

SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE EUCALIPTO A *Gonipterus scutellatus* Y PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS MARCADORAS DEL ADULTO

SUSCEPTIBILITY OF EUCALYPTUS SPECIES TO *Gonipterus scutellatus* AND ELECTROPHORETIC PROFILES OF ADULT MARKER PROTEINS

Amanda Huerta-Fuentes¹, Italo Chiffelle-Gómez², Maryi Serrano-Garzón¹,
Tatiana Vázquez-Silva¹ y Jaime Araya-Clericus³

¹Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile, Casilla 9206, Santiago, Chile. (ahuerta@uchile.cl), (ahuertaf@gmail.com) ²Departamento de Agroindustria y Enología, ³Departamento de Sanidad Vegetal Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Casilla 1004. Santiago, Chile.

RESUMEN

En Chile, el gorgojo australiano *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), específico del eucalipto y detectado por primera vez en 1998, se ha distribuido en las regiones IV a IX, y podría afectar a más de 525 mil ha de *Eucalyptus*. El insecto se alimenta del follaje nuevo y causa pérdidas de crecimiento. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la susceptibilidad de las especies de eucalipto más importantes en Chile al daño por *G. scutellatus*, caracterizar el peso molecular (kDa) de las proteínas de gorgojos adultos alimentados en ellas, y buscar proteínas marcadoras en los insectos asociadas a la especie de eucalipto de la que se alimentan. La susceptibilidad de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* ssp. *globulus* Labill. y *E. robusta* Smith a insectos adultos se midió por la pérdida de área foliar. Las proteínas de los adultos se analizaron por electroforesis, comparando el tamaño e intensidad de las bandas de geles. *E. camaldulensis* fue más susceptible ($p \leq 0.05$; 12.93% pérdida de área foliar) que *E. robusta* (6.36%) y *E. globulus* (5.46%). Los adultos alimentados con *E. robusta* presentaron el mayor número de proteínas (22). Aquellos alimentados con cada una de las tres especies de eucalipto por separado tuvieron 15 proteínas comunes, y nueve exhibieron variaciones (proteínas marcadoras): los adultos alimentados con *E. robusta* tuvieron siete proteínas marcadoras; *E. camaldulensis* y *E. globulus* tres proteínas cada uno. Los gorgojos alimentados con *E. robusta* tuvieron tres proteínas marcadoras exclusivas (9, 31 y 38 kDa); los alimentados con *E. camaldulensis* y *E. globulus* sólo tuvieron una cada uno (35 y 47 kDa). Así, los gorgojos alimentados con los tres eucaliptos tuvieron tres perfiles distintos de proteínas.

Palabras clave: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus*, *E. robusta*, gorgojo del eucalipto, proteínas marcadoras.

ABSTRACT

In Chile, the Australian weevil *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), specific to eucalyptus, was first detected in 1998. It has spread through the IV to IX Regions and could affect more than 525 thousand ha of *Eucalyptus*. The insect feeds on new foliage and causes losses in growth. The objectives of this study were to evaluate the susceptibility of Chile's most important eucalyptus species to damage by *G. scutellatus*, to characterize the molecular weight (kDa) of proteins of adult weevils that feed on the trees, and to identify marker proteins of the insects associated with the species of eucalyptus on which they feed. Susceptibility of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* sp. *globulus* Labill. and *E. robusta* Smith to adult insects was measured by leaf area loss. The proteins of the adults were analyzed by electrophoresis, comparing size and intensity of the bands of gels. *E. camaldulensis* was more susceptible ($p \leq 0.05$; 12.93% leaf area loss) than *E. robusta* (6.36%) or *E. globulus* (5.46%). Adults fed with *E. robusta* had the highest number of proteins (22). Those fed with each one of the three eucalyptus species separately had 15 proteins in common, and nine exhibited variations (marker proteins). Adult weevils fed *E. robusta* had seven marker proteins; *E. camaldulensis* and *E. globulus* had three marker proteins each. Weevils fed *E. robusta* had three marker proteins exclusive to these insects (9, 31 and 38 kDa), while those fed with *E. camaldulensis* and *E. globulus* had only one each (35 and 47 kDa). Thus, the three groups of weevils fed with different eucalyptus species had different protein profiles.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus*, *E. robusta*, eucalyptus weevil, marker proteins.

INTRODUCTION

The eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, is an Australian Curculionidae specific to *Eucalyptus* spp. (Withers, 2001), and infestation by this pest is considered one of the most severe in its country of origin. This species has been found in eucalyptus plantations in Africa, Europe

INTRODUCCIÓN

El gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, es un Curculionidae australiano específico de *Eucalyptus* spp. (Withers, 2001), y se le considera una de las plagas más severas en su lugar de origen. Esta especie se ha encontrado en plantaciones de eucalipto en África, Europa (Mansilla, 1992; Cordero *et al.*, 1999), California (Cowles y Downer 1995; Hanks *et al.* 2000), y Nueva Zelanda (Withers, 2001). En Sudamérica se describió en Argentina en 1926 (Rosado-Neto, 1993), en Uruguay en 1943, en Brasil en 1955 y en Chile en 1998 (Rosado-Neto, 1993; Beéche, 1999).

Las larvas y los adultos de *G. scutellatus* se alimentan del follaje de eucalipto en crecimiento. El crecimiento de las poblaciones del gorgojo en pocos años se favorece con la abundancia de hospedantes preferidos, condiciones de clima templado, especialmente temperatura y precipitaciones, y ausencia de enemigos naturales (Tooke, 1953). En la V Región de Chile (San Felipe), *G. scutellatus* tiene 3 a 4 generaciones por año (Estay *et al.*, 2002). El alto potencial reproductivo del insecto, junto con su capacidad de defoliación intensa puede causar pérdidas de crecimiento o deformaciones (Santolamazza y Cordero, 1998); incluso los árboles pueden morir debido a infestaciones continuas (Elliott and De Little, 1985).

G. scutellatus tiene marcada preferencia por algunas especies de *Eucalyptus* (Cordero y Santolamazza, 2000). En Chile, la especie más afectada es *E. globulus* ssp. *globulus*, seguida de *E. camaldulensis* Den. y *E. viminalis* Labill (Lanfranco y Dungey, 2001).

Las primeras infestaciones de *G. scutellatus* en Chile se encontraron en las regiones V y Metropolitana (Beéche, 1999), lo que ha generado preocupación por el futuro de las 525 057 ha plantadas con *Eucalyptus* spp. (INFOR, 2006). Esta plaga se ha desplazado entre las regiones IV a IX (SAG, 2006). Según Klein y Waterhouse (2000) su importancia como plaga del eucalipto es superada únicamente por *Phoracantha semipunctata* F. (Coleoptera: Cerambycidae).

Los compuestos secundarios de las plantas se consideran medios de defensa química contra los insectos (Dajoz, 2001). Estos compuestos reducen el poder digestivo de los insectos o bien reaccionan como antiapetitivos. En las plantas leñosas la concentración de estos compuestos es elevada, especialmente de taninos (polifenoles), terpenos y ligninas.

Hay variación en la susceptibilidad de *Eucalyptus* spp., y se consideran sensibles a *G. scutellatus*: *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. viminalis*, *E. robusta*, *E. punctata*, *E. maideni* y *E. smithi*; y resistente *E. saligna*, e inmune *E. citriodora* (Romanyk y Cadahia,

Mansilla, 1992; Cordero *et al.*, 1999), California (Cowles and Downer, 1995; Hanks *et al.*, 2000) and New Zealand (Withers, 2001). In South America it was described in Argentina in 1926 (Rosado-Neto, 1993), in Uruguay in 1943, in Brazil in 1955 and in Chile in 1998 (Rosado-Neto, 1993; Beéche, 1999).

G. scutellatus larvae and adults feed on growing eucalyptus foliage. Weevil population growth in only a few years is favored by the abundance of preferred hosts, temperate climatic conditions, especially temperature and precipitation, and the absence of natural enemies (Tooke, 1953). In the V Region of Chile (San Felipe), *G. scutellatus* reproduces at a rate of 3 to 4 generations per year (Estay *et al.*, 2002). The high reproductive potential of the insect, together with its capacity for intense defoliation, can cause deformations or losses in growth (Santolamazza and Cordero, 1998), and even death of the trees from continuous infestations (Elliott and De Little, 1985).

G. scutellatus has a marked preference for certain species of *Eucalyptus* (Cordero and Santolamazza, 2000). In Chile, the most affected species is *E. globulus* sp. *globulus*, followed by *E. camaldulensis* Den. and *E. viminalis* Labill (Lanfranco and Dungey, 2001).

The first infestations of *G. scutellatus* in Chile were found in the V and Metropolitan Regions (Beéche, 1999) and caused concern for the future of 525 057 ha of *Eucalyptus* spp. plantations (INFOR, 2006). This pest has spread into the IV through the IX Regions (SAG, 2006). According to Klein and Waterhouse (2000), its importance as a eucalyptus pest is surpassed only by *Phoracantha semipunctata* F. (Coleoptera: Cerambycidae).

The secondary compounds of plants are considered chemical defense measures against insects (Dajoz, 2001). These compounds reduce the digestive ability of the insects or react as anti-appetitive. In woody plants the concentration of these compounds is high, especially of tannins (polyphenols), terpenes and lignins.

There is variation in susceptibility among *Eucalyptus* spp. and those considered susceptible to *G. scutellatus* are: *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. viminalis*, *E. robusta*, *E. punctata*, *E. maideni* and *E. smithi*, while *E. saligna* is resistant and *E. citriodora* is immune (Romanyk and Cadahia, 2002). According to Floyd and Foley (2001), resistance of eucalyptus species to pests may lie in the chemical composition of the leaves. In *E. milliadora* A. Cunn. ex Schauer, *E. sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls and *E. camaldulensis*, an inverse relationship between the concentration of 1,8-cineol (a monoterpene), or sideroxylonal, which is found in the essential oils of the leaves, and susceptibility to phytophagous insects has been observed.

2002). Según Floyd y Foley (2001), la resistencia de especies de eucalipto a plagas puede basarse en la composición química de las hojas. En *E. melliodora* A. Cunn. ex Schauer, *E. sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls y *E. camaldulensis*, se ha observado una relación inversa entre la concentración de 1,8-cineol (un monoterpeno) o bien sideroxilona, que se encuentran en los aceites esenciales de las hojas, y la susceptibilidad a fitófagos.

Aunque todas las células de los insectos comparten el mismo genoma, pueden tener distintos genes en actividad y, por tanto, elaborar proteínas diferentes (Ezzel, 2002). Los insectos desarrollan estrategias para eludir las defensas de las plantas; por ejemplo, aumentan su actividad proteolítica o inducen la generación de proteínas resistentes a proteasas de las plantas. La expresión de las proteínas depende del ambiente al cual se somete el insecto. Es decir, dependiendo de su alimentación, el insecto expresa algunas proteínas exclusivas (Vivanco *et al.*, 2005).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la susceptibilidad de varias especies de eucalipto al daño por *G. scutellatus*, caracterizar el peso molecular de las proteínas de adultos del insecto alimentados con esas especies de eucalipto, y buscar proteínas exclusivas (marcadoras) asociadas al alimento recibido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la pérdida de área

Los adultos de *G. scutellatus* se recolectaron a fines de verano en un rodal joven de *E. globulus* muy infestado (60 a 80% de los brotes apicales dañados) en la Provincia de San Felipe (V Región en Chile central), y se trasladaron en bolsas de tela en cajas térmicas al Laboratorio de Entomología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, en Santiago. Allí se mantuvieron en cajas plásticas de 5 L y se alimentaron con hojas frescas de *E. globulus* (Santolamazza y Cordero, 1998).

Se usaron plantas de un año (1 m altura aproximada) de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. robusta* Smith en macetas plásticas (19 cm diámetro) con una mezcla de suelo, arena y turba tratada con captan 2 g L⁻¹ y urea. Estas plantas se pusieron en jaulas (1.8×1.5×1.8 m) rodeadas con tul para prevenir el escape de los insectos, en condiciones de campo bajo clima mediterráneo e irrigación periódica. En cada planta tratada se pusieron dos adultos (una hembra y un macho), que se alimentaron por un mes. Dado que la recolección se hizo a fines de verano (marzo), la edad de los adultos fluctuó entre uno y dos meses (Estay *et al.*, 2002). Se usó como testigo plantas sin insectos. En cada planta se midió el área foliar (cm²) al inicio y al término del experimento, con una cuadrícula de 0.5 cm para obtener la variación de área. Se usó la razón del área foliar, correspondiente al cociente entre las mediciones final e inicial por planta. Los resultados tuvieron un buen ajuste a la distribución

Although all of the cells of the insects share the same genome, they may have different active genes and, therefore, produce different proteins (Ezzel, 2002). Insects develop strategies to elude plant defenses. For example, they increase their proteolytic activity or induce the generation of proteins resistant to plant proteases. The expression of the proteins depends on the environment to which the insect is subject, that is, depending on what it feeds on, the insect expresses some exclusive proteins (Vivanco *et al.*, 2005).

The objectives of this study were to evaluate the susceptibility of several eucalyptus species to damage by *G. scutellatus*, to characterize the molecular weight of the proteins of adult insects fed with these eucalyptus species, and to identify exclusive proteins (markers) associated with the species fed to the insects.

MATERIALS AND METHODS

Assessment of leaf area loss

Adult *G. scutellatus* were collected at the end of summer from a highly infested young stand of *E. globulus* (60 to 80% damaged apical shoots) in the province of San Felipe (V Region in central Chile) and transported in cloth bags in insulated boxes to the Forest Entomology Laboratory of the College of Forestry Sciences of the University of Chile, Santiago. There they were kept in 5 L plastic boxes and fed on fresh *E. globulus* leaves (Santolamazza and Cordero, 1998).

One-year-old (approximately 1 m in height) *E. camaldulensis*, *E. globulus* and *E. robusta* Smith plants were planted in plastic pots (19 cm diameter) with a soil, sand and peat mixture treated with 2 g L⁻¹ Captan and urea. These plants were placed in cages (1.8×1.5×1.8 m) covered with tulle to prevent insects from escaping; cages were kept under field conditions with a Mediterranean climate and periodic irrigation. Two adults (one female and one male) were placed on each treated plant and fed during one month. Since collection was done at the end of summer (March), the age of the adults oscillated between one and two months (Estay *et al.*, 2002). Plants without insects were used as control. In each plant, leaf area (cm²) was measured at the beginning and end of the experiment with a 0.5 cm grid to obtain the variation in area. Leaf area ratio was used, corresponding to the quotient between the final and initial measurements per plant. The results had a good fit to normal distribution and were expressed as averages ± standard deviation. The design was completely random with a factorial arrangement of treatments (2×3) (Canavos, 1988). The first factor was presence or absence of adults, and the second was the eucalyptus species. Each treatment had five replications. The adults that died were substituted by others at a similar stage of development to maintain consumption; this occurred only once. Student t tests (Taucher, 1999) were used to determine whether the presence of the insect affected leaf area loss of the eucalyptus species evaluated.

normal y se expresaron como promedios \pm D.E. El diseño fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos (2 \times 3) (Canavos, 1988): el primer factor fue la presencia o ausencia de adultos y el segundo la especie de eucalipto. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Los adultos que morían se sustituyeron por otros de desarrollo similar para mantener el consumo, lo cual ocurrió una sola vez. Se usaron pruebas t de Student (Taucher, 1999) para determinar si la presencia del insecto influía en la pérdida de área foliar en las especies de eucalipto evaluadas.

Electroforesis de perfiles de proteínas

Después de un mes de alimentación, se analizaron por electroforesis los perfiles de proteínas de tres muestras (repeticiones) compuestas de dos adultos de cada especie de eucalipto. Los adultos se colocaron 24 h en placas Petri sin alimento (para limpiar su tubo digestivo) y homogeneizaron a 4 °C en amortiguador (TRIS-HCl 50 mM, pH 8.5, EDTA 5 mM, SDS 0.07%, con inhibidores de proteasa 0.1 mM; Sigma), forzándolos a través de un espacio estrecho entre un vástago de teflón y un contenedor de vidrio (Fleischer *et al.*, 1979). Las muestras se centrifugaron 10 min a 1.250 G, se congelaron y almacenaron a -20 °C. La concentración de las proteínas de los extractos de cada muestra se determinó por el método de Bradford (1976). Los perfiles electroforéticos de los extractos se determinaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (PAGE-SDS) unidimensionales (Laemmli, 1970; Bollag *et al.*, 1996). La electroforesis se hizo en minigeles (6 cm \times 8 cm \times 0.75 mm). El gel de concentración fue T=5% y C=2.7% y el gel de separación T=12.5% y C=2.7%. Para correr el gel se usó un aparato de electroforesis vertical (mini-protein, Bio-Rad) en un amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.8) con voltaje constante (120) y azul de bromofenol como indicador. Los estándares de peso molecular (PM) fluctuaron entre 20 y 220 kDa (LMW BioChile). Los geles obtenidos se tiñeron con 1.5% de azul brillante de Coomassie en 50% v/v de metanol y destiñeron en ácido acético/metanol/ agua (1:1:8).

El área de las proteínas se determinó con un programa de densitometría (BioCaptMW software, Microsoft, Redmond, USA). Se usaron pruebas de ji-cuadrada (Taucher, 1999) para determinar diferencias significativas en el tamaño e intensidad de la banda en los geles de las proteínas marcadoras en los extractos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad de eucalipto al daño de adultos de *G. scutellatus*

Todas las plantas testigo aumentaron su área foliar promedio en 22.3 cm², equivalente a 5.5%. El área foliar de las plantas con adultos de las tres especies evaluadas decreció: *E. globulus* tuvo la menor reducción del área foliar, seguida de *E. robusta*, y *E. camaldulensis*. En esta última especie los insectos causaron el daño mayor y redujeron su área foliar en 12.93%; *E. robusta* y *E.*

Electrophoresis of protein profiles

After one month of feeding, two adults from each of the eucalyptus species were used to obtain three samples (replications) for electrophoretic analysis of their protein profiles. The adults were placed in Petri dishes for 24 h without food (to clean their gut content) and homogenized at 4 °C in a buffer (TRIS-HCl 50 mM, pH 8.5, EDTA 5 mM, SDS 0.07%, with 0.1 mM protease inhibitors; Sigma™) by forcing them through a narrow gage between a Teflon pestle and a glass container (Fleischer *et al.*, 1979). The samples were centrifuged for 10 min at 1.250 G and frozen for storage at -20 °C. The concentration of proteins in the extracts of each sample was determined by the Bradford (1976) method. The extracts were used to determine the electrophoretic profiles in one-dimensional gel of denatured polyacrylamide (PAGE-SDS) (Laemmli, 1979; Bollag *et al.*, 1996). Electrophoresis was conducted in mini-gels (6 cm \times 8cm \times 0.75 mm). Gel concentration was T=5% and C=2.7%, and the separation gel concentration T=12.5% and C=2.7%. To run the gel, vertical electrophoresis equipment (mini-protein, Bio-Rad) was used in a running buffer (Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8.8) with constant voltage (120) and bromophenol blue as an indicator. Molecular weight (MW) standards fluctuated between 20 and 220 kDa (LMW BioChile). The gels obtained were stained with 1.5% Coomassie bright blue in 50% v/v methanol and destained in acetic acid/ methanol/ water (1:1:8).

The area of proteins was determined with a densitometry computer program (BioCaptMW software, Microsoft, Redmond, USA). Chi squared tests (Taucher, 1999) were used to determine significant differences in size and band intensity in the gels of marker proteins in the extracts.

RESULTS AND DISCUSSION

Susceptibility of eucalyptus to damage by *G. scutellatus* adults

All of the control plants increased average leaf area by 22.3 cm², equivalent to 5.5%, while the leaf area of the three species plants with adult insects decreased: *E. globulus* had the smallest reduction in leaf area, followed by *E. robusta* and *E. camaldulensis*. In this last species the insects caused the major damage and reduced leaf area by 12.93%; *E. robusta* and *E. globulus* had 6.36 and 5.46% losses of leaf area (Table 1), indicating that *E. camaldulensis* is more vulnerable to infestation of the adult insects.

G. scutellatus adults significantly reduced leaf area ($p\leq 0.5$) only in *E. camaldulensis* and *E. globulus* (Table 1). This reduction in leaf area occurred in one month, and longer exposure can cause greater effects in growth and survival of the plants (Floyd and Foley, 2001). Damage would be greater considering that in this area there are four generations of the insect, and adults are present all year round (Estay *et al.*, 2002).

globulus tuvieron pérdidas de área foliar de 6.36 y 5.46% (Cuadro 1), lo que indica que *E. camaldulensis* es más vulnerable a la infestación de adultos.

Los adultos de *G. scutellatus* redujeron significativamente ($p \leq 0.05$) el área foliar sólo en *E. camaldulensis* y *E. globulus* (Cuadro 1). Esta reducción del área foliar se produjo en un mes; una exposición mayor puede causar efectos mayores en el crecimiento y en la supervivencia de las plantas (Floyd y Foley, 2001). El daño sería mayor si se considera que en esta área el insecto tiene hasta cuatro generaciones y el adulto está presente todo el año (Estay *et al.*, 2002).

Algunas plantas de *E. robusta* con *G. scutellatus* tuvieron una mayor variación del área foliar. Plantas de un mismo género y aún de la misma especie presentaron grandes variaciones en la susceptibilidad al daño por insectos, debido a sus características genéticas (Farrow *et al.*, 1994).

Las bajas tasas de reducción del área foliar de las especies estudiadas pueden estar relacionadas con la necesidad de los adultos de comer y crecer únicamente en el árbol donde emergieron. Específicamente, los adultos pudieron no adaptarse completamente al tipo de follaje debido a que la composición química de las hojas adultas de *E. globulus* donde se recolectaron los insectos y las plantas jóvenes del ensayo fue distinta (Floyd *et al.*, 2001).

Algunas plantas de *E. globulus* y *E. robusta* expuestas a *G. scutellatus* crecieron, lo que puede ser una estrategia para reducir el riesgo de daño. Se ha documentado que la tolerancia y el crecimiento rápido son mecanismos de resistencia a plagas en eucaliptos (Floyd y Foley, 2001).

Proteínas marcadoras de adultos de *G. scutellatus* según tipo de alimentación

En la Figura 1 se presenta un gel representativo de las proteínas de adultos de *G. scutellatus*. Los insectos alimentados con *E. robusta* presentaron 22 proteínas; los alimentados con *E. camaldulensis* y *E. globulus*, 18.

Some *E. robusta* plants with *G. scutellatus* had a greater variation in leaf area. Plants of the same genus and even of the same species greatly vary in susceptibility to insect damage due to genetic characteristics (Farrow *et al.*, 1994).

The low rates of leaf area loss of the species studied could be related to the need of the adults to feed and grow only in the tree where they emerged. Specifically, the adults may not have been able to adapt completely to the type of foliage because the chemical composition of mature leaves of *E. globulus* where the insects were collected and that of the leaves of the young plants used in the study were different (Floyd *et al.*, 2001).

Some *E. globulus* and *E. robusta* plants exposed to *G. scutellatus* grew; this could be a strategy to reduce damage risk. It has been documented that tolerance and rapid growth are mechanisms of resistance to pests in eucalyptus (Floyd and Foley, 2001).

Marker proteins of *G. scutellatus* adults by type of food

A representative gel of the proteins from *G. scutellatus* adults is shown in Figure 1. Insects fed with *E. robusta* had 22 proteins, and those fed with *E. camaldulensis* and *E. globulus* had 18.

Fifteen of the proteins were common to all the *G. scutellatus* adults, while nine varied (marker proteins with MW below 60kDa) depending on the type of foliage they consumed. The nine proteins that had variations in the extracts (Figure 2) are marker proteins that indicate changes in adult metabolism due to the food they received. In a study with larvae of this insect, 11 marker proteins different from those of adults were found (Huerta *et al.*, 2007).

Of the proteins that varied, three were found only in adults fed with *E. robusta* (proteins 24, 20 and 16 associated with MW of approximately 9, 31 and 38 kDa). Only one occurred in adults fed with *E. camaldulensis* (protein 18, 35 kDa), and one was exclusive of those fed with *E. globulus* (protein 12, 47 kDa). Thus, the

Cuadro 1. Cambios en el área foliar causados por adultos de *Gonipterus scutellatus* en plantas de tres especies de eucalipto, después de un mes de alimentación.

Table 1. Changes in leaf area caused by *Gonipterus scutellatus* adults in plants of three species of eucalyptus after one month of feeding.

Especies de <i>Eucalyptus</i>	Razón de área foliar (promedio \pm D.E.) [†] , [‡]		Reducción de área foliar (%)
	Testigo	Adultos de <i>G. scutellatus</i>	
<i>E. camaldulensis</i>	1.087 \pm 0.080 a	0.946 \pm 0.036 b	12.93
<i>E. globulus</i>	1.040 \pm 0.024 a	0.983 \pm 0.018 b	5.46
<i>E. robusta</i>	1.037 \pm 0.021 a	0.971 \pm 0.075 a	6.36

[†] La razón de área foliar es el promedio del cociente entre las mediciones (cm²) final e inicial.

[‡] Letras distintas indican diferencias significativas en el promedio de la razón de área foliar, con y sin insectos, por especie ($p \leq 0.05$).

Quince proteínas fueron comunes en los adultos de *G. scutellatus*, mientras que nueve presentaron variaciones (proteínas marcadoras con PM inferiores a 60kDa) de acuerdo al tipo de follaje consumido. Las nueve proteínas que tuvieron variaciones en los extractos (Figura 2) son las proteínas marcadoras que indican cambios en el metabolismo de los adultos debido al alimento recibido. En un estudio con larvas de este insecto se encontraron 11 proteínas marcadoras distintas a las del adulto (Huerta *et al.*, 2007).

De las proteínas que variaron, tres se encontraron sólo en los adultos alimentados con *E. robusta* (proteínas 24, 20 y 16, asociadas con PM aproximados de 9, 31 y 38 kDa). Sólo una ocurrió en los adultos alimentados con *E. camaldulensis* (proteína 18, de 35 kDa), y una fue exclusiva de aquellos alimentados con *E. globulus* (proteína 12, 47 kDa). Así, la mayor variación en las proteínas se presentó en los adultos alimentados con *E. robusta* (Figura 2).

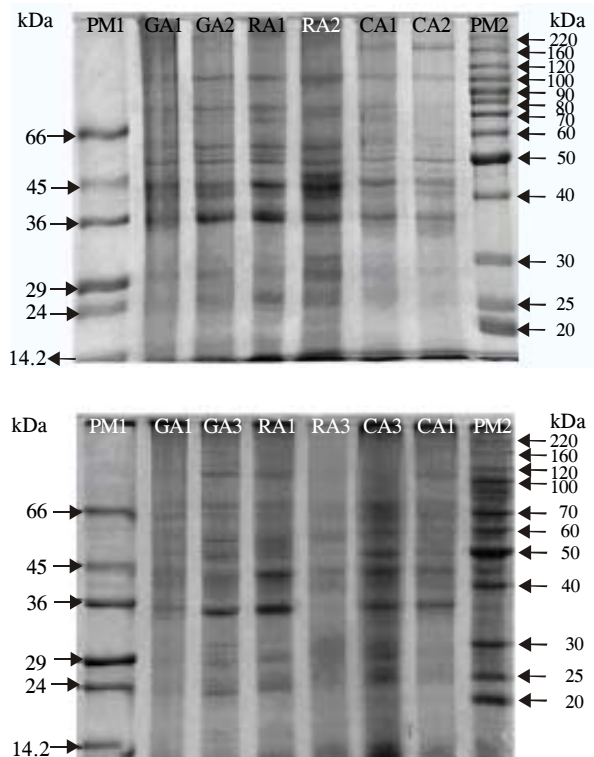


Figura 1. PAGE-SDS representativa de los extractos de proteínas de *G. scutellatus* alimentado con tres especies de eucalipto. G=*E. globulus*; R=*E. robusta*; C=*E. camaldulensis*; A=adultos. Números 1 a 3 son repeticiones. Gel superior: repeticiones 1 y 2; gel inferior: repeticiones 1 y 3. PM1 y PM2, patrones de peso molecular (kDa).

Figure 1. Representative PAGE-SDS of protein extracts from *G. scutellatus* fed with three species of eucalyptus. G= *E. globulus*; R= *E. robusta*; C=*E. camaldulensis*; A= adults. Numbers 1 to 3 are replications. Upper gel: replications 1 and 2; lower gel: replications 1 and 3. PM1 and PM2, patterns of molecular weight (kDa).

widest variation in proteins was found in adults fed with *E. robusta* (Figure 2).

An explanation of the higher number of proteins in adults fed with *E. robusta* is that during electrophoresis a protein could have fractionated because of an error in the process and appeared in the gel as if they were two smaller proteins. This hypothesis was ruled out when replications of the gels were compared; since the marker proteins had the same behavior in all of the extracts from adults fed with this species of eucalyptus.

The differences in the proteins of the extracts from adults fed with *E. robusta* or *E. camaldulensis* were related to proteins 10, 16, 20, 21 and 24, which were absent in adults fed with *E. camaldulensis*; besides, with protein 18, which only appeared in adults fed with *E. camaldulensis*. The other two proteins (13 and 19) were shared by adults fed with these two species. Differences between adults fed with *E. globulus* and those fed with *E. robusta* and *E. camaldulensis* correspond to the absence of proteins 13 and 19 in adults fed with *E. globulus*, combined with the exclusivity of protein 12. Adults fed with *E. globulus* and *E. camaldulensis* did not have any marker proteins in common (Figure 2).

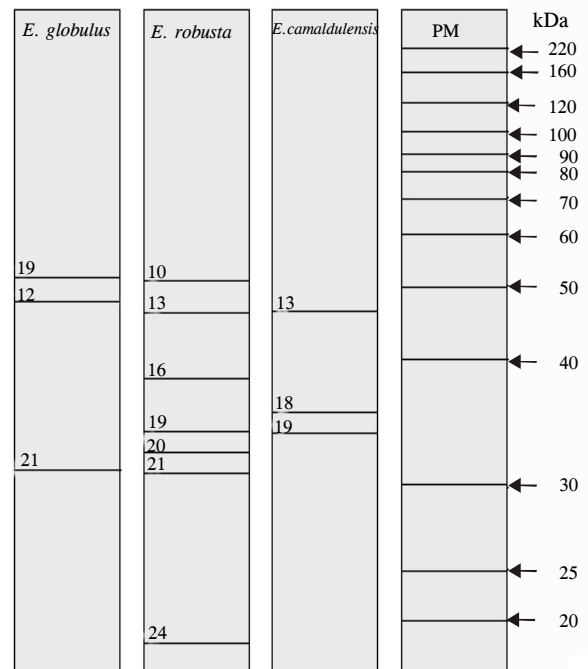


Figura 2. Representación de las proteínas marcadoras en adultos de *G. scutellatus* de acuerdo con su fuente de alimentación. PM = peso molecular; las líneas horizontales son proteínas marcadoras, numeradas según su aparición en el gel.

Figure 2. Representation of marker proteins in *G. scutellatus* adults grouped by food source. PM= molecular weight; horizontal lines are marker proteins numbered according to their appearance in the gel.

Una explicación del mayor número de proteínas en adultos alimentados con *E. robusta* es que durante la electroforesis una proteína podría haberse fraccionado debido a un error en el proceso y aparecer en el gel como si fueran dos proteínas más pequeñas. Esta hipótesis se descartó al compararse las repeticiones de los geles, pues las proteínas marcadoras tuvieron el mismo comportamiento en todos los extractos de los adultos alimentados con esta especie de eucalipto.

Las diferencias en las proteínas de los extractos de los adultos alimentados con *E. robusta* o *E. camaldulensis* se relacionaron con las proteínas 10, 16, 20, 21 y 24, las cuales estuvieron ausentes en los adultos alimentados con *E. camaldulensis*; además, con la proteína 18, la cual sólo apareció en los adultos alimentados con *E. camaldulensis*. Las otras dos proteínas (13 y 19) fueron comunes para estas dos especies. Las diferencias entre los extractos de los adultos alimentados con *E. globulus* respecto a los que recibieron *E. robusta* y *E. camaldulensis* corresponden a la ausencia de las proteínas 13 y 19 en los adultos alimentados con *E. globulus*, combinada con la exclusividad de la proteína 12. Los adultos alimentados con *E. globulus* y *E. camaldulensis* no tuvieron proteínas marcadoras en común (Figura 2).

La presencia o ausencia de proteínas marcadoras en los adultos de *G. scutellatus* puede deberse a la influencia de la composición química de las hojas que consumieron durante el experimento. La composición de los aceites esenciales de las hojas de los eucaliptos puede causar diferencias en susceptibilidad al daño por insectos (Floyd y Foley, 2001; Dungey y Potts, 2003). La función de los metabolitos secundarios de las plantas es actuar específicamente contra la infestación de insectos para reducir el daño (Kessler y Baldwin, 2002; Vivanco *et al.*, 2005). Según un estudio de la composición química de las hojas de tres especies de eucalipto (*E. melliodora*, *E. sideroxylon* y *E. polyanthemos* Schauer), en las concentraciones de sideroxylonal y 1,8-cineol existe variación inter e intraespecífica, donde una parte se debe a diferencias genéticas y ambientales (Floyd y Foley, 2001).

Las pruebas de ji-cuadrada ($\chi^2=14.24$; $p\leq 0.05$) no indicaron diferencias significativas entre las proteínas marcadoras (tamaño e intensidad) de los adultos de *G. scutellatus* alimentados con *E. globulus* respecto a los alimentados con *E. camaldulensis*. Sólo los adultos alimentados con *E. robusta* tuvieron diferencias significativas en sus proteínas marcadoras.

CONCLUSIONES

Los adultos del gorgojo (*Gonipterus scutellatus*) causaron pérdidas variables de área foliar en las tres especies

The presence or absence of marker proteins in *G. scutellatus* may be due to the influence of the chemical composition of the leaves they consumed during the experiment. The composition of the essential oils of eucalyptus leaves can cause differences in susceptibility to damage by insects (Floyd and Foley, 2001; Dungey and Potts, 2003). The function of secondary plant metabolites is to act specifically against insect infestation to reduce damage (Kessler and Baldwin, 2002; Vivanco *et al.*, 2005). According to a study on the chemical composition of three eucalyptus species (*E. melliodora*, *E. sideroxylon* and *E. polyanthemos* Schauer), there exist interspecific and intraspecific variation of concentrations of sideroxylonal and 1,8-cineol, due in part to genetic and environmental differences (Floyd and Foley, 2001).

The Chi-squared test ($\chi^2=14.24$; $p\leq 0.05$) did not reveal significant differences between the marker proteins (in size or intensity) of *G. scutellatus* adults fed with *E. globulus* and those of adults fed with *E. camaldulensis*. Only the adults fed with *E. robusta* had marker proteins with significant differences.

CONCLUSIONS

Adult weevils (*Gonipterus scutellatus*) caused variable losses of leaf area on three species of eucalyptus, indicating that this species has different levels of resistance or susceptibility to this pest. Of the three species, *E. camaldulensis* was the species most susceptible to infestation by *G. scutellatus* adults, as compared with *E. globulus* and *E. robusta*.

The appearance of marker proteins in *G. scutellatus* adults reflects a change in the insect which responds to the type of food consumed. Those fed with *E. robusta* had three exclusive marker proteins, while those fed with *E. globulus* and *E. camaldulensis* had only one each.

End of the English version—



de eucalipto, lo que indica que estas especies tienen niveles distintos de resistencia o susceptibilidad a esta plaga. *E. camaldulensis* fue la especie más susceptible a la infestación por adultos de *G. scutellatus* en comparación con *E. globulus* y *E. robusta*.

La aparición de proteínas marcadoras en los adultos de *G. scutellatus* refleja un cambio en el insecto que responde al tipo de alimento consumido. Aquellos alimentados con *E. robusta* tuvieron tres proteínas marcadoras exclusivas, en tanto que los alimentados

con *E. globulus* y con *E. camaldulensis* presentaron sólo una cada uno.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el Proyecto de Investigación DID I-02/6-2 "Determinación de la resistencia de diferentes especies de *Eucalyptus* al daño por el gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Col., Curculionidae)", de la Dirección de Investigación de la Universidad de Chile.

LITERATURA CITADA

- Beêche, M. 1999. Programa de detección y control del gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae). In: Libro de Actas, XXI Congreso Nacional de Entomología. 3-5 noviembre. Arica, Chile. pp: 33-34.
- Bollag, D., M. Rozycky, and S. Edelstein. 1996. Protein Methods. 2nd Edition. Wiley-Liss, New York. 416 p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochem. 72: 248-254.
- Canavos, G.C. 1988. Probabilidad y Estadística, Aplicaciones y Métodos. Mc Graw-Hill/Interamericana de México S.A. de C.V., México. 651 p.
- Cordero, A., and S. Santolamazza. 2000. The effects of three species of eucalyptus on growth and fecundity of the eucalypt snout beetle (*Gonipterus scutellatus*). Forestry 73: 21-29.
- Cordero, A., S. Santolamazza, and J.A. Andrés. 1999. Life cycle and biological control of the Eucalyptus snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. Agric. For. Entomol. 1: 103-109.
- Cowles, R.S., and J.A. Downer. 1995. Eucalyptus snout beetle detected in California. California Agric. 49: 38-40.
- Dajoz, R. 2001. Entomología Forestal: Los Insectos y el Bosque. Ediciones Mundi Prensa, Madrid. 548 p.
- Dungey, H.S., and B.M. Potts. 2003. Eucalypt hybrid susceptibility to *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae). Austral Ecol. 28: 70-74.
- Elliott, H.J., and D.W. De Little. 1985. Insect pests of trees and timber in Tasmania. Forestry Commission, Tasmania, Hobart. 90 p.
- Estay, S., J. Araya, y M.A. Guerrero. 2002. Biología de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en San Felipe, Chile. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas 28: 391-397.
- Ezzel, C. 2002. Proteins rule. Scientific Am. 286(4): 40-47.
- Farrow, R.A., R.B. Floyd, and F.G. Neumann. 1994. Interprovenance variation in resistance of *E. globulus* juvenile foliage to insect feeding. Austr. For. 57: 65-68.
- Fleischer, S., J. O. McIntyre, and J. C. Vital. 1979. Large-scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. Methods Enzymol. 55: 32-39.
- Floyd, R.B., and W.J. Foley. 2001. Identifying Pest Resistant Eucalyptus using Near-infrared Spectroscopy. RIRDC Publication 01/112, Canberra, Australia. 110 p.
- Floyd, R.B., R.A. Farrow, and M. Matsuky. 2001. Within species variation in insect damage and growth in *Eucalyptus globulus*. In: Floyd, R.B., and W.J. Foley (eds). Identifying Pest Resistant Eucalyptus using Near-infrared Spectroscopy. RIRDC Publication 01/112, Canberra, Australia. pp: 2-12.
- Hanks, L.M., J.G. Millar, T.D. Paine, and C. D. Campbell. 2000. Classical biological control of the Australian weevil *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) in California. Environ. Entomol. 29: 369-375.
- Huerta, A., I. Chiffelle, M. Serrano, T. Vásquez, and J.E. Araya. 2007. Protein profiles of *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae fed from leaves from three Eucalyptus species. New Zealand J. Crop Horticultural Sci. 35:357-363.
- INFOR (Instituto Forestal). 2006. Estadísticas Forestales 2005. Boletín Estadístico N°111. Santiago, Chile. 165 p.
- Kessler, A., and I.T. Baldwin. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. Ann. Rev. Plant Biol. 53: 299-328.
- Klein, K.C., and D.F. Waterhouse. 2000. The Distribution and Importance of Arthropods Associated with Agriculture and Forestry in Chile. ACIAR Monograph 68, Santiago, Chile. 231 p.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lanfranco, D., and H.S. Dungey. 2001. Insect damage in Eucalyptus: A review of plantations in Chile. Austral Ecol. 26: 477-481.
- Mansilla, J.P. 1992. Presencia sobre *Eucalyptus globulus* Labill de *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col, Curculionidae) en Galicia. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas 18: 547-554.
- Romanyk, N., y D. Cadahia. 2002. Plagas de insectos en las masas forestales. Ediciones Mundi Prensa, Madrid. 336 p.
- Rosado-Neto, G.H. 1993. Gonipterinae dos eucaliptos: Primeiro registro de *Gonipterus scutellatus* para o Estado de Sao Paulo, Brasil e algumas considerações sobre *G. gibberus* (Coleoptera, Curculionidae). Rev. Bra. Zool. 13: 77-90.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2006. Informativo Fitosanitario Forestal N°2 (3). Unidad de Vigilancia y Control de Plagas Forestales y Exóticas Invasoras. Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. 4 p.
- Santolamazza, S., and A. Cordero. 1998. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the eucalyptus snout-beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). Etiología 6: 33-40.
- Taucher, E. 1999. Bioestadística. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. 310 p.
- Tooke, F.G.C. 1953. The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. A study of its ecology and control by biological means. Entomology Memoirs, Department of Agriculture, Union of South Africa 3: 1-282.
- Vivanco, J.M., E. Cosío, V.M. Loyola-Vargas, y H.E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia 341(2): 68-75.
- Withers, T.M. 2001. Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. Austral Ecol. 26: 467-476.