

Perfiles proteicos de estados de desarrollo de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae)

Protein profiles of *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) development stages

AMANDA HUERTA F.^{1*}, ITALO CHIFFELLE G.², MARYI SERRANO G.¹, TATIANA VÁSQUEZ T.¹

Resumen: En 1998 se detectó en Chile al gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1833) (Coleoptera: Curculionidae), uno de los principales defoliadores del género *Eucalyptus*, que causa pérdidas de crecimiento y económicas. Esto ha generado preocupación pues hay más de 525.000 ha plantadas con especies de eucaliptos. Con el objetivo de conocer la respuesta de las proteínas de estados de desarrollo de *G. scutellatus* a las tres especies de eucaliptos más importantes en el país, se obtuvieron y caracterizaron perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes, y se buscaron proteínas marcadoras por densitometría de geles. Las proteínas se hicieron más numerosas a medida que los insectos se desarrollan. Las bandas de proteínas se concentraron entre los 20 y 120 kDa, con excepción de los huevos, los que presentaron valores menores. La aparición de distintas bandas de proteínas en los extractos de larvas y adultos de *G. scutellatus* alimentados con distintas especies de eucaliptos reflejó también cambios en su metabolismo. Estos antecedentes son útiles para el manejo integrado de plagas debido a que la identificación de proteínas marcadoras posiblemente está asociada a patrones metabólicos relacionados con el consumo de las plantas hospederas. Los cambios en la dieta del insecto podrían incidir en las proteínas marcadoras, indicando una habilidad diferencial de *G. scutellatus* para usar las plantas hospederas.

Palabras clave: Gorgojo del eucalipto. *Eucalyptus*. Electroforesis.

Abstract: In 1998 the eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae), a major defoliator of the genus *Eucalyptus*, which causes growth and economic losses, was detected in Chile. This has caused concern because more than 525,000 ha are planted with species of eucalypt. To understand the protein responses of development stages of *G. scutellatus* fed on the three species of eucalypt trees most important in the country, electrophoretic profiles were obtained and characterized on polyacrylamide gels under denaturizing conditions, and marker proteins were sought through gel densitometry. Proteins became more numerous with insect development. Protein bands were concentrated between 20 and 120 kDa, with the exception of eggs, which presented lower values. The appearance of distinct bands of proteins in the extracts from larvae and adults of *G. scutellatus* fed on different species of eucalypts reflected changes in their metabolism. These results are useful for integrated pest management, as the identification of marker proteins is possibly associated with metabolic patterns related to the consumption of host plants. Changes in insect diet may affect the marker proteins, indicating a differential ability of *G. scutellatus* to use host plants.

Key words: Eucalypt weevil. Eucalypt snout beetle. *Eucalyptus*. Electrophoresis.

Introducción

El gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1833) (Coleoptera: Curculionidae), es un insecto australiano específico del género *Eucalyptus* (Withers 2001) y uno de los principales agentes de daño para estas especies. Se ha distribuido prácticamente por todos los continentes y se ha constituido en una plaga en la mayoría de las plantaciones de eucaliptos de África, Europa (Mansilla 1992; Rabasse y Perrin 1979; Richardson y Meakins 1986; Cordero *et al.* 1999), California (Cowles y Downer 1995; Hanks *et al.* 2000) y Nueva Zelanda (Cadaña 1980). En Sudamérica, se ha detectado en Argentina, Brasil, Uruguay y Chile (Rosado 1993; Beéche 1999; Zanuncio *et al.* 1998).

Tanto las larvas como los adultos de *G. scutellatus* se alimentan del follaje del eucalipto. El daño causado por este insecto es muy característico, dejando huellas en las hojas afectadas (Elliott y De Little 1984). Su población puede crecer mucho en pocos años, si abundan árboles hospedantes, existe

un clima templado y no hay enemigos naturales (Tooke 1953). El alto potencial reproductivo del insecto, junto con su intensa capacidad de defoliación puede causar pérdidas de crecimiento o deformaciones del fuste (Santolamazza y Cordero 1998). Incluso, defoliaciones continuas pueden causar la muerte de los árboles (Elliott y De Little 1984).

En Chile central, *G. scutellatus* se detectó por primera vez en 1998 en las regiones 5ª y Metropolitana (Beéche 1999), y podría afectar el futuro de las 525.057 ha plantadas en el país con eucaliptos (INFOR 2006). En la actualidad esta plaga se ha desplazado hacia el norte (4ª Región) como hacia el sur (regiones 7ª y 8ª) (SAG 2005).

G. scutellatus ha tenido una marcada preferencia por varias especies de *Eucalyptus* (Cordero y Santolamazza 2000). En Chile, la especie principal es *E. globulus* ssp. *globulus* (Labill., 1800). Otras especies plantadas de cierta importancia son *E. viminalis* (Labill., 1806) y *E. camaldulensis* (Den., 1832), en zonas áridas, y *E. nitens* ((Deane y Maiden) Maiden, 1913) en áreas más frías (INFOR 2006). En la zona de San Felipe, 5ª

^{1*} Correspondencia: Dra. Amanda Huerta, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. Casilla 9206. Santiago-Chile. ahuerta@uchile.cl, ahuertaf@gmail.com

² Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. Casilla 1004. Santiago-Chile. ichiffel@uchile.cl

Región, *G. scutellatus* presenta entre tres y cuatro generaciones (Estay *et al.* 2002). Según Klein y Waterhouse (2000), su importancia como plaga de los eucaliptos es superada sólo por el taladrador del eucalipto, *Phoracantha semipunctata* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Cerambycidae).

Las características morfológicas y bioquímicas de las plantas pueden causar alteraciones en el metabolismo de los insectos, y traducirse en cambios en la composición de sus proteínas (Metcalf y Luckmann 1992), de forma que el conocimiento de estas variaciones es importante cuando se desean utilizar estrategias de tipo genético en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), pues puede revelar compuestos químicos que sirvan como instrumento para alterar su comportamiento.

Los genes permanecen básicamente sin cambio de un año a otro, pero las proteínas de las células varían según su tipo, edad, género, sanidad, y otras. La proteómica engloba tres actividades principales, la identificación de todas las proteínas sintetizadas por una célula, tejido u organismo, la determinación del modo en que interactúan, y el trazado de sus estructuras tridimensionales precisas (Ezzell 2002). Los resultados de las electroforesis de proteínas son caracteres fenotípicos que reflejan mucho mejor las diferencias genéticas entre especies o poblaciones que cuando se estudian los caracteres morfológicos. Por ello, la electroforesis en gel ha llegado a ser la herramienta más valiosa para los estudios taxonómicos, sistemáticos y evolutivos (Navas *et al.* 2002).

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de abordar desde el punto de las proteínas la reacción de *G. scutellatus* frente a la alimentación con distintas especies de eucaliptos, mediante una caracterización de perfiles electroforéticos del insecto y la búsqueda posterior de proteínas marcadoras (PM) por densitometría de los geles, para indagar PM asociadas posiblemente a cambios fisiológicos del insecto, aportando con ello hacia su caracterización en el plano molecular y por ende hacia programas de MIP.

Materiales y Métodos

El material biológico se recolectó en árboles juveniles de *E. globulus* fuertemente infestados por *G. scutellatus* en el Sector El Tártaro, Comuna de Putaendo, Provincia de San Felipe (5ª Región de Chile) (32°32'30"S, 70°43'16"W). Las plantas se adquirieron en el Vivero Antumapu de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, y se trasplantaron a macetas de plástico de 18 cm de diámetro con un substrato compuesto de arena, tierra de hoja y turba, tratado con fungicida Captan 2g/L y fertilizado con urea.

Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con *E. globulus*. En una fase inicial de campo se recolectaron en forma periódica a fines de verano ejemplares adultos, pupas, larvas y huevos de *G. scutellatus*. Los insectos se mantuvieron en laboratorio, alimentando a las larvas y adultos con hojas frescas de *E. globulus*, previamente lavadas con hipoclorito de sodio al 15% (Cordero y Santolamazza 2000). Los huevos y las pupas se ubicaron en placas Petri; las larvas y los adultos se mantuvieron en cajas plásticas cerradas de 20 x 15 cm. Las crías se hicieron en el Laboratorio de Entomología Forestal del Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Se tomaron tres muestras de dos insectos por estado de desarrollo (huevo, larva, pupa y adulto) y se homogenizaron a

4°C en buffer (TRIS-HCl 50mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS 0,07%) con un inhibidor de proteasa FMS 0,1 mM. Esta homogenización se hizo forzando los insectos a pasar por un espacio estrecho entre un émbolo de teflón y un recipiente de vidrio (Fleischer *et al.* 1979) y se centrifugaron 10 min a 1.250 G. Este material se refrigeró inmediatamente y se almacenó a -20°C. Luego estas muestras se maceraron y se extrajeron las proteínas y determinó su concentración mediante el método de Bradford (1976). Los extractos de proteínas se utilizaron para determinar los perfiles electroforéticos mediante gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando la técnica de Laemmli (1970) y el protocolo de Bollag *et al.* (1996).

Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucalipto. En una segunda fase se caracterizaron electroforéticamente los perfiles de proteínas asociadas a *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucaliptos de importancia económica en Chile y que presentan algún grado de susceptibilidad a la plaga; estos son: *E. globulus*, *E. robusta* (Sm., 1793) y *E. camaldulensis*.

Para caracterizar electroforéticamente los perfiles de proteínas de los insectos alimentados con cada una de las especies de eucalipto, se hizo un ensayo en una jaula (1,8 x 1,5 x 1,8 m) instalada bajo condiciones naturales de clima Mediterráneo e irrigación periódica, donde se ubicaron plantas de un año (cerca de 1 m de altura) de cada especie, las que se infestaron con dos larvas por planta (5-8 mm de longitud). Las plantas se protegieron con una bolsa de tul, para evitar su escape, con una abertura longitudinal con velcro para facilitar las evaluaciones. Las larvas permanecieron en cada una de las plantas hasta que pasaron a pupa; las larvas que murieron por manipulación se reemplazaron por otras que se encontraron en la misma fase de desarrollo.

Al finalizar el ensayo con larvas se desarrolló una segunda etapa, en la que se pusieron durante un mes dos insectos adultos en las mismas plantas utilizadas en la primera parte del ensayo, para su alimentación sobre las mismas; los adultos que murieron antes del fin del ensayo se reemplazaron por otros en la misma fase de desarrollo.

Transcurrido un mes se tomaron muestras de larvas alimentadas con las diversas especies de eucalipto para hacer el análisis electroforético de proteínas. De igual forma se tomaron muestras de los adultos. Los insectos se mantuvieron 24 h en placas Petri sin alimentarse para vaciar su tubo digestivo y se homogenizaron, refrigeraron y almacenaron con los mismos procedimientos señalados anteriormente. Se maceraron varios insectos en cada muestra, cada uno de ellos alimentado con la misma especie de eucalipto. El diseño experimental para estos análisis electroforéticos tuvo dos factores de efecto fijo, el primero fue el nivel de desarrollo del insecto (larva o adulto) y el segundo, la especie de eucalipto; se realizaron tres repeticiones para cada nivel de desarrollo del insecto en cada una de las especies de plantas. A las muestras de insectos adultos y larvas se les extrajeron las proteínas y determinó su concentración mediante los mismos protocolos ya mencionados.

Posteriormente, se analizaron los perfiles electroforéticos de proteínas de los insectos alimentados con las especies de eucalipto, en busca de PM mediante la determinación de su posición y los cambios en su concentración y localización. La búsqueda de dichas PM se hizo mediante densitometría de geles, usando el Software BioCaptMW (versión 11.01,

Microsoft, Redmond, EE.UU.) Para evaluar si existían diferencias significativas entre los resultados se hicieron pruebas de χ^2 y análisis de variación según diseño bifactorial. Además se hizo un análisis de similitud entre las PM de *G. scutellatus*, mediante el algoritmo de UPGMA (Sneath y Sokal 1973), usando el índice de similitud 1-Pearson r, basado en la presencia o ausencia de PM en las muestras. Se usó el programa Statistica (1993).

Resultados y Discusión

Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con *E. globulus*. La composición proteica de los estados de desarrollo de *G. scutellatus* asociados a *E. globulus* se presenta en la Figura 1. Se observa una gran cantidad de bandas de proteínas en la zona comprendida entre 20 a 120 kDa, con excepción de los huevos, los que presentaron un número bajo y de pequeña intensidad de proteínas. Las proteínas se hicieron más numerosas a medida que los insectos se desarrollan. La composición proteica de las pupas fue similar a la de las larvas, probablemente porque se trató de pupas recién formadas. Sin embargo, los perfiles de las larvas y adultos tuvieron grandes diferencias.

Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucalipto. Las larvas de *G. scutellatus* están compuestas por un número mayor de proteínas marcadoras que los adultos, independientemente de la alimentación recibida, lo que indica que la composición proteica de los insectos varía con su estado de desarrollo (Fig. 2). El mayor número de PM en las larvas puede estar relacionado con los cambios en el insecto debido a su metamorfosis; sin embargo, el número de proteínas de las larvas en *E. globulus* fue casi el mismo que el de los adultos, haciendo pensar que el aumento de las bandas en las larvas alimentadas con *E. robusta* y *E. camaldulensis* está más relacionado con la alimentación que recibieron los insectos que con su metamorfosis.

La composición proteica de las larvas alimentadas con *E. globulus* no difirió de la de los adultos alimentados con esta misma especie (χ^2 calculado = 0,24, g. l. = 1, $P = 0,05$). Por otra parte, la composición proteica de las larvas difirió de la

de los adultos cuando los insectos se alimentaron con *E. robusta* y *E. camaldulensis* (χ^2 calculado = 6,72, g. l. = 1, $P = 0,05$), dado el mayor número de proteínas exclusivas de las larvas frente al de los adultos (Figura 2). Esto parece indicar que las larvas de *G. scutellatus* son más susceptibles a los cambios en su alimentación, y modifican en mayor grado su composición proteica por este factor.

En la Figura 2 se presentan las bandas de las proteínas que tuvieron variaciones en función de la alimentación recibida, notándose que en los extractos de larvas hubo mayores cambios en proteínas que en los de adultos. Es importante resaltar que las bandas uno y dos se presentaron sólo en adultos y las bandas tres, cinco y seis sólo en larvas, independientemente de la alimentación, por lo que serían útiles tanto para identificar el estado de desarrollo de un insecto en función de su alimentación como para diseñar tácticas de tipo genético dentro del manejo integrado de plagas.

Como se mencionó, las larvas de *G. scutellatus* alimentadas con *E. robusta* y *E. camaldulensis* parecieron ser más susceptibles al cambio de alimentación que los adultos, ya que sólo en los extractos de larvas de estas dos especies se presentaron seis PM (proteínas siete, 21, 23, 29, 31 y 32) (Fig. 2), causando que la composición proteica de las larvas y adultos haya sido diferente. El análisis de conglomerados indicó que existen diferencias entre las PM de *G. scutellatus*. Las PM de las larvas alimentadas por *E. camaldulensis* y *E. robusta* son más cercanas y las más alejadas son las de *E. globulus*. Las PM de los adultos alimentados con las tres especies de eucalipto se agruparon en otro conglomerado (Fig. 3).

Por otra parte, según la cantidad de proteínas de las bandas se encontró que tanto el nivel de desarrollo del insecto (factor estado) como la alimentación recibida (factor especie) influyeron en el área de las PM ($F = 8,599$; g. l. = 2; $P < 0,05$). Las PM de las larvas presentaron un área mayor que las correspondientes a los adultos, lo que se debe a que las larvas tuvieron más cambios en su composición proteica. Respecto a las especies, las larvas alimentadas con *E. robusta* presentaron la mayor cantidad de proteínas, con una media diferente a la de las alimentadas con las otras dos especies de eucalipto bajo estudio; las diferencias de las larvas alimentadas con *E. robusta* se relacionan con la cantidad de proteínas que varió en las alimentadas sobre esta especie, especialmente en los extractos asociados a larvas. Hubo diferencias en las PM, en función tanto del estado de desarrollo (larva o adulto) como de la alimentación recibida por los insectos, y las mayores modificaciones ocurrieron producto de la alimentación con *E. robusta* (χ^2 calculado = 5,23, g. l. = 1, $P = 0,05$; $F = 8,0$; g. l. = 2; $P < 0,05$).

Como se observa en la Figura 2, los adultos alimentados con *E. robusta* tuvieron los mayores cambios en composición proteica, mientras que los alimentados con *E. globulus* y *E. camaldulensis* presentaron una variabilidad mucho menor. De las proteínas que variaron, tres se presentaron sólo en *E. robusta* (proteínas 20, 26 y 34), una apareció solamente en *E. globulus* (16), y una fue exclusiva de *E. camaldulensis* (24); estas proteínas serían útiles en la identificación de adultos a nivel proteico, permitiendo discriminar qué tipo de alimentación han recibido. Las proteínas 26 y 33, exclusivas de *E. robusta*, podrían usarse para inferir los cambios en la composición química de las larvas y adultos de *G. scutellatus* causados por su alimentación sobre las plantas de esta especie.

La ausencia de las proteínas 14 (*E. camaldulensis*), 17 (*E. globulus*), 25 (*E. globulus*) y 27 (*E. camaldulensis*) en adultos

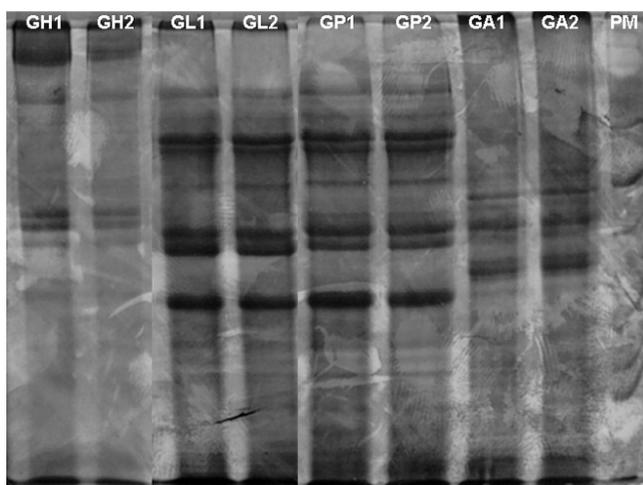


Figura 1. Extractos proteicos de los estados de desarrollo de *G. scutellatus* asociados a *E. globulus*. SDS-PAGE al 12,5%. GH = huevos, GL = larvas, GP = pupas y GA = adultos. Los números uno y dos son las repeticiones. PM = estándar de masa molar (kDa).

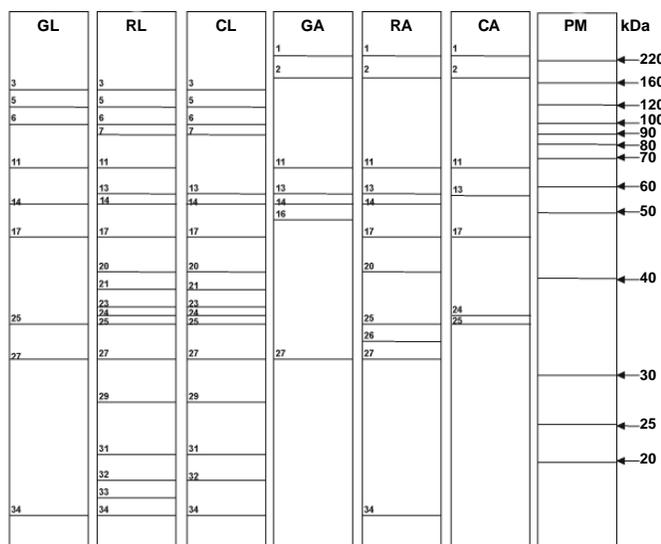


Figura 2. Representación idealizada de las proteínas marcadoras de acuerdo con el estado de desarrollo de *G. scutellatus* y la alimentación recibida. G = *E. globulus*, R = *E. robusta*, C = *E. camaldulensis*, L = larvas, A = adultos. PM = estándar de masa molar (kDa). Las líneas horizontales corresponden a bandas de proteínas, numeradas según su orden de aparición en el gel.

(Fig. 2) es también un indicador de los cambios bioquímicos del insecto a causa de su alimentación, y al igual que las proteínas que se presentan exclusivamente en un extracto, podrían usarse en su identificación.

La distribución proteica de los adultos en función de la alimentación recibida no fue diferente (χ^2 calculado = 5,23, g. l. = 2, $P = 0,05$), lo que se debe a que el 37,5% de las proteínas difirió entre los extractos. Cuando la prueba se aplicó sólo a las PM, se encontraron diferencias entre los extractos (χ^2 calculado = 14,24, g. l. = 2, $P = 0,05$), las que se relacionan con el número de proteínas que varió en los adultos alimentados con *E. robusta*, ya que los extractos provenientes de los insectos alimentados con las otras dos especies tuvieron la misma cantidad de PM.

Al observar la participación porcentual de las proteínas respecto al área relativa de los geles (Fig. 4), la proteína uno, proveniente de los extractos de larvas, presentó el área mayor (14,47%), seguida de las proteínas 23 (9,65%) y 30 (8,79%). Estas bandas se presentaron en todos los extractos, independientemente de la alimentación. Las bandas restantes tuvieron cantidades de proteínas inferiores a 5%. Otro hecho importante es que las PM de las larvas tuvieron áreas similares a las que no lo fueron, con porcentajes que oscilan desde 1,38% en la banda 11 hasta 4,19% en la 27. Esto indica que a pesar que no estuvieron presentes en todas las especies, la cantidad de proteínas en estas bandas no fue despreciable.

El área de las proteínas de las larvas difirió significativamente y la interacción entre las proteínas y las especies también fue significativa; sin embargo, no hubo diferencias en el área cuando el factor evaluado fue la especie objeto de alimento de las larvas ($F = 12,53$; g. l. = 2; $P < 0,05$). En los adultos, la banda 23 tuvo la mayor cantidad de proteínas (22,06%), seguida de la banda dos (8,74%), la 24 (7,24%) y la cuatro (7,15%). Respecto de las PM de los adultos, la que obtuvo el porcentaje mayor fue la banda 21 (5,73%). Las PM

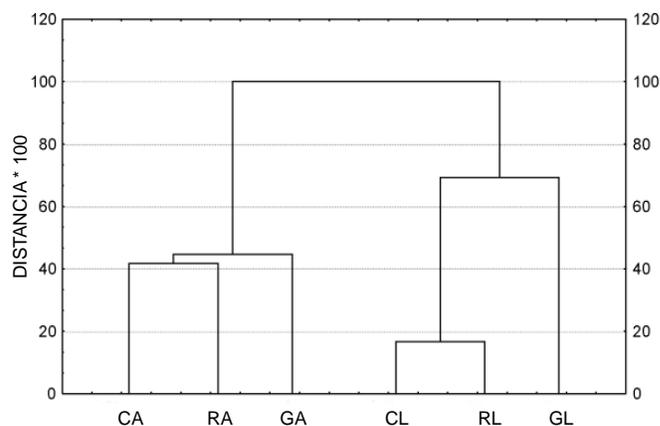


Figura 3. Análisis de conglomerados de las proteínas marcadoras de *G. scutellatus* alimentados con las tres especies de eucaliptos, construido con el método UPGMA. G = *E. globulus*, R = *E. robusta*, C = *E. camaldulensis*, L = larvas, A = adultos.

restantes tuvieron valores similares a las que no presentaron variaciones, lo que indica que su participación en los geles no fue despreciable.

Según el análisis de variación para los extractos de adultos hubo una diferencia significativa entre las proteínas ($F = 28,35$; g. l. = 2; $P < 0,05$), relacionada con su posición en el gel (masa molar), y una interacción entre las proteínas y las especies. Estos resultados son equivalentes a los obtenidos en los extractos proteicos de las larvas. Por otra parte, hubo diferencia en las PM de los adultos de *G. scutellatus* producto de su alimentación ($F = 16,87$; g. l. = 2; $P < 0,05$). Las diferencias en este factor se debieron a la mayor variación en la composición proteica de los adultos cuando se alimentaron con *E. robusta*, ya que las otras dos especies tuvieron el mismo número de PM.

La presencia o ausencia de bandas en los extractos proteicos de *G. scutellatus* puede deberse a la composición química de las hojas, lo que hace que el insecto reaccione ante la alimentación recibida (Dermott *et al.* 1996). En este sentido, la constitución de los aceites esenciales en las especies de *Eucalyptus* puede causar diferencias en la susceptibilidad al daño de un insecto en particular, las que pueden verse reflejadas en la composición química de los insectos (Floyd y Foley 2001). Kessler y Baldwin (2002) indican que la función de los metabolitos secundarios de las plantas es actuar específicamente contra la infestación de insectos, haciendo que se reduzca su daño. Por lo tanto, estos elementos podrían estar influyendo también en la composición proteica encontrada en los extractos.

Conclusiones

Este estudio contribuye al Manejo Integrado de Plagas de este insecto, a través del conocimiento de la composición de las proteínas de *G. scutellatus* alimentados con diferentes especies de eucalipto, obteniendo proteínas marcadoras para las larvas y adultos. Estas proteínas están asociadas posiblemente con patrones metabólicos relacionados con el consumo de las plantas hospederas. Los cambios en la dieta del insecto podrían estar asociados con las proteínas marcadoras, indicando una habilidad diferente de *G. scutellatus* para poder usar las plantas hospederas.

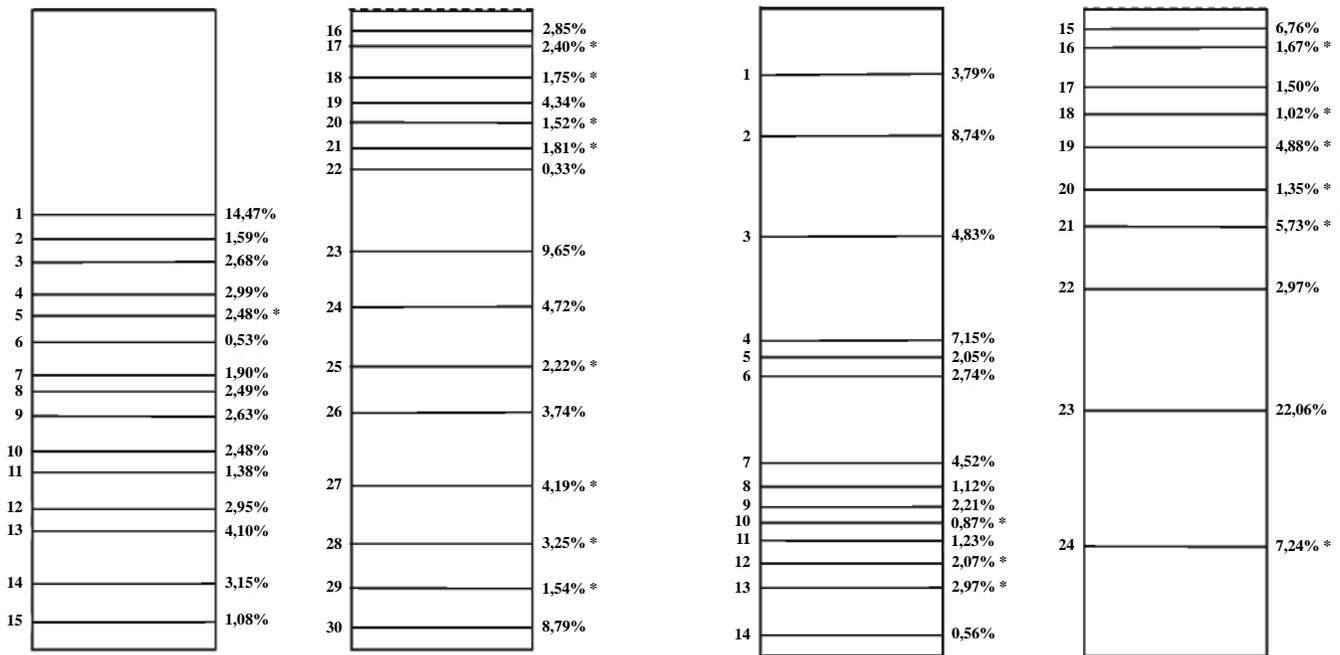


Figura 4. Participación porcentual de las proteínas asociadas a larvas y adultos de *G. scutellatus* en función del área relativa, considerando las tres especies de eucaliptos estudiadas. Las líneas horizontales corresponden a bandas de proteínas, numeradas según su orden de aparición en el gel. Las bandas con asteriscos son las proteínas marcadoras.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto DID I-02/6-2 «Resistencia de distintas especies de *Eucalyptus* spp. frente al ataque del gorgojo del eucalipto (*Gonipterus scutellatus*, Coleoptera: Curculionidae)», financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Chile.

Literatura Citada

- BEÉCHE, M. 1999. Programa de detección y control del gorgojo del eucalipto en Chile, *Gonipterus scutellatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae). En: XXI Congreso Nacional de Entomología, Libro de Actas, 3-5 noviembre, Arica, Chile. pp.: 33-34.
- BOLLAG, D.; ROZYCKY, M.; EDELSTEIN, S. 1996. Protein Methods. Wiley-Liss, New York.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- CADAHÍA, D. 1980. Proximidad de dos nuevos enemigos de los eucaliptos en España. *Boletín del Servicio de Plagas* 6: 165-192.
- CORDERO, A.; SANTOLAMAZZA, S. 2000. The effects of three species of eucalyptus on growth and fecundity of the eucalyptus snout beetle (*Gonipterus scutellatus*). *Forestry* 73: 21-29.
- CORDERO, A.; SANTOLAMAZZA, S.; ANDRÉS, J. 1999. Life cycle and biological control of the Eucalyptus snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 103-109.
- COWLES, R.; DOWNER, J. 1995. Eucalyptus snout beetle detected in California. *California Agriculture* 49: 38-40.
- DERMOTT, J.; MEILAN, R.; THORNBURG, R. 1996. Plant-Insect Interactions: The Hackberry Nipple Gall. *The Word Wide Web Journal of Biology* <http://www.epress.com/w3jbio/vol12/mcdermott/mcdermott.html> Fecha última revisión: 15 agosto 2006. Fecha último acceso: [29 agosto 2006].
- ELLIOTT, H.; DE LITTLE, D. 1984. Insect pests of trees and timber in Tasmania. Forestry Commission, Tasmania. 90 p.
- ESTAY, S.; ARAYA, J. E.; GUERRERO, M. 2002. Biología de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en San Felipe, Chile. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 28: 391-397.
- EZZELL, C. 2002. Proteins rule. *Scientific American* 286: 26-33.
- FLEISCHER, S.; MCINTYRE, J. O.; VITAL, J. C. 1979. Large-scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. *Methods in Enzymology* 55: 32-39.
- FLOYD, R.; FOLEY, J. 2001. Identifying pest resistant eucalyptus using near-infrared spectroscopy. RIRDC Publication 01/112, Canberra, Australia. 110 p.
- HANKS, L.; MILLAR, J.; PAINE, T.; CAMPBELL, C. 2000. Classical biological control of the Australian weevil *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) in California. *Environmental Entomology* 29: 369-375.
- INFOR (INSTITUTO FORESTAL). 2006. Estadísticas Forestales 2005. *Boletín Estadístico (Chile)* 111. Santiago, Chile, 165 p.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328.
- KLEIN, C.; WATERHOUSE, D. 2000. The distribution and importance of arthropods associated with agriculture and forestry in Chile. *ACIAR Monograph* 68, Santiago, Chile, 231 p.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MANSILLA, J. 1992. Presencia sobre *Eucalyptus globulus* Labill de *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae) en Galicia. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 18: 547-554.
- METCALF, R.; LUCKMANN, W. 1992. Introducción al manejo de plagas de insectos. Editorial Limusa S.A., México, D.F., 710 p.
- NAVAS, A.; LÓPEZ, J.; ESPÁRRAGO, G.; CAMAFEITA, E.; ALBAR, J. 2002. Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Proteomic Research* B: 421-427.

- RABASSE, J.; PERRIN, H. 1979. Introduction en France du charançon de l'eucalyptus, *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae). Annales de Zoologie et Ecologie Animale 11: 337-345.
- RICHARDSON, K.; MEAKINS, R. 1986. Inter and intra-specific variation in the susceptibility of eucalypts to the snout beetle *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). South African Forestry Journal 139: 21-31.
- ROSADO, 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). Revista Brasileira de Zoologia 13: 77-90.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO). 2005. Informe Anual 2004. Subdepartamento de Vigilancia y Control de Plagas Forestales y Exóticas Invasoras, Santiago, Chile. 116 p.
- SANTOLAMAZZA, S.; CORDERO, A. 1998. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* snout-beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). Etiología 6: 33-40.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, H. H. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practices of numerical classification. W.H. Freeman Ed., San Francisco. 573 p.
- STATISTICA. 1993. Statistica for Windows. Release 4.5 A. StatSoft, Inc.
- TOOKE, F. 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.
- WITHERS, T. M. 2001. Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. Australian Ecology 26: 467-476.
- ZANUNCIO, J.; PORTO, G.; ZANUNCIO, T.; MOLINA-RUGAMA, A. 1998. Plagas en las plantaciones de rápido crecimiento en Brasil. Pp. 322-331. En: Corporación Nacional Forestal, Proceedings of International Forest Insect Workshop, Pucón, Chile, 471 p.

Recibido: 9-sep-2006 • Aceptado: 8-oct-2007