buscar pareja, refugio, alimentos complementarios, o sitios de apareamiento o hibernación (Fahrig 2007). Mientras las actividades humanas sigan reduciendo y aislando los hábitats naturales, y la matriz agrícola se torne más hostil, el grado de conectividad funcional (i.e. facilidad al movimiento entre hábitats para una especie en particular) se hace un factor más crítico para la permanencia de cualquier especie a escala de paisaje, sobre todo para las menos vágiles y/o especialistas (Calabrese & Fagan 2004, Fahrig 2007, Perovic *et al.* 2010). Cuando un individuo se mueve, la decisión de hacia dónde hacerlo depende en parte de si debe cruzar un borde entre un hábitat y otro (Fahrig 2007). La permeabilidad de los bordes (i.e. grado de resistencia que los bordes ofrecen al movimiento, Ries *et al.* 2004) no sólo está dada por las características de los hábitats que confluyen, sino también por las habilidades de movimiento de las especies (Calabrese & Fagan 2004, Fahrig 2007).

Según el modelo de Ries *et al.* (2004), las respuestas al borde pueden ser positivas, negativas o neutras, según el tipo de recursos que ofrezcan los hábitats adyacentes. Si los recursos son suplementarios, es decir, se encuentran a ambos lados del borde, o si todos los recursos necesarios se encuentran sólo a un lado, los individuos no tendrán la necesidad de atravesarlo, por lo que el movimiento a través de este será menor. Ahora, si los recursos son complementarios, es decir, una parte de ellos se encuentra a un lado y otra parte en el hábitat adyacente, los individuos se verán obligados a atravesar el borde con mayor frecuencia para satisfacer sus necesidades.

Un aumento del movimiento de enemigos naturales desde hábitats cultivados hacia los naturales, y viceversa puede resultar en un “efecto de derrame” (*sensu* Rand *et al.* 2006, Blitzer *et al.* 2012). Este efecto ocurre cuando un cultivo es segado u ofrece un subsidio muy alto (e.g. alta cantidad de presas), con lo cual los depredadores aumentan su abundancia local y se “derraman” hacia los bordes (Rand *et al.* 2006, Blitzer *et al.* 2012). De esta forma, la abundancia

de los enemigos naturales en un parche se relaciona con su abundancia en los bordes. Según Blitzer *et al.* (2012), el efecto de derrame ocurre principalmente donde el paisaje se presenta como un mosaico, con una estrecha asociación entre cultivos y áreas no cultivadas. Adicionalmente, las especies más susceptibles a este efecto serían las generalistas de hábitat (Blitzer *et al.* 2012).

Lo anterior resalta la importancia de estudiar los patrones de movimiento y abundancia de los enemigos naturales entre los hábitats “de borde” y los cultivos (Lavandero *et al.* 2004). En Chile, el movimiento de enemigos naturales de plagas entre estos hábitats ha sido escasamente evaluado (Grez & Prado 2000, Grez *et al.* 2010, Villegas *et al.* 2013). Ello se ha realizado en coccinélidos a través de marcaje con pinturas acrílicas o con rubidio (Arancibia 2012, Villegas *et al.* 2013). El marcaje con pinturas acrílicas es un método simple y de bajo costo, pero se requiere marcar un gran número de individuos, lo que es una desventaja cuando estos se marcan en el campo y la población no es abundante. El rubidio por su parte evita este problema ya que se marca directamente el hábitat, pero es una técnica muy costosa y cuya dosificación debe ser previamente calibrada, por lo que es más trabajosa (Lavandero *et al.* 2004). El desarrollo del “inmunomarcaje” ha facilitado el estudio del movimiento de insectos entre cultivos y sus bordes. Esta técnica, que es de menor costo que el uso de rubidio, y más eficiente en capturar individuos marcados, consiste en rociar grandes áreas con una solución de proteínas de origen alimentario (e.g. leche, huevo, soya) y luego buscarla en la superficie de los insectos mediante un inmunoensayo ligado a enzima (i.e. prueba de “ELISA”) (Jones *et al.* 2006). Esta prueba ha sido utilizada con propósitos similares tanto en coccinélidos como en lepidópteros, himenópteros y hemípteros (Jones *et al.* 2006, Boina *et al.* 2009, Basoalto *et al.* 2010, Unruh *et al.* 2012).

Estudios previos de abundancia y movimiento de coccinélidos en alfalfa en Chile

Estudios previos en Chile han demostrado la influencia de los factores mencionados sobre los patrones de abundancia de coccinélidos en alfalfa y otros cultivos, los cuales se han realizado a distintas escalas temporales y espaciales. En un experimento de campo en que se evaluó el efecto del tipo de borde (i.e. alfalfa y puerro) sobre la inmigración, emigración y abundancia de coccinélidos en parches experimentales de brócoli, se encontró que tanto la abundancia como la tasa de inmigración de los coccinélidos *H. variegata*, *Eriopis connexa* Germar e *H. convergens* fueron mayores en parches rodeados por puerro que en aquellos

rodeados por alfalfa. Esto se habría debido a que la alfalfa, al ser un hábitat de alta calidad para los coccinélidos, habría actuado como sumidero, dificultando su inmigración hacia el brócoli (Grez & Prado 2000). En otro estudio en que se crearon parches artificiales de alfalfa rodeados por tres tipos de borde (suelo desnudo, malezas y árboles), se estimó la abundancia, inmigración y emigración de *H. variegata* y *E. connexa*. La abundancia e inmigración hacia la alfalfa fue significativamente mayor para *H. variegata* en alfalfas rodeados por suelo desnudo, pero no para *E. connexa*; mientras que no se observó un efecto significativo del tipo de borde sobre la emigración (Arancibia 2012). En ambos estudios el movimiento fue evaluado mediante marcaje-captura-recaptura, marcando los individuos con pinturas acrílicas. En el segundo experimento existe la posibilidad de que no se hayan observado efectos significativos en *E. connexa* debido a su baja abundancia, principal desventaja de este método (Lavandero *et al.* 2004).

Otro experimento evaluó el movimiento de *E. connexa* entre parches de alfalfa separados por suelo desnudo en paisajes artificiales con diferente grado de fragmentación (Grez *et al.* 2005). Se observó que el movimiento desde el suelo desnudo hacia la alfalfa fue significativamente mayor que en el sentido contrario, siendo en el cultivo donde se observaron también las mayores abundancias al final del experimento. Un tercer estudio evaluó la abundancia de coccinélidos inmigrando hacia alfalfas comerciales rodeados por distintos tipos de borde (Grez *et al.* 2010). Mientras algunas especies fueron más abundantes en alfalfas cercanos a bordes de vegetación arbórea (*Adalia deficiens* Mulsant, *Psyllobora picta* Germain, y *Cycloneda sanguinea* L., aunque en esta última especie el efecto fue sólo marginalmente significativo), otras (*E. connexa*, *H. variegata* e *H. convergens*) tendieron a ser más abundantes en alfalfas adyacentes a cultivos anuales y maíz. En este caso la abundancia de individuos inmigrando fue evaluada con trampas amarillas pegajosas más grandes (superficie de captura: 2,64 m²) y bajo el supuesto de que los individuos que cayeron en la cara que miraba hacia el borde se encontraban inmigrando hacia el alfalfal. Ambos experimentos sugieren la importancia de la dispersión como factor modulador de la abundancia de coccinélidos en los cultivos de alfalfa.

Los resultados encontrados por Grez *et al.* (2010) son coherentes con el uso de hábitat diferencial que hacen las especies de coccinélidos (Rebolledo *et al.* 2007, Grez *et al.* 2013). *Eriopis connexa* ha sido descrita como una especie asociada a vegetación herbácea y, junto a *H. variegata*, es muy abundante en trigo y maíz y muy poco abundante en hileras de vegetación y bosquetes arbóreos (Rebolledo *et al.* 2007, Grez *et al.* 2013), y por ello es esperable que

inmigran más a alfalfa rodeados por cultivos anuales que a aquellos rodeados por vegetación arbórea. Por su parte, *A. deficiens* es más abundante en hábitats arbóreos (Grez *et al.* 2013) y consecuentemente debería inmigrar más a alfalfa rodeados por este tipo de vegetación. En Chile, *Harmonia axyridis* Pallas es más abundante en alfalfa (Grez *et al.* 2013), aunque en otros países ha sido descrita como una especie más bien asociada a vegetación arbórea, preferencia que todavía no ha sido evaluada en Chile (Koch 2003, Vandereycken *et al.* 2012). Por último, un reciente experimento utilizando como método de marcaje rubidio, demostró que *H. variegata* y *H. convergens* se mueven entre alfalfa y cardos aledaños a este cultivo, sugiriendo que esta maleza puede funcionar como refugio temporal para estos coccinélidos cuando la abundancia de presas es baja en alfalfa (Villegas *et al.* 2013). Este experimento resalta la influencia que puede tener el tipo de hábitat de borde en el movimiento de los individuos.

Estos antecedentes demuestran que los coccinélidos hacen un uso diferencial de los hábitats que componen el paisaje agrícola de la zona central de Chile, y también que este uso no es estático, sino que se mueven entre los distintos tipos de hábitat, ya sea persiguiendo recursos o buscando refugios. Si bien el ensamble de coccinélidos es más abundante en alfalfa en comparación con otros hábitats (Grez *et al.* 2013), es importante conocer la influencia que ejercen la disponibilidad de presas, los bordes, el movimiento y la abundancia de conoespecíficos en los bordes. Es por ello que en este estudio se evaluó la relación entre el patrón de abundancia de coccinélidos nativos y exóticos en alfalfa con: a) la abundancia de presas (i.e., áfidos) en alfalfa, b) el tipo de hábitat adyacente (i.e., tipo de borde) y c) el movimiento desde y hacia ambos bordes en función de la abundancia de conoespecíficos en ellos.

HIPÓTESIS

La abundancia de coccinélidos en alfalfa es afectada por la abundancia de presas en alfalfa, por el tipo de borde, por su movimiento entre ella y los bordes y/o por su abundancia en el borde.

PREDICCIONES

En base a los antecedentes previos, se predice que:

- La abundancia de coccinélidos en alfalfa será mayor cuando haya una mayor abundancia de presas en ella.
- La abundancia de coccinélidos en alfalfa dependerá del tipo de borde que la rodee, siendo este efecto especie-específico.
- La abundancia de coccinélidos en alfalfa será mayor cuando haya un mayor movimiento hacia la alfalfa y un menor movimiento hacia los bordes.
- La abundancia de coccinélidos en alfalfa será mayor cuando su abundancia en el borde sea mayor, y esto coincidirá con un mayor movimiento hacia la alfalfa y un menor movimiento hacia los bordes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la abundancia de presas en alfalfa, del tipo de hábitat de borde, del movimiento de coccinélidos hacia y desde los bordes y de la abundancia de coccinélidos en los bordes sobre la abundancia de coccinélidos en alfalfa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa varía en función de la abundancia de áfidos en ella.
2. Evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y en los bordes varía en función del tipo de borde.
3. Evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa varía en función de su abundancia en el borde y de su movimiento desde y hacia los bordes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo entre enero de 2012 y enero de 2013 en alfalfaes comerciales ubicados en una zona con predominancia agrícola del sector sur de Santiago, en las comunas de Calera de Tango, Pirque, San Bernardo y Talagante. Para los experimentos se seleccionaron doce alfalfaes de entre uno y cinco años de edad, y que no estaban sometidos a tratamientos con pesticidas (Figura 1).

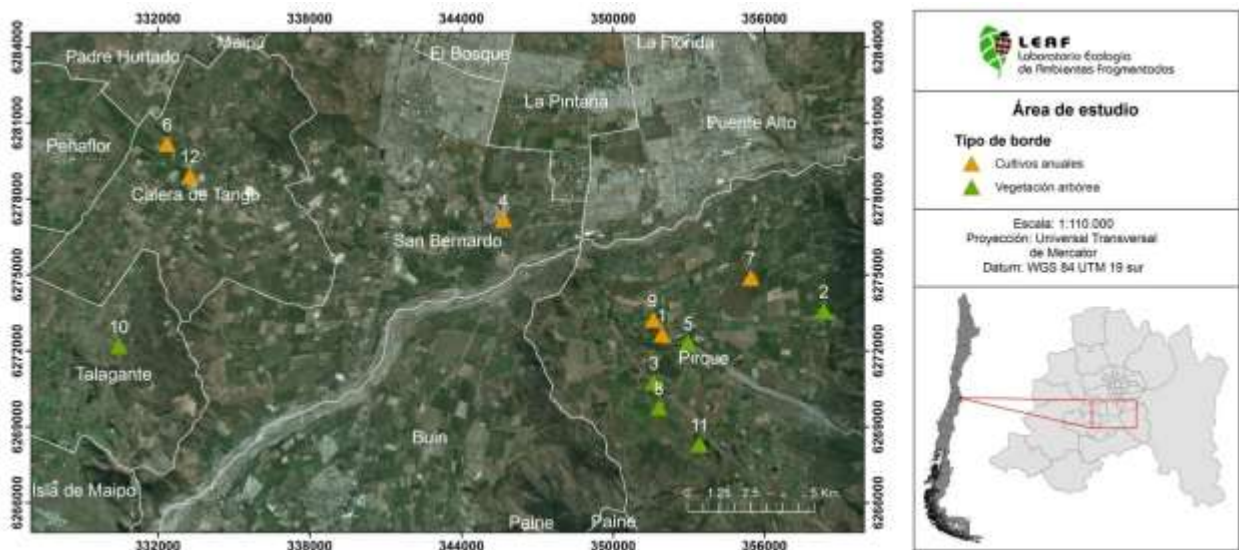


Figura 1. Cartografía del área de estudio. Los números sobre las unidades experimentales identifican a cada experimento.

Diseño experimental

El diseño consideró una variable independiente de tipo categórica y tres continuas, las que fueron evaluadas en los doce experimentos. La variable categórica corresponde al tipo de borde y tiene dos niveles, cultivos anuales y vegetación arbórea. Cada nivel fue replicado seis veces, los cuales se distribuyeron temporalmente al azar. Se utilizaron estos tipos de borde para comparar uno con alto grado de perturbación versus uno con bajo grado de perturbación (Grez *et al.*, 2013).

Cada unidad experimental (de aquí en adelante “experimento”) se compuso por un alfalfal con su respectivo borde. Los experimentos estaban separados entre sí al menos por 680 metros durante el estudio. Sin embargo, para evitar capturar individuos marcados en sitios cercanos, las trampas colocadas en una misma época estuvieron separadas entre sí por al menos 1000 m a la redonda. Los experimentos se consideraron válidos sólo cuando cayeron individuos suficientes para poner a prueba la hipótesis.

Los criterios para seleccionar cada unidad experimental fueron:

- a) Características del alfalfal: se seleccionaron aquellos que tuviesen entre 1 y 5 años, que no estuviesen sometidos a tratamientos de pesticidas, y mayores a 1 hectárea.
- b) Características del borde:
 - i. Vegetación arbórea: se buscaron bordes que estuviesen compuestos por especies introducidas (i.e. hábitats semi-naturales), ya que se ha observado que el ensamble de coccinélidos en vegetación nativa (i.e. matorral esclerófilo) es diferente al observado en estos otros (Grez *et al.* 2013). Las especies predominantes en los bordes seleccionados fueron Falso Acacio (*Robinia pseudoacacia*), Álamo (*Populus* sp.), Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y Zarzamora (*Rubus* sp.). Estos bordes también debían tener una altura y ancho mínimos de 2 y 20 metros respectivamente.
 - ii. Cultivos anuales: se usaron bordes con maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y papas (*Solanum tuberosum* L.). En todos los casos el ancho del borde fue mayor a 20 metros, y el cultivo se encontraba en crecimiento.

Se realizaron cinco experimentos en verano (tres cultivos anuales y dos de vegetación arbórea), cinco en primavera (dos cultivos anuales y tres vegetación arbórea), y dos en otoño (un cultivo anual y uno de vegetación arbórea). La estacionalidad no fue una variable considerada en este estudio, ya que por razones logísticas y de costo no se pudo contar con suficientes réplicas para ello. Las fechas de los experimentos se encuentran en el Apéndice 1.

Caracterización de las unidades experimentales

En cada unidad experimental se midió el área del alfalfal y perímetro del borde, y la proporción del perímetro del alfalfal que estaba rodeado por el tipo de borde seleccionado. Estas mediciones se realizaron a partir de una imagen de Google Earth®, a una escala de 1:2.000.

Luego, la homogeneidad entre las unidades experimentales respecto esta variables se evaluó mediante un análisis de varianza (ANDEVA), previa transformación de los datos a $\ln(x)$ para homogeneizar las varianzas.

Especies

Si bien *a priori* se seleccionaron para el estudio las exóticas *H. variegata*, *H. convergens* y *H. axyridis*, y las nativas *E. connexa*, *A. deficiens* y *C. sanguinea*, sólo las tres exóticas y *E. connexa* fueron colectadas, y de éstas sólo fue posible analizar a *H. variegata* pues las otras resultaron ser con baja abundancia (véase Resultados).

Marcaje de coccinélidos

El movimiento entre la alfalfa y el borde fue evaluado mediante la técnica de “inmunomarcaje”, (Jones *et al.*, 2006). Se utilizaron dos marcadores: huevo entero en polvo (Agricovial[®]), y leche entera en polvo (Mulpulmo[®]), ambos diluidos en agua. La alfalfa fue rociada con huevo y los bordes con leche, siguiendo las recomendaciones del experto en la técnica (Thomas Unruh¹ *com. pers.*).

Un día antes de instalar las trampas, se roció la vegetación (alfalfa y bordes) con los marcadores en una franja de 5 x 100 m (500 m²), ubicada entre los 12 y 17 m de cada lado de la línea del borde, siendo el lado de los 100 m paralelo al borde. Las esquinas de inicio y término de las franjas y el punto inicial en la línea del borde, fueron marcados en terreno con tubos de PVC para guiar la colocación de las trampas al día siguiente. La aspersion de las marcas se realizó con una carretilla pulverizadora (IMPAC[®], Taral 1402040), bajo una presión de aspersion de 250-300 psi (Basoalto *et al.* 2010). En la alfalfa se rociaron aproximadamente 70 L de huevo (13,8 L/m², Jones *et al.* 2006), a una concentración de 15g/L (Basoalto *et al.* 2010), y en los bordes 112,5 L de leche a 20g/L. La concentración de leche fue aumentada a propósito ya que a las concentraciones descritas en la literatura había mostrado cierta inestabilidad en relación al huevo (Jones *et al.* 2006, Thomas Unruh *com. pers.*).

¹ Thomas Unruh: Agricultural Research Service, USDA, USA. thomas.unruh@ars.usda.gov

Muestreo de insectos

Los muestreos fueron realizados durante el período de crecimiento de la alfalfa, cuando se encontraba con una altura mayor a 20cm. A cada lado (alfalfa y bordes) se colocaron 20 trampas, diez a 10 m del borde y las otras a 20 m (Figura 2). Las trampas consistieron en tarjetas de mica transparente, de 15 x 25 cm, con pegamento entomológico esparcido por ambos lados (Tangle-Trap[®], The Tanglefoot Company[®]), siendo el área total de captura por trampa de 750 cm². Las trampas se amarraron a un extremo de un tubo de PVC, quedando a ~80 cm del suelo (Figura 3). Se usaron trampas transparentes para no sesgar el movimiento de los insectos². Adicionalmente, en los bordes de vegetación arbórea se dispusieron 10 trampas a ~9 m de altura amarradas también a tubos de PVC para evaluar este hábitat de forma más homogénea (Figura 4). Todas las distancias se establecieron en terreno con huincha de medir. Las trampas se dejaron actuar por cuatro días.



Figura 2. Fotografía aérea y posicionamiento de las trampas (puntos blancos) en la alfalfa y el borde en el experimento 11.

² Dowell & Cherry (2011) compararon el atractivo de trampas pegajosas de ocho colores distintos, entre ellos el amarillo, el naranja y el transparente, encontrando que solo las amarillas capturaron significativamente más coccinélidos, por lo que no se espera que los palos naranjas aumenten el atractivo de la trampa.



Figura 3. Trampa pegajosa en tubo de PVC, colocada en un alfalfal.



Figura 4. Trampa colocada a aprox. 9 metros en borde de vegetación arbórea.

El último día, los coccinélidos fueron colectados en terreno con mondadientes (uno por individuo de modo de evitar contaminación de la marca), colocados en tubos de microcentrífuga

y llevados al laboratorio, donde se identificaron a nivel de especie, se contaron y guardaron en un congelador a -80°C por no más de 13 meses hasta el momento de su procesamiento. Los áfidos que cayeron en las trampas en alfalfa también fueron contados. Para ello, cada trampa fue dividida en dieciséis partes, y se contaron los individuos presentes en los cuadrantes de la diagonal. Este dato fue usado directamente en el análisis estadístico.

Detección de las marcas: pruebas de ELISA

Las pruebas de ELISA fueron realizadas en el Centro Biotecnológico Veterinario (BIOVETEC), ubicado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Estas pruebas estuvieron dirigidas a buscar caseína (principal proteína de la leche) en los individuos que cayeron en alfalfa, y ovoalbúmina (principal proteína del huevo) en los que cayeron en los bordes. Para definir las concentraciones de anticuerpos y soluciones de bloqueo a utilizar, se realizaron diversas curvas de calibración, según Lilia & Frías (1987), y las recomendaciones del experto en pruebas de ELISA, Dr. Leonardo Sáenz³.

Las muestras colectadas fueron descongeladas el día en que se sometieron al análisis. Se realizó un ELISA indirecto, siguiendo el protocolo de Basoalto *et al.* (2010), con algunas modificaciones descritas más abajo. Cada individuo fue sumergido en 1 ml de “solución de extracción” (Tris, NaCl, KCl y EDTA) por aproximadamente 3 minutos, y luego fue descartado. Las pruebas se realizaron con el sobrenadante, y para cada especie en placas separadas.

Cada placa de ELISA (Nunc-Immuno™, de 96 pocillos) contuvo 8 controles negativos, 4 blancos (solo con solución de extracción), 4 controles positivos (1 ng/ml del huevo y la leche utilizados en terreno) y 80 muestras, usándose 2 pocillos para cada muestra. Como control negativo se usó el sobrenadante de individuos de la especie en estudio, los cuales no estaban marcados. Para obtener los controles se colectaron individuos a más de 1 km de una zona marcada en la misma temporada, o se criaron en el laboratorio.

³ Leonardo Sáenz: Profesor Asistente, Laboratorio Biotecnológico Veterinario (BIOVETEC), Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile. leosaenz@uchile.cl

Luego de extraer la marca de los individuos, se puso 80 µl de muestra por pocillo, y se dejó incubar a 4°C por 17-21 horas. Al día siguiente el contenido fue descartado y se lavó cinco veces con 300 µl de “solución de lavado” (PBS 1X y Tritón). Posteriormente se agregaron 300 µl de “solución de bloqueo”, la que consistió en una solución de leche descremada (Svelty®) en polvo en PBS 1X al 5% para el caso de la ovoalbúmina, y de suero fetal bovino (HyClone®) en PBS 1X al 10% para la caseína. En ambos casos se incubó a 37°C por una hora. El contenido fue descartado, lavándose con 300 µl, dos veces para el caso de la ovoalbúmina y una vez para la caseína. Luego se agregaron 80 µl de anticuerpo primario, y se dejó incubar por una hora. El anticuerpo primario contra ovoalbúmina fue una inmunoglobulina tipo G (IgG) policlonal anti-ovoalbúmina (Sigma-Aldrich, C6534-2ML), aplicado en una concentración de 1:5000; y contra caseína una IgG policlonal anti-caseína (ThermoScientific®, PA1-33128) en una concentración de 1:7000; ambas producidas en conejo. Luego se descartó el contenido, se lavó cinco veces con 300 µl de solución de lavado, y se agregó 80 µl de anticuerpo secundario, que para ambos casos fue una IgG anti-IgG de conejo, producida en cabra, ligada a la enzima peroxidasa (Jackson®, cod. 111-035-144), en concentraciones de 1:4000 para ovoalbúmina y 1:5000 para caseína, y se dejó incubar por dos horas. A continuación las placas fueron lavadas con 300 µl, tres veces con una solución de 2,3 mg/ml de dodecil-sulfato de sodio (SDS) en PBS 1X, y luego dos veces sólo con PBS 1X. Finalmente, las placas fueron reveladas mediante la adición de trimetilbenzidina (TMB) (cod. T5999-01, US Biological®), que reacciona con la peroxidasa, virando el color a azul. Se dejó reaccionar por 10 minutos, y se detuvo con “solución de parado” (HCl, al 2N). Las densidades ópticas (D.O.) obtenidas en cada pocillo fueron leídas con un espectrofotómetro, a 450nm (BIO-RAD Model 680 Microplate READER®).

Las muestras fueron consideradas positivas cuando el promedio de los dos pocillos por muestra era mayor al promedio más tres veces la desviación estándar de los 8 controles negativos de la placa (Unruh *et al.* 2012). La prueba fue repetida para aquellos individuos en que la desviación estándar entre los dos pocillos fuese mayor al 50% del promedio.

Análisis estadístico

Para probar si la abundancia de presas (i.e. áfidos) en alfalfa afectó la abundancia de *H. variegata* en ella (Objetivo específico 1), se realizó un análisis de regresión lineal simple, en donde la variable respuesta fue la abundancia de esta especie en alfalfa, y la independiente la

abundancia de presas en ella. Esta prueba se realizó con el software SPSS Statistics®, previa transformación de ambas variables a $\ln(x+1)$.

Para verificar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y en los bordes se vio afectada por el tipo de borde que la rodeaba (Objetivo específico 2), se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W), donde el tratamiento fue cada hábitat en particular (alfalfa rodeada por cultivos anuales, alfalfa rodeada por vegetación arbórea, cultivos anuales y vegetación arbórea), y la variable respuesta la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y bordes. Luego, para comparar las diferencias entre tratamientos, se realizó una prueba de comparaciones múltiples a posteriori. Esto se realizó con el programa estadístico R-project (paquete “pgirmess”).

Finalmente, para evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa variaba en función de su abundancia en el borde y del movimiento desde y hacia los bordes (Objetivo 3), se realizó una regresión lineal múltiple por pasos o “stepwise”, la cual permite eliminar variables que no son importantes durante la regresión. La variable dependiente fue la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y las independientes fueron la abundancia de conoespecíficos en bordes y el número de individuos que se movieron hacia la alfalfa. El movimiento de individuos hacia los bordes no fue incorporado al análisis, ya que sólo se observaron cuatro eventos en total (ver “Resultados”). Ambas variables fueron transformadas a $\ln(x+1)$ para cumplir el supuesto de normalidad. Esto se realizó con el software SPSS Statistics®.

RESULTADOS

Características de las unidades muestrales

No hubo diferencias significativas en el tamaño de los alfalfaes ($F = 0,09$; 1, 11 g.l.; $p = 0,76$), mientras que los cultivos anuales fueron siete veces más grandes que los bordes de vegetación arbórea ($F = 14,83$; 1, 11 g.l.; $p = 0,003$). Los tamaños promedio ± 1 error estándar (ee) de los alfalfaes y sus bordes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño promedio (± 1 ee) de los alfalfaes y de sus bordes, en hectáreas, según tipo de borde (cultivo anual y vegetación arbórea).

	Cultivos anuales	Vegetación arbórea
Alfalfaes	7,06 ($\pm 1,64$)	6,28 ($\pm 1,99$)
Bordes	8,99 ($\pm 3,15$)	1,27 ($\pm 0,26$)

Tres de los seis alfalfaes con borde de cultivos anuales estuvieron rodeados por menos del 50% de este tipo de borde debido a que no se encontraron mejores réplicas en el área de estudio (promedio $0,48 \pm 0,11$ ee; rango $\sim 0,18 - 0,9$), mientras que todos los alfalfaes con borde de vegetación arbórea estuvieron rodeados en más de un 50% por este tipo de borde (promedio $0,7 \pm 0,06$; rango $\sim 53 - 93\%$). Sin embargo, esta proporción no fue significativamente mayor en bordes de vegetación arbórea que en los de cultivos anuales (ANDEVA, $p = 0,11$), por lo que la proporción de bordes que rodearon cada experimento fue similar en ambos tipos de borde.

Abundancia de coccinélidos en alfalfa y bordes, según tipo de borde

En total se colectaron 501 coccinélidos en alfalfa, 250 en alfalfaes con bordes de cultivos anuales, y 251 en aquellos con borde de vegetación arbórea. En bordes se colectaron en total 103 individuos, 69 en cultivos anuales y 34 en vegetación arbórea. Ningún coccinélido fue colectado en las trampas de 9 m de altura que se pusieron en los bordes de vegetación arbórea. *Hippodamia variegata* fue la especie dominante del ensamble, tanto en alfalfaes como

en bordes, seguida por *E. connexa*, *H. axyridis* e *H. convergens* (Tabla 2). La abundancia de todas las especies en cada experimento se muestra en el Apéndice 2.

Tabla 2. Abundancias totales y por especie en alfalfa y bordes, según tipo de borde. Entre paréntesis se encuentra la abundancia relativa en alfalfa y bordes según cada tipo de borde.

Tipo de borde	Especie	Abundancia en alfalfa	Abundancia en bordes
Cultivos anuales	Total	250	69
	<i>H. variegata</i>	219 (87,6%)	55 (79,7%)
	<i>E. connexa</i>	8 (3,2%)	9 (13%)
	<i>H. axyridis</i>	11 (4,4%)	0
	<i>H. convergens</i>	9 (3,6%)	3 (4,3%)
Vegetación arbórea	Total	251	34
	<i>H. variegata</i>	221 (88%)	28 (82,3%)
	<i>E. connexa</i>	11 (4,3%)	3 (8,8%)
	<i>H. axyridis</i>	11 (4,3%)	0
	<i>H. convergens</i>	8 (3,1%)	1 (2,9%)

Abundancia de áfidos

En total se contaron 349 áfidos, 279 (79,9%) en alfalfas rodeados por cultivos anuales y 70 (20,1%) en aquellos rodeados por vegetación arbórea. La abundancia observada en cada experimento se muestra en la Tabla 3.

Movimiento desde y hacia la alfalfa

En total se detectaron 86 eventos de movimiento, 82 desde los bordes hacia la alfalfa (16,3% del total de capturados en alfalfa) y sólo cuatro en sentido opuesto (3,8% del total capturado en bordes). De los movimientos hacia alfalfas, 33 ocurrieron desde bordes de cultivos anuales (32 *H. variegata* y 1 *H. axyridis*) y 49 desde vegetación arbórea (47 *H. variegata*, 1 *E. connexa* y 1 *H. axyridis*). Por otra parte, tres individuos se movieron desde alfalfa hacia bordes de cultivos

anuales (2 *H. variegata* y 1 *E. connexa*) y sólo uno hacia vegetación arbórea (*H. variegata*), lo que fue insuficiente para incluirlo en el análisis estadístico. No se detectó ningún movimiento de *H. convergens*. El número de movimientos hacia la alfalfa de *H. variegata* por experimento se muestra en la Tabla 3. Las densidades ópticas (D.O.) de las marcas detectadas por placa (pruebas de ELISA) se muestran en el Apéndice 3.

Tabla 3. Tipo de borde, número de individuos que se movieron desde los bordes hacia la alfalfa (inmigrantes) y abundancia de áfidos en alfalfa para cada alfalfa. CA: cultivos anuales, VA: vegetación arbórea.

Alfalfa	Tipo de borde	Inmigrantes <i>H. variegata</i>	Abundancia de áfidos
1	CA	1	162
4	CA	0	88
6	CA	0	17
7	CA	1	5
9	CA	26	2
12	CA	4	7
2	VA	21	11
3	VA	2	12
5	VA	0	1
8	VA	2	37
10	VA	11	2
11	VA	11	5

Objetivo específico 1: evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa varía en función de la abundancia de presas en ella.

La regresión lineal simple, para evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa estaba afectada por la abundancia de áfidos en el cultivo no fue significativa (R^2 ajustado = -0,04; β = -0,16; p = 0,5; Figura 5). Esto significa que, en este estudio, la abundancia de presas en alfalfa no explicó la abundancia de *H. variegata* en ella.

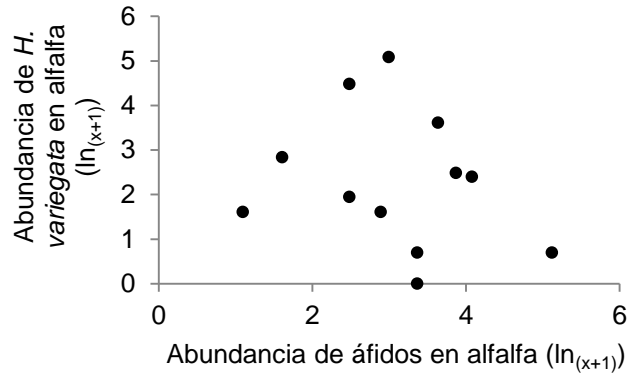


Figura 5. Relación entre la abundancia de *H. variegata* con la abundancia de áfidos en cada uno de los alfalfaes estudiados. La normalidad de los datos fue evaluada con una prueba de Shapiro-Wilk (abundancia de áfidos: $p = 0,5$; abundancia *H. variegata*: $p = 0,99$).

Objetivo específico 2: evaluar si la abundancia de *H. variegata* en los alfalfaes y en los bordes varía en función del tipo de borde.

La abundancia de *H. variegata* en alfalfaes rodeados por bordes de vegetación arbórea fue similar a la hallada en alfalfaes rodeados por cultivos anuales y significativamente mayor que la encontrada en ambos bordes (Figura 6). Sin embargo, el error estándar de la abundancia observada en alfalfaes rodeados por cultivos anuales fue tres veces mayor que en los rodeados por vegetación arbórea. No hubo diferencias significativas entre las abundancias de *H. variegata* en los bordes.

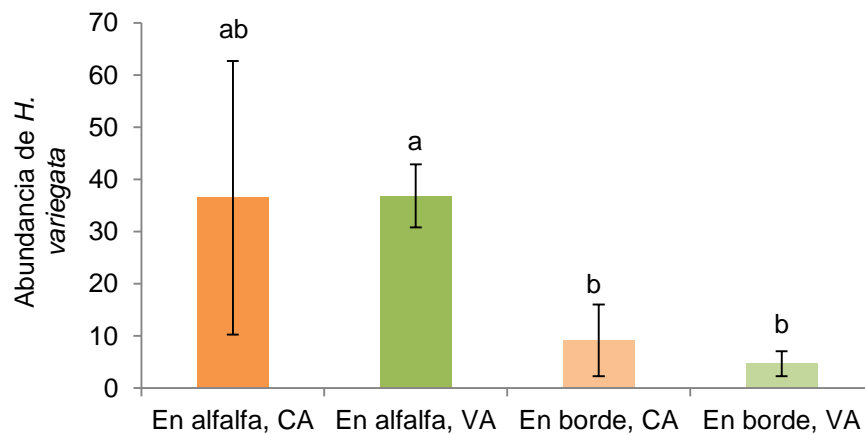


Figura 6. Abundancia de *H. variegata* en alfalfa y bordes según tipo de borde. Se muestra el promedio de las réplicas ± 1 error estándar. CA: cultivos anuales, VA: vegetación arbórea. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* (*chi cuadrado*= 11,49; 3 g.l.; $p= 0,009$).

Objetivo específico 3: evaluar si la abundancia de *H. variegata* en alfalfa varía en función de la abundancia en el borde y del movimiento desde y hacia los bordes.

La regresión lineal paso a paso arrojó una relación significativa entre la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y el número de individuos que se movieron desde el borde hacia la alfalfa (R^2 ajustado = 0,34; $\beta = 0,53$; $p = 0,026$; Figura 7). Sin embargo, la abundancia de conespecíficos en los bordes no afectó significativamente la abundancia de *H. variegata* en alfalfa ($p = 0,45$).

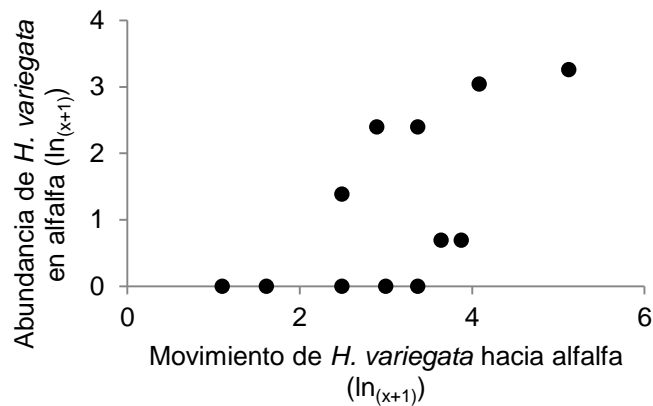


Figura 7. Relación entre la abundancia de *H. variegata* en alfalfa y el número de individuos que se movieron desde los bordes hacia la alfalfa. La normalidad de los datos fue evaluada con una prueba de Shapiro-Wilk ($p = 0,16$).

DISCUSIÓN

En este estudio se logró evaluar, en condiciones de campo, el efecto de la abundancia de áfidos en la alfalfa, del tipo de borde, de la abundancia de coccinélidos en los bordes y del movimiento desde los bordes hacia la alfalfa sobre la abundancia de *H. variegata* en alfalfa.

Los ensambles de coccinélidos en sistemas agrícolas suelen estar dominados por pocas especies (Wright & DeVries 2000, Pons *et al.* 2005, Day & Tatman 2006, Vandereycken *et al.* 2012). En este estudio, el ensamble estuvo fuertemente dominado por *H. variegata*, quien representó más del 80% de las colectas tanto en alfalfaes como en ambos bordes, y fue la única especie capturada en todos los experimentos (Apéndice 2). Las otras especies no superaron el 13% de abundancia relativa en los tres hábitats estudiados (Tabla 2). Esto era de esperar ya que, a partir de su introducción desde Sudáfrica en 1975, *H. variegata* se ha establecido con éxito en la zona centro del país, logrando dominar los ensambles de coccinélidos al menos desde 2003, en donde antes dominaba la nativa *E. connexa* (González 2006, Grez *et al.* 2012).

Un factor que permite explicar mayores abundancias de coccinélidos es que coexista una mayor abundancia de áfidos en un determinado momento o lugar (Honek 1982). Sin embargo, en este estudio no se observó una relación significativa entre estas variables. En un muestreo paralelo realizado en alfalfaes comerciales de la misma área de estudio, se midió la abundancia de *H. variegata*, *E. connexa*, *H. axyridis* y de áfidos en 23 alfalfaes durante toda la temporada, obteniendo mayores capturas que en este estudio, pero sin encontrar una relación en estas especies con la densidad de áfidos, excepto en *H. variegata*, donde se observó una relación inversa ($R^2 = 0,29$; $\beta = -0,34$; $p = 0,004$, datos no publicados). Sin embargo, cuando se analizó por estaciones, esta relación significativa sólo se observó en otoño ($R^2 = 0,29$; $\beta = -0,8$; $p = 0,004$). Este resultado sugiere que en alfalfa la densidad de *H. variegata*, estaría relacionada inversamente con la densidad de áfidos particularmente en otoño, relación que no habría sido posible detectar en el presente estudio dado que en esta época del año sólo se realizaron dos réplicas del experimento. Castillo (2013) evaluó esta relación, pero considerando nueve tipos de coberturas y la abundancia en toda la temporada de 13 especies de coccinélidos, 8 nativas y 5 exóticas, encontrando una relación significativa y directa. Al analizar por especie, Castillo (2013) encontró que sólo las exóticas *H. variegata* y *H. axyridis* se relacionaban positivamente con la densidad de áfidos, mientras que las nativas *E. connexa* y *C. sanguinea* no lo hicieron. Este

análisis más global, que muestra la respuesta de los coccinélidos a la abundancia de presas en los distintos hábitats del paisaje agrícola de Chile central, incluyendo un rango más amplio de disponibilidad de presas, junto a los resultados del estudio recién descrito, muestran que los coccinélidos sí responden a la densidad de áfidos, aunque no siempre de igual manera. Además, sus resultados muestran que esta relación depende también de la identidad del depredador, siendo las especies exóticas más sensibles que las nativas a la oferta de presas. Ello puede deberse a que las especies exóticas han coexistido por mucho tiempo con las especies exóticas de áfidos predominantes en el paisaje agrícola de Chile central. También demuestran la importancia de considerar la temporalidad para detectar una respuesta.

Los bordes que rodean un cultivo pueden influenciar la abundancia de enemigos naturales al proveer recursos complementarios como refugios o recursos alimenticios (Rand *et al.* 2006). Sin embargo en este estudio no se observó una influencia del tipo de borde en la abundancia de *H. variegata*. Otros estudios han mostrado que esta especie tiene preferencias por ciertos tipos de hábitat, sobre todo los más perturbados, como alfalfa, trigo, maíz y viñas (Rebolledo *et al.* 2007, Grez *et al.* 2013), por lo que en este caso habrían dos escenarios probables. En el primero se esperaría una mayor abundancia en alfalfa rodeados por cultivos anuales ya que, de haber una mayor abundancia en estos bordes en relación a los de vegetación arbórea, sería más probable que se muevan hacia la alfalfa. Sin embargo, en ambos bordes la abundancia fue similar. Por otra parte, también pudo haber ocurrido que menos individuos se hayan movido desde cultivos anuales hacia la alfalfa dado que en estos cultivos encuentran suficientes recursos para quedarse, con lo cual estos bordes hubiesen ofrecido una mayor resistencia al movimiento hacia la alfalfa, y la abundancia hubiese sido mayor en alfalfa rodeados por vegetación arbórea. No obstante, el número de individuos moviéndose desde ambos tipos de borde hacia la alfalfa fue similar entre sí ($p= 0,3$ con una prueba de Kruskal-Wallis). La ausencia de efectos de borde en el presente estudio puede deberse a que este efecto estaría modulado por la época del año, como lo observaron Grez *et al.* (2010) y Arancibia (2012), quienes encontraron efectos significativos del tipo de borde en los momentos en que *H. variegata* era más abundante. En el presente estudio, el efecto de la época del año no pudo ser analizado dada las limitaciones de costo y logísticas para hacer suficientes réplicas en las distintas estaciones. Por ello, en futuros estudios debería considerarse este factor.

Por otra parte, la falta de efectos del tipo de borde pudo deberse al bajo número de réplicas y alta variabilidad en la abundancia de *H. variegata* en alfalfa con bordes de cultivos anuales.

Ello se debió a que en uno de los experimentos cayeron ~9 veces más individuos que en las otras réplicas. Esta variabilidad pudo deberse a los distintos tipos de manejo que pueden tener los cultivos anuales y que pueden modular el movimiento de coccinélidos (e.g., aplicación de pesticidas, cosechas), en cambio los setos arbóreos no tienen manejo alguno. Por otra parte, en tres de los experimentos con borde de cultivos anuales, los alfalfaes estuvieron rodeados por menos de un 50% del este borde, siendo uno de ellos el experimento 9. Esto pudo haber incorporado variabilidad a las observaciones, ya que el resultado en esos casos pudo haberse debido a la influencia de los otros tipos de hábitat, entre los que se encontraban viñas, hábitats semiurbanos y vegetación arbórea. En todo caso, al remover esta réplica y disminuir esta fuente de variabilidad, el resultado fue similar, por lo que este alfalfal no estaría influyendo de manera relevante en los resultados. La menor variabilidad observada en alfalfaes con bordes de vegetación arbórea sugiere una mayor predictibilidad de la abundancia de *H. variegata* cuando los alfalfaes se encuentran rodeados por este tipo de vegetación que por cultivos anuales.

Si bien los alfalfaes pueden ofrecer temporalmente un gran subsidio de recursos, la permanencia de estos enemigos naturales en los cultivos de una temporada a otra depende de la calidad de otros hábitats más estables (Landis *et al.* 2000). La abundancia de *H. variegata* fue aproximadamente cinco veces mayor en alfalfa que en ambos bordes, lo que muestra una clara preferencia de esta especie por este tipo de cultivo, y coincide con lo descrito previamente (Rebolledo *et al.* 2007, Grez *et al.* 2013). Esta preferencia pudo deberse a que el muestreo se realizó cuando éste se encontraba en las mejores condiciones para la permanencia de los coccinélidos (i.e., cuando la alfalfa se encuentra en crecimiento), pero no significa que sea siempre un hábitat de alta calidad. De hecho es un cultivo altamente perturbado, con seis a siete cosechas durante la temporada.

El uso de la abundancia como estimador de calidad de hábitat ha resultado confuso dado que esta variable no siempre está relacionada con la adecuación biológica (i.e. reproducción y sobrevivencia) (Van Horne 1983, Johnson 2007). De esta forma, la recolonización y permanencia de coccinélidos en alfalfaes depende tanto de la calidad de sitios permanentes para la reproducción y refugio (e.g., hileras de vegetación o malezas) como de los recursos ofrecidos a escala local, en este caso, en alfalfaes (Pulliam 1988). Así, futuros estudios debieran considerar adquirir información sobre qué tipos de borde son ocupados como hábitats alternativos por los coccinélidos y en qué épocas del año.

Cuantificar el rol de los distintos tipos de hábitat en un paisaje agrícola como fuentes y sumideros de coccinélidos es importante para un correcto manejo del hábitat en control biológico de conservación (Lavandero *et al.* 2010). Los patrones de movimiento pueden ayudar a identificar parches que estén actuando como fuente de enemigos naturales en épocas particulares durante la temporada (MacFadyen & Muller 2013). Sobre esto, los resultados sugieren en primera instancia que los alfalfaes actuaron como sumideros (i.e. hábitat con alta tasa de inmigración y bajo éxito reproductivo, Pulliam 1988), al menos porque fue hacia ellos donde se movió la mayor cantidad de individuos, aunque esto debe corroborarse evaluando el éxito reproductivo en este cultivo, lo cual ha sido pobremente evaluado. De hecho, la abundancia de coccinélidos en la alfalfa sólo fue explicada por la cantidad de individuos que se movió hacia ella. Ello reafirma observaciones previas en que la inmigración hacia alfalfaes fue un factor importante en explicar la abundancia de coccinélidos en parches experimentales de alfalfa (Grez *et al.* 2005, Arancibia 2012) y en parches experimentales de brócoli (Grez & Prado 2000). En otro experimento realizado en paisajes artificiales de alfalfa, que fueron fragmentados manualmente, se mostró un aumento transitorio de la abundancia de coccinélidos en paisajes con mayor número de fragmentos. Esto se explicaría por una mayor importancia de la inmigración al inicio de este proceso, el cual se compensaría por otras variables demográficas como natalidad, mortalidad y reproducción más tarde (Grez *et al.* 2004). Por tanto, estos experimentos apoyan la hipótesis de que el proceso de dispersión es un factor importante en explicar la abundancia de estos enemigos naturales en cultivos.

Otros estudios han demostrado que la abundancia de coccinélidos en los cultivos es influenciada por el arreglo espacial de los distintos tipos de hábitats a una escala mayor (Elliot *et al.* 2002a, Gardiner *et al.* 2009, Grez *et al.* 2014). Esto porque a mayor escala el arreglo espacial va de la mano de la permeabilidad (o fricción) que genera el paisaje al movimiento de individuos, el que puede facilitar o dificultar su llegada hacia un parche determinado (Perovic *et al.* 2010). Una menor permeabilidad puede atribuirse a que los parches ofrecen gran cantidad de recursos (por lo que no necesitan moverse), o una alta tasa de mortalidad.

El mecanismo que explica el efecto significativo de la abundancia de enemigos naturales en los bordes sobre la abundancia de conespecíficos en alfalfa es que la probabilidad de que un individuo se mueva hacia ella aumenta conforme aumenta su abundancia en bordes. Sin embargo, a pesar que el movimiento hacia la alfalfa tuvo un efecto significativo, esto no fue acompañado por un efecto significativo de la abundancia de conespecíficos en los bordes. Esto

pudo deberse a que las trampas no fueron colocadas el tiempo suficiente para capturar el efecto de la abundancia de conespecíficos en los bordes, o a que no fueron colocadas cuando se puede observar el efecto. Sería interesante realizar un estudio similar pero colocando las trampas por más de cuatro días, y observar el movimiento antes y después de segar la alfalfa.

Adicionalmente, la detección de individuos que se movieron pudo haber sido influenciada por el uso de diferentes proteínas para marcar (i.e. ovoalbúmina y caseína). Esto porque se ha descrito que la caseína (proteína de la leche, utilizada para evaluar inmigración) es más inestable en terreno que la ovoalbúmina (proteína del huevo, utilizada para evaluar emigración) (Jones *et al.* 2006, Boina *et al.* 2009, T. Unruh com. pers.). Las marcas no se mezclaron por sugerencia del experto Thomas Unruh, pero sí se roció con una mayor concentración de leche en relación a lo descrito en la literatura. Que la mayor cantidad de individuos estuviesen marcados con caseína (i.e., proteína de la leche, encontrada en individuos que ingresaron al alfalfal) sugiere que esta marca sí es eficiente tanto en cultivos anuales como en vegetación arbórea a esta nueva concentración, aunque esto pudo deberse también a la mayor abundancia de individuos en alfalfales (a los que se probó contra caseína). Por otra parte, es poco probable que la baja cantidad de individuos marcados con ovoalbúmina (i.e. proteína del huevo, encontrada en individuos que se movieron del alfalfal a los bordes) se deba a su poca eficacia ya que, por el contrario, ha sido descrita como la más estable, por lo que es muy probable que refleje un efecto real (i.e., baja abundancia de individuos en los bordes).

En resumen, los resultados de este estudio apoyan parcialmente la hipótesis, ya que se encontró que la abundancia de coccinélidos en alfalfa sólo se relaciona con el movimiento de individuos desde el borde hacia este cultivo, independientemente del tipo de borde, de la densidad de coccinélidos en los bordes y de la densidad de áfidos en la alfalfa. Esto demuestra el valor de tener una mirada de paisaje al momento de formular nuevas hipótesis sobre los factores que modulan la abundancia de enemigos naturales en un cultivo agrícola. Facilitar el movimiento de los enemigos naturales hacia los cultivos puede hacerse siempre que se conozca qué tipos de parches de hábitat potencian el movimiento hacia los cultivos en momentos claves de la temporada (sobre todo en el periodo de crecimiento), ya sea porque la mortalidad en ellos es menor o porque son poco atractivos para estos insectos, por lo que avanzan en la búsqueda de recursos.

Es necesario continuar desentrañando los factores que determinan la abundancia de coccinélidos en un cultivo, e identificar bajo qué condiciones es posible favorecer una mayor colonización y abundancia de coccinélidos nativos. Experimentos con otros tipos de borde, que incorporen el efecto de la estacionalidad, que consideren variables reproductivas y otras escalas espaciales, entre otros factores, son necesarios para entender de mejor manera el efecto de la heterogeneidad del paisaje agrícola sobre los ensamblajes de coccinélidos en un cultivo.

Potenciar la permanencia de coccinélidos en paisajes agrícolas tiene consecuencias positivas no sólo para los agricultores, sino también para la conservación, por varios motivos. Primero porque, si esta permanencia se traduce en un mejor control biológico, significaría una reducción en el uso de pesticidas. Segundo porque se ha visto que para conservar enemigos naturales en paisajes agrícolas se requiere diversificar la disponibilidad de hábitats para enriquecer los ensamblajes y asegurar el servicio ecosistémico que proveen. El beneficio de esto es que un paisaje más diverso aumenta las probabilidades de ofrecer hábitats adecuados para otras especies, por lo cual estos insectos benéficos pueden ser usados como “paraguas” en una estrategia de conservación. Mantener hábitats permanentes y poco perturbados (e.g. vegetación arbórea) cerca de los cultivos puede significar un gran aporte a la conservación de estos coccinélidos y de otras especies en paisajes agrícolas, los que actualmente cubren más del 50% de la superficie terrestre.

CONCLUSIONES

- La abundancia de áfidos en alfalfa, el tipo de borde y la densidad de coccinélidos en los bordes no se relacionaron con la abundancia de coccinélidos en alfalfa.
- El movimiento de coccinélidos desde los bordes hacia los alfalfa se asocia positivamente con la abundancia de coccinélidos en este cultivo, reafirmando la importancia de la inmigración en mantener poblaciones abundantes de enemigos naturales dentro de un cultivo.
- Ello refuerza la necesidad de considerar la escala de paisaje en el manejo de plagas y sus enemigos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

Aichi Biodiversity Targets. Convention on Biological Diversity. [en línea] <<http://www.cbd.int/sp/targets/default.shtml>> [consulta: 14-08-2013].

Arancibia B (2012) Efectos del tipo de borde y de la presencia de depredadores homo y heteroespecíficos en la dispersión y abundancia de *Eriopis connexa* e *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) y de sus presas los áfidos (Homoptera: Aphididae) en alfalfa. Memoria para optar al título de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Chile.

Basoalto E, Miranda M, Knight AL & Fuentes E (2010) Landscape analysis of adult Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) distribution and dispersal within typical agroecosystems dominated by apple production in central Chile. *Environmental Entomology* 39: 1399-1408.

Banks JE (2004) Divided culture: integrating agriculture and conservation biology. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 537-545.

Blitzer EJ, Dormann CF, Holzschuh A, Klein AM, Rand TA & Tscharntke T (2012) Spillover of functionally important organisms between managed and natural habitats. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 146: 34-43.

Boina DR, Meyer WL, Onagbola EO & Stelinski LL (2009) Quantifying dispersal of *Diaphorinacitri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology* 38: 1250-1258.

Calabrese JM, Fagan WF (2004) A comparison-shopper's guide to connectivity metrics. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 529-536.

Castillo F (2013) Composición, abundancia y diversidad de coccinélidos nativos y exóticos en los distintos tipos de cobertura del paisaje agrícola de la zona sur-poniente de la Región Metropolitana. Memoria para optar al título de Biólogo Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Chile.

Corbett A & Rosenheim JA (1996) Impact of a natural enemy overwintering refuge and its interaction with the surrounding landscape. *Ecological Entomology* 21: 155-164.

Day WH & Tatman KM (2006) Changes in abundance of native and adventive Coccinellidae (Coleoptera) in alfalfa fields, in northern New Jersey (1993-2004) and Delaware (1999-2004). *U.S.A. Entomological News* 117: 491-502.

Dix ME, Johnson RJ, Harrell MO, Case RM & Wright RJ (1995) Influences of trees on abundance of natural enemies of insect pests: a review. *Agroforestry Systems* 29: 303-311.

Dowell RV, Cherry RH (2011) Survey traps for parasitoids, and coccinellid predators of the citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 29: 356-362.

Duelli P & Obrist MK (2003) Regional biodiversity in an agricultural landscape: the contribution of seminatural habitat islands. *Basic and Applied Ecology* 4: 129-138.

Elliot NC, Kieckhefer RW, Michels GJ & Giles KL (2002) Predator abundance in alfalfa fields in relation to aphids, within-field vegetation, and landscape matrix. *Community and Ecosystem Ecology* 31: 253-260.

Elliot NC, Kieckhefer RW & Beck DA (2002a) Effect of aphids and the surrounding landscape on the abundance of Coccinellidae in cornfields. *Biological Control* 24: 214-220.

Ellis EC, Goldewijk KK, Siebert S, Lightman D & Ramankutty N (2010) Anthropogenic transformation of the biomes, 1700 to 2000. *Global Ecology and Biogeography* 19: 589-606.

Evans EW & Youssef NN (1992) Numerical response of aphid predators to varying prey density among Utah alfalfa fields. *Journal of the Kansas Entomological Society* 65: 30-38.

Evans EW (2003) Searching and reproductive behavior of female aphidophagous ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): a review. *European Journal of Entomology* 100: 1-10.

Fahrig L (2007) Non-optimal animal movement in human-altered landscapes. *Functional Landscapes* 21: 1003-1015.

Fahrig L, Baudry J, Brotons L, Burel FG, Crist TO, Fuller RJ, Sirami C, Siriwardena GM, Martin JL (2011) Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecology Letters* 14: 101-112.

Foley JA, Defries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Tamankutty N & Snyder PK (2005) Global consequences of land use. *Science* 309: 570-574.

Gardiner MM, Landis DA, Gratton C, DiFonzo CD, O'Neal M, Chacon JM, Wayo MT, Schmidt NP, Mueller EE & Heimpel GE (2009) Landscape diversity enhances biological control of an introduced crop pest in the north-central USA. *Ecological Applications* 19: 143-154.

Grez AA, Prado E (2000) Effect of plant shape and surrounding vegetation on the dynamics of predatory coccinellids and their prey *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphidae). *Environmental Entomology* 29: 1244-1250.

Grez AA, Zaviezo T, Tischendorf L, Fahrig L (2004) A transient, positive effect of habitat fragmentation on insect population densities. *Oecologia* 141: 444-451.

Grez AA, Zaviezo T, Ríos M (2005) Ladybird (Coleoptera: Coccinellidae) dispersal in experimental fragmented alfalfa landscapes. *European Journal of Entomology* 102: 209-216.

Grez AA, Torres C, Zaviezo T, Lavandero B & Ramírez M (2010) Migration of coccinellids to alfalfa fields varying in adjacent vegetation in central Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 37: 111-121.

Grez AA, Viera B & Soares O (2012) Biotic interactions between *Eriopsis connexa* and *Hippodamia variegata*, a native and an exotic coccinellid species associated with alfalfa fields in Chile. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 36-44.

Grez AA, Rand TA, Zaviezo T & Castillo F (2013) Land use intensification differentially benefits alien over native predators in agricultural landscape mosaics. *Diversity and Distributions*, 19: 749-759.

Grez AA, Zaviezo T, Hernández J, Rodríguez-San Pedro A & Acuña P (2014) The heterogeneity and composition of agricultural landscapes influence native and exotic coccinellids in alfalfa fields. *Agricultural and Forest Entomology* (En prensa).

González G (2006) Los Coccinellidae de Chile. [en línea] <<http://www.coccinellidae.cl/inicio.php>> [consulta: 19-08-2013].

Holland J & Fahrig L (2000) Effect of woody borders on insect density and diversity in crop fields: a landscape-scale analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78: 115–122.

Honek A (1982) Factors which determine the composition of field communities of adult aphidophagous Coccinellidae (Coleoptera). *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 94: 157-168.

Horton DR, Jones VP & Unruh TR (2009) Use of a new Immunomarking method to assess movement by generalist predators between a cover crop and tree canopy in a pear orchard. *American Entomologist* 55: 49-56.

Ives AR, Kareiva P, Perry R (1993) Response of a predator to variation in prey density at three hierarchical scales: lady beetles feeding on aphids. *Ecology* 74: 1929-1938.

Johnson MD (2007) Measuring habitat quality: a review. *The Condor* 109: 489-504.

Jones VP, Hagler JR, Brunner JF, Baker CC & Wilburn TD (2006) An inexpensive immunomarking technique for studying movement patterns of naturally occurring insect populations. *Environmental Entomology* 35: 827-836.

Landis DA, Wratten SD & Gurr GM (2000) Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45: 421-434.

Langellotto GA & Denno RF (2004) Responses of invertebrate natural enemies to complex-structured habitats: a meta-analytical synthesis. *Oecologia* 139: 1-10.

Lavandero B, Wratten S, Hagler J & Jervis J (2004) The need for effective marking and tracking techniques for monitoring the movements of insect predators and parasitoids. *International Journal of Pest Management* 50: 147-151.

Lilia E, Frías MT (1987) Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA, principios y aplicación en la rama Agropecuaria. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba.

Losey JE & Vaughan M (2006) The economic value of ecological services provided by insects. *BioScience* 56: 311-323.

MacFadyen S & Muller W (2013) Edges in agricultural landscapes: Species interactions and movement of natural enemies. *PLoS ONE* 8: e59659. doi:10.1371/journal.pone.0059659.

Murdoch WW (1973) The functional response of predators. *Journal of Applied Ecology* 10: 335-342.

Norris K (2008) Agriculture and biodiversity conservation: opportunity knocks. *Conservation Letters* 1: 2-11.

Perovic D, Gurr G, Raman A & Helen N (2010) Effect of landscape composition and arrangement on biological control agents in a simplified agricultural system: A cost–distance approach. *Biological control* 52: 263-270.

Pons X, Núñez E, Lumbierres B & Albajes R (2005) Epigeal aphidophagous predators and the role of alfalfa as a reservoir of aphid predators for arable crops. *European Journal of Entomology* 102: 519-525.

Pulliam HR (1988) Sources, sinks and population regulation. *The American Naturalist*, 132: 652-661.

Rand TA, Tylianakis JM & Tscharntke T (2006) Spillover edge effects: the dispersal of agriculturally subsidized insect natural enemies into adjacent natural habitats. *Ecology Letters* 9: 603-614.

Readshaw JL (1973) The numerical response of predators to prey density. *Journal of Applied Ecology* 10: 342-351.

Rebolledo R, Palma R, Klein C & Aguilera A (2007) Coccinellini (Col. Coccinellidae) presentes en diferentes estratos vegetacionales en la IX región de la Araucanía (Chile). *Idesia* 25: 63-71.

Riechert SE & Lockley T (1984) Spiders as biological control agents. *Annual Review of Entomology* 29: 299-320.

Ries L, Fletcher RJ, Battin J & Sisk TD (2004) Ecological responses to habitat edges: mechanisms, models and variability explained. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 491-522.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, LeRoy N, Skeyes MT, Walker BH, Walker M & Wall DH (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.

Schellhorn N & Andow D (2005) Response of coccinellids to their aphid prey at different spatial scales. *Population Ecology* 47: 71-76.

Shear K (2000) The diversity-stability debate. *Nature* 405: 228-233.

Slogget JJ (2008) Habitat and dietary specificity in aphidophagous ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): Explaining specialization. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 19: 95-113.

Snyder WE & Ives AR (2003) Interactions between specialist and generalist natural enemies: parasitoids, predators, and pea aphid biocontrol. *Ecology* 84: 91-107.

Snyder GB, Finke DL & Snyder WE (2008) Predator biodiversity strengthens aphid suppression across single- and multiple-species prey communities. *Biological Control* 44: 52-60.

Soto P (2000) Introducción. In: Alfalfa en la zona centro sur de Chile. INIA. Chillán, Chile. 265 p.

Straub CS, Finke DL & Snyder WE (2008) Are the conservation of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals? *Biological Control* 45: 225-237.

Symondson WOC, Sunderland KD & Greenstone MH (2002) Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review Entomology* 47: 561-594.

Tscharntke T, Klein AM, Kruess A, Steffan-Dewenter I & Thies C (2005) Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. *Ecology Letters* 8: 857-874.

Tscharntke T, Bommarco R, Clough J, Crist TO, Kleijn D, Rand TA, Tylianakis JM, Van Nouhuys S & Vidal S (2007) Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. *Biological Control* 43: 294-309.

Unruh TR, Pfannenstiel RS, Peters C, Brunner JF & Jones VP (2012) Parasitism of leafrollers in Washington fruit orchards is enhanced by perimeter plantings of rose and strawberry. *Biological Control* 62: 162-172.

Vandereycken A, Durieux D, Joie E, Haubruge E & Verheggen FJ (2012) Habitat diversity of the Multicolored Asian ladybeetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in agricultural and arboreal ecosystems: a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16: 553-563.

Van Horne B (1983) Density as a misleading indicator of habitat quality. *The Journal of Wildlife Management* 47: 893-901.

Villegas CM, Verdugo JA, Grez A, Tapia J & Lavandero B (2013) Movement between crops and weeds: temporal refuges for aphidophagous insects in Central Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 40: 317-326.

Wright RJ & DeVries TA (2000) Species composition and relative abundance of Coccinellidae (Coleoptera) in south central Nebraska field crops. *Journal of Kansas Entomology Society* 73: 103-111.

Zaviezo T, Grez AA & Donoso D (2004) Dinámica temporal de coleópteros asociados a alfalfa. *Ciencia e Investigación Agraria* 31: 29-38.

APÉNDICES

Apéndice 1: Caracterización de las unidades muestrales. Las áreas y los perímetros fueron obtenidos a una escala 1:2000 mediante ArcGIS® 9.3. Falso Acacio: *Robinia pseudoacacia*, Zarzamora: *Rubus* sp., Álamo: *Populus* sp., Eucalipto: *Eucalyptus* sp., Olmo: *Ulmus* sp., Sauce llorón: *Salix* sp., Espino: *Acacia caven.*, Quillay: *Quillaja saponaria*.

Experimento	Fecha	Temporada	Tipo de borde	Especies dominantes en el borde	Área alfalfal (ha)	Área borde (ha)	Perímetro tratamiento/ perímetro total (%)
1	02-06/01/2012	Verano	Cultivo anual	Maíz	6,44	10,03	90
2	09-13/01/2012	Verano	Vegetación arbórea	Falso Acacio con Zarzamora	14,2	1,8	92,2
3	16-20/01/2012	Verano	Vegetación arbórea	Álamo con Zarzamora	7,83	2,28	66,4
4	02-06/02/2012	Verano	Cultivo anual	Maíz	12,92	1,6	25
5	16-20/04/2012	Otoño	Vegetación arbórea	Olmo con Zarzamora	2,54	0,93	78,4
6	03-07/05/2012	Otoño	Cultivo anual	Papa	3,21	3,08	53,1
7	27/09-01/10/2012	Primavera	Cultivo anual	Trigo	5,33	4,95	61,23
8	10-13/10/2012	Primavera	Vegetación arbórea	Sauce llorón, Eucalipto y Álamo	8,73	0,68	53,59
9	05-09/11/2012	Primavera	Cultivo anual	Trigo	10,97	11,77	18,08
10	15-19/11/2012	Primavera	Vegetación arbórea	Eucalipto, Zarzamora y Espino	1,93	1,23	54,01
11	25-29/11/2012	Primavera	Vegetación arbórea	Eucalipto, Quillay, Zarzamora, Álamo y Espino	2,44	0,74	77,81
12	03-07/01/2013	Verano	Cultivo anual	Maíz	3,48	22,53	38,67

Apéndice 2: Abundancias totales y por especie colectadas en cada experimento, según tratamiento (Ab.: abundancia).

Tipo de borde	Experimento	Ab. en alfalfa	Especies	Ab. por especie en alfalfa	Ab. en borde	Especies	Ab. por especie en borde
Cultivos anuales	1	21	<i>H. variegata</i>	20	3	<i>H. variegata</i>	0
			<i>E. connexa</i>	0		<i>E. connexa</i>	3
			<i>H. axyridis</i>	1		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	0
	4	12	<i>H. variegata</i>	12	7	<i>H. variegata</i>	7
			<i>E. connexa</i>	0		<i>E. connexa</i>	2
			<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	0
	6	5	<i>H. variegata</i>	5	3	<i>H. variegata</i>	3
			<i>E. connexa</i>	0		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	0
	7	13	<i>H. variegata</i>	3	2	<i>H. variegata</i>	2
			<i>E. connexa</i>	0		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	9		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	0
9	180	<i>H. variegata</i>	167	47	<i>H. variegata</i>	43	
		<i>E. connexa</i>	1		<i>E. connexa</i>	0	
		<i>H. axyridis</i>	1		<i>H. axyridis</i>	0	
		<i>H. convergens</i>	8		<i>H. convergens</i>	3	
12	16	<i>H. variegata</i>	12	5	<i>H. variegata</i>	0	
		<i>E. connexa</i>	0		<i>E. connexa</i>	0	
		<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0	
		<i>H. convergens</i>	1		<i>H. convergens</i>	0	
Vegetación arbórea	2	59	<i>H. variegata</i>	59	8	<i>H. variegata</i>	5
			<i>E. connexa</i>	1		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	1
	3	48	<i>H. variegata</i>	48	0	<i>H. variegata</i>	0
			<i>E. connexa</i>	2		<i>E. connexa</i>	1
			<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	0		<i>H. convergens</i>	0
	5	42	<i>H. variegata</i>	29	1	<i>H. variegata</i>	1
			<i>E. connexa</i>	4		<i>E. connexa</i>	1
			<i>H. axyridis</i>	8		<i>H. axyridis</i>	0

Tipo de borde	Experimento	Ab. en alfalfa	Especies	Ab. por especie en alfalfa	Ab. en borde	Especies	Ab. por especie en borde
			<i>H. convergens</i>	4		<i>H. convergens</i>	0
	8	42	<i>H. variegata</i>	38	17	<i>H. variegata</i>	16
			<i>E. connexa</i>	3		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	1		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	1		<i>H. convergens</i>	0
	10	35	<i>H. variegata</i>	29	2	<i>H. variegata</i>	2
			<i>E. connexa</i>	5		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	2		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	1		<i>H. convergens</i>	0
	11	25	<i>H. variegata</i>	18	4	<i>H. variegata</i>	4
			<i>E. connexa</i>	3		<i>E. connexa</i>	0
			<i>H. axyridis</i>	0		<i>H. axyridis</i>	0
			<i>H. convergens</i>	2		<i>H. convergens</i>	0

Apéndice 3: densidades ópticas (D.O.) por placa de las pruebas de ELISA. Prom. (+): promedio de los resultados positivos (con marca); D.E. (+): desviación estándar de los resultados positivos (– significa que hubo uno o ningún positivo); Prom (-): promedio de los resultados negativos; D.E. (-): desviación estándar de los resultados negativos; Prom. Control (-): promedio de los 8 controles negativos por placa; D.E. control (-): desviación estándar de los 8 controles negativos por placa; Prom. blancos: promedio de los 4 blancos (solución de extracción); D.E. blancos: desviación estándar de los 4 blancos; Umbral: umbral calculado por placa (promedio + 3 D.E. control negativo). Las especies se encuentran abreviadas por sus iniciales.

Placa	Prom. (+)	D.E. (+)	Prom. (-)	D.E. (-)	Prom. control (-)	D.E. control (-)	Prom. blancos	D.E. blancos	Umbral	Especie (n° de positivos)
Anti-caseína (movimiento hacia alfalfa)										
1	0,282	0,267	0,053	0,006	0,048	0,006	0,046	0,004	0,068	<i>H.v</i> (3)
2	0,104	0,035	0,057	0,006	0,050	0,005	0,048	0,003	0,066	<i>H.v</i> (19)
3	0,083	0,007	0,055	0,006	0,056	0,006	0,060	0,011	0,074	<i>H.v</i> (2)
4	-	-	0,048	0,005	0,049	0,006	0,053	0,005	0,068	<i>H.v</i> (0)
5	0,093	-	0,046	0,005	0,049	0,008	0,051	0,005	0,073	<i>H.v</i> (1)
6	0,136	0,105	0,049	0,008	0,050	0,007	0,048	0,004	0,072	<i>H.v</i> (4)
7	0,062	-	0,042	0,005	0,057	0,008	0,050	0,007	0,060	<i>H.v</i> (1)
8	0,156	0,087	0,055	0,010	0,057	0,008	0,050	0,007	0,081	<i>H.v</i> (8)
9	0,201	0,100	0,064	0,017	0,082	0,008	0,051	0,003	0,122	<i>H.v</i> (6)
10	0,260	0,236	0,069	0,010	0,073	0,006	0,075	0,004	0,090	<i>H.v</i> (15)
11	0,430	0,396	0,078	0,011	0,070	0,010	0,076	0,011	0,098	<i>H.v</i> (19)
12	0,366	-	0,055	0,012	0,051	0,007	0,051	0,004	0,087	<i>E.c</i> (1)
12	0,097	-	0,047	0,007	0,056	0,006	0,051	0,004	0,074	<i>H.a</i> (1)
13	-	-	0,148	0,189	0,138	0,031	0,084	0,020	0,232	<i>H.c</i> (0)
Anti-ovoalbúmina (movimiento hacia bordes)										
14	-	-	0,053	0,006	0,072	0,007	0,052	0,004	0,092	<i>H.v</i> (1)
15	0,094	0,030	0,054	0,005	0,056	0,005	0,046	0,002	0,070	<i>H.v</i> (2)
16	0,084	0,006	0,059	0,006	0,058	0,006	0,048	0,001	0,075	<i>H.v</i> (2)
16	0,108	-	0,061	0,010	0,066	0,006	0,048	0,001	0,085	<i>E.c</i> (1)
16	0,117	-	0,053	0,007	0,053	0,006	0,048	0,001	0,072	<i>H.a</i> (1)
17	-	-	0,054	0,009	0,054	0,007	0,044	0,001	0,076	<i>H.v</i> (0)