AVANCES EN EL ESTUDIO DE FEROMONAS EN LA CHINCHE DEL EUCALIPTO, *Thaumastocoris peregrinus*: AGREGACIÓN DE MACHOS MEDIADA POR FEROMONAS VOLÁTILES

Andrés González[1*], María Victoria Calvo[1], Carolina Sellanes[1], Gonzalo Martínez[2]

INTRODUCCIÓN

El área de producción forestal en Uruguay se ha duplicado en la última década, alcanzando cerca de 1 millón de hectáreas, de las cuales aproximadamente el 70% comprenden especies de *Eucalyptus* (DIEA/MGAP, 2011). Este crecimiento explosivo de un monocultivo exótico favorece la instalación de plagas y enfermedades provenientes de las regiones originarias del cultivo, en este caso Australia. Tal es el caso de la chinche de los eucaliptos, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), que fuera detectada por primera vez en el Cono Sur en 2005 como *T. australicus* (Noack y Coviella, 2006), re-identificada posteriormente como una nueva especie (Carpintero y Dellape, 2006), y expandiéndose en la región en pocos años (Carpintero y Dellape, 2006; Martínez y Bianchi, 2010; Wilcken *et al*., 2010; Ide *et al*., 2011).

T. peregrinus es una plaga emergente de importancia en el hemisferio sur, es una chinche plana y pequeña (1-3 mm de largo), que causa daños visibles por la pérdida de capacidad fotosintética, defoliación y en casos extremos la muerte del árbol (Jacobs y Neser, 2005). Aunque la información disponible es escasa en cuanto al comportamiento y ecología de esta especie en campo, observaciones circunstanciales indican que existe una tendencia a la formación de agregaciones (Gonzalo Martínez, inédito), lo cual podría estar mediado por feromonas.

Nuestro objetivo, por lo tanto, fue iniciar un estudio en semioquímicos de *T. peregrinus*, con miras al desarrollo de herramientas de monitoreo o control poblacional basados en semioquímicos, que puedan integrarse a medidas de manejo integrado de esta nueva plaga. Específicamente, en este estudio presentamos resultados del análisis químico de compuestos orgánicos volátiles emitidos por machos y hembras, y la respuesta comportamental de los insectos a dichos volátiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Adultos vírgenes y ninfas fueron obtenidos de una cría permanente mantenida sobre ramos de *E. tereticornis*, en el laboratorio de Entomología en la Estación INIA-Tacuarembó. Machos, hembras y ninfas fueron mantenidos en jaulas cubiertas por tul

[1]Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR. *Correo electrónico: agonzal@fq.edu.uy
[2]Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, INIA – Tacuarembó

(35 x 50 x 70 cm) y criadas en condiciones controladas (20 ± 5 °C, 55% HR). Los adultos vírgenes para los estudios posteriores fueron obtenidos mediante la revisión diaria de de jaulas que contenían ninfas en sus últimos instars. Solo fueron seleccionados aquellos adultos que aún presentaran coloración clara (muda reciente).

Obtención y análisis de volátiles

Machos y hembras adultos (20-40 individuos) fueron colocados en cámaras de aireación de vidrio separadas (24 cm largo, 4,6 cm diámetro) con 4 hojas de *E. tereticornis*. Los compuestos volátiles emitidos fueron colectados durante 72 h en 50 mg de Haysep-Q (80/100 mesh), utilizando una corriente constante de aire pre-filtrado por carbón activado y humedecido por barboteo en agua destilada (300 mL/min, 24 °C, fotoperíodo: 14:10 L:O). Los volátiles adsorbidos fueron eluidos con 1 mL de hexano y concentrado bajo flujo de N_2 a 100 mL para su análisis. Se obtuvieron como control los volátiles de la cámara de vidrio vacía y de 4 hojas de *E. tereticornis*, en iguales condiciones experimentales. El extracto de volátiles de machos para la evaluación comportamental en olfatómetro fue realizada de igual manera, sin realizar el paso de concentración del extracto.

El análisis de volátiles fue realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando un instrumento Shimadzu QP-2010 equipado alternadamente con una columna polar (AT-Wax-ms) o apolar (AT-5-ms) (ambas: 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm), y operado con He como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperaturas utilizado fue 40 °C (1 min) - 7 ºC/min - 250 °C (1 min) para la columna polar y 40 °C (1 min) - 10 ºC/min - 300 °C (3 min) para la apolar. Las temperaturas del inyector e interfase fueron 220 °C y 250 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 mL en modo «splitless», y los espectros de masas se adquirieron en modo SCAN, desde *m/z* 30 hasta 350 (70 eV). Para el cálculo de índices de retención se utilizó una mezcla de n-alcanos en concentración 100 ppm (cada uno), inyectada en idénticas condiciones a los extractos de volátiles.

Experimentos en olfatómetro

Los experimentos fueron realizados durante la fase diurna del fotoperíodo, utilizando un olfatómetro de vidrio en forma de «Y» (cada brazo: 20 x 4 cm, largo x diám.). Los estímulos fueron colocados en tubos de vidrio (10 x 4 cm, largo x diám.) anexos a los brazos laterales del olfatómetro, alternando su posición relativa entre réplicas. Una corriente de aire humedecido y pre-filtrado por carbón activado (1,2 L/min) fue dividida entre los brazos del olfatómetro para arrastrar los compuestos volátiles del estímulo hacia el brazo central, donde se colocó un insecto cuyo comportamiento fue observado durante 10 min para registrar la primera opción, número de entradas y tiempo de permanencia en cada brazo. Los insectos fueron utilizados una única vez, y aquellos que no alcanzaron ningún brazo del olfatómetro fueron eliminados del análisis.

Los estímulos utilizados en el olfatómetro fueron: a) 10 insectos vivos (machos o hembras); b) extracto de volátiles de machos; c) 3-metil-2-butenoato de butilo. En todos los casos se incluyeron 2 hojas de *E. tereticornis* en ambos brazos, y solvente (hexano) cuando el estímulo fue aplicado en solvente (b y c).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de volátiles

La comparación de los perfiles cromatográficos de emisiones volátiles de hembras y machos *T. peregrinus* mostraron consistentemente un componente específico de machos, el cual fue identificado como 3-metil-2-butenoato de butilo por su espectro de masas, índices de retención, y comparación con el compuesto sintético (por detalles de la síntesis e identificación ver (González *et al*., 2012)) (Figuras 1 y 2). El compuesto presente en los volátiles emitidos por hembras, con igual tiempo de retención en la columna polar (Figura 1), fue identificado como n-nonanal, y se confirmó su

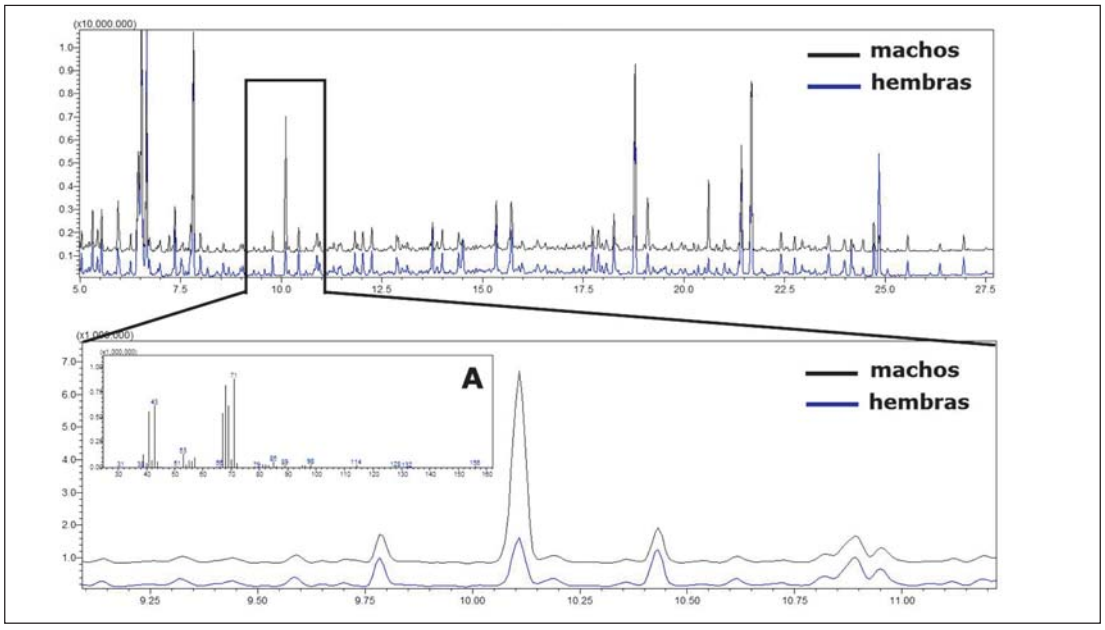

Figura 1. Análisis por GC-MS (cromatograma de iones totales) de extractos de volátiles emitidos por *T. peregrinus* machos (negro) y hembras (azul). Mitad superior: cromatograma total. Mitad inferior: ampliación mostrando el pico correspondiente al compuesto macho-específico 3-metil-2-butenoato de butilo, con un tiempo de retención de 10.1 min (espectro de masas en inserto **A**). El compuesto que eluye con igual tiempo de retención en el extracto de hembras corresponde a n-nonanal, un compuesto de las hojas de eucalipto utilizadas durante la colecta de volátiles como fuente de alimentación.

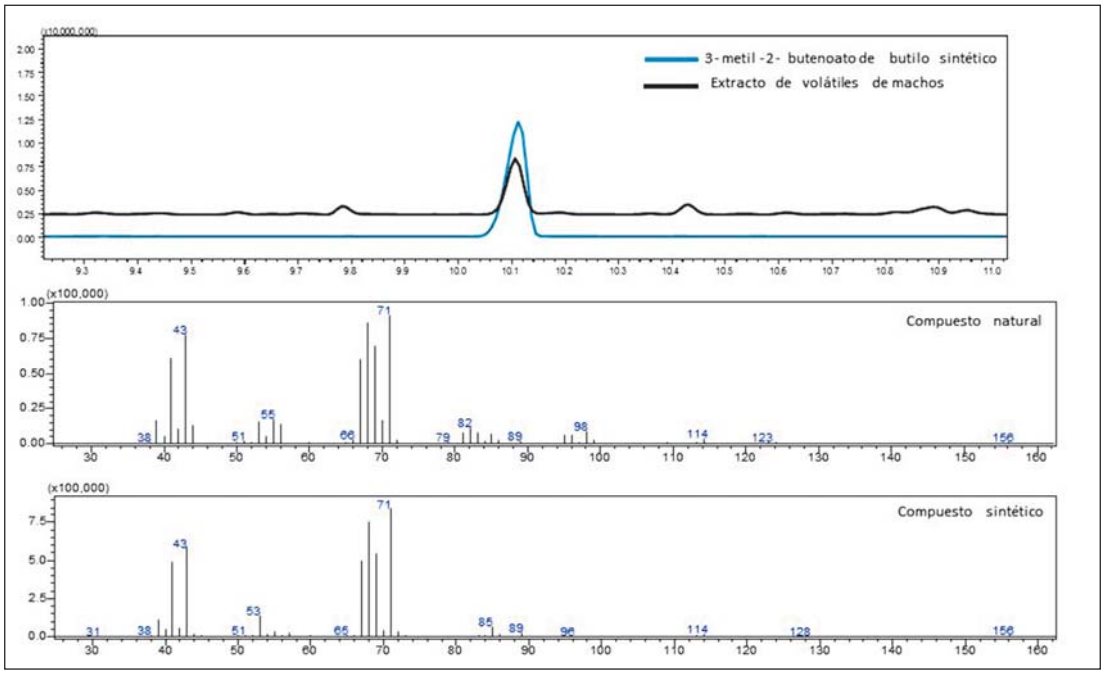

Figura 2. Comparación de los tiempos de retención (superior) y espectros de masas de la feromona de agregación de *T. peregrinus*. El espectro de masas del compuesto natural presente en extractos de volátiles de machos (medio) y el del compuesto sintético (inferior) fueron casi idénticos, así como el tiempo de retención en cromatografía gaseosa, confirmando la identificación del compuesto como 3-metil-2-butenoato de butilo.

origen como un compuesto emitido por las hojas, presente también en el control correspondiente.

Experimentos en olfatómetro

Los ensayos con insectos vivos (machos o hembras) como estímulo mostraron una atracción significativa de machos hacia otros machos co-específicos. El brazo del olfatómetro con machos como estímulo fue elegido más frecuentemente (P = 0,004, test χ^2, N = 35), y los machos testados pasaron más tiempo (P = 0,002, test de Wilcoxon, N= 35) que en el brazo control. Las hembras, por su parte, no mostraron preferencia por ningún brazo del olfatómetro, tanto en relación a la primera elección (P = 0,22, test de χ^2, N= 42) como al tiempo de permanencia en cada brazo (P = 0.69, test de Wilcoxon, N= 42) (Figuras 3A y 4A).

Dados los resultados obtenidos, los siguientes ensayos comportamentales se enfocaron en la respuesta de machos. Al evaluar extractos de volátiles de machos como estímulo, los machos mostraron una clara atracción tanto en la primera elección del brazo del olfatómetro (P = 0,005, test de χ^2, N= 43) como en el tiempo de permanencia en el brazo del estímulo (P = 0,02, test de Wilcoxon, N= 43) (Figuras 3B y 4B).

Los machos también fueron atraídos hacia el compuesto sintético identificado en el análisis de volátiles de machos, y ausente en las hembras, 3-metil-2-butenoato de butilo. Evaluado en combinación con hojas de *E. tereticornis* (en ambos brazos), la aplicación de 1 µg del compuesto sintético en papel de filtro fue suficiente para atraer significativamente a los machos, tanto en su primera elección del brazo del olfatómetro (P < 0,0001, test de χ^2 test, N= 88), como en el tiempo de permanencia en el brazo tratado (P < 0,001, test de Wilcoxon, N= 88) (Figuras 3C y 4C).

Estos resultados demuestran que la atracción de los machos hacia machos co-específicos y al extracto de volátiles de machos, se debe, al menos en parte, al compuesto 3-metil-2-butenoato de butilo, el cual estaría actuando por lo tanto como feromona de agregación de machos. Considerando el número de machos utilizados en la colecta de volátiles, y el tiempo de colecta, puede estimarse que los ensayos con extractos de volátiles se realizaron con 0,002 equivalente de insecto/h. Asimismo, una comparación de las áreas de los picos cromatográficos del extracto de volátiles de machos y de una solución 100 mg/mL de 3-metil-2-butenoato de butilo, permite estimar que la cantidad de la feromona de agregación evaluada en los ensayos comportamentales con extractos de volátiles de machos fue de 0,25 mg (en 5 mL de solución). Por lo tanto, aunque la cantidad de compuestos sintético utilizado en los ensayos fue mayor (1 mg), ésta es del mismo orden que la cantidad en los extractos, por lo que los bioensayos son comparables y reflejan la abundancia natural de este compuesto. Asimismo, en un estudio paralelo fue reportado que la cantidad neta de 3-metil-2-butenoato de butilo en machos *T. peregrinus* es de 1 mg/insecto, indicando nuevamente que la cantidad ensayada en nuestro estudio es biológicamente relevante (Martins *et al*., 2012).

Este trabajo representa el primer reporte de 3-metil-2-butenoato de butilo como una feromona en insectos, así como la primer feromona identificada en la familia Thaumastocoridae. El hallazgo simultáneo del mismo compuesto en poblaciones de *T. peregrinus* en Brasil (Martins *et al*., 2012) indica que nuestro estudio describe una feromona característica de esta especie. El rol ecológico de este compuesto en la biología de *T. peregrinus*, así como las posibles aplicaciones de este compuesto al manejo de esta plaga emergente, continuarán siendo estudiados en nuestro laboratorio. En especial, consideramos que una feromona de agregación posee potencial para el desarrollo de trampas de monitoreo, pero también para la diseminación de agentes microbianos de control biológico (entomopatógenos), mediante trampas no letales de captura con posterior inoculación y liberación del insecto. Este estudio ha sido publicado en forma más extensa en la revista de entomología Psyche, en un número especial sobre ecología química de plagas emergentes del sub-orden Heteroptera (González *et al*., 2012).

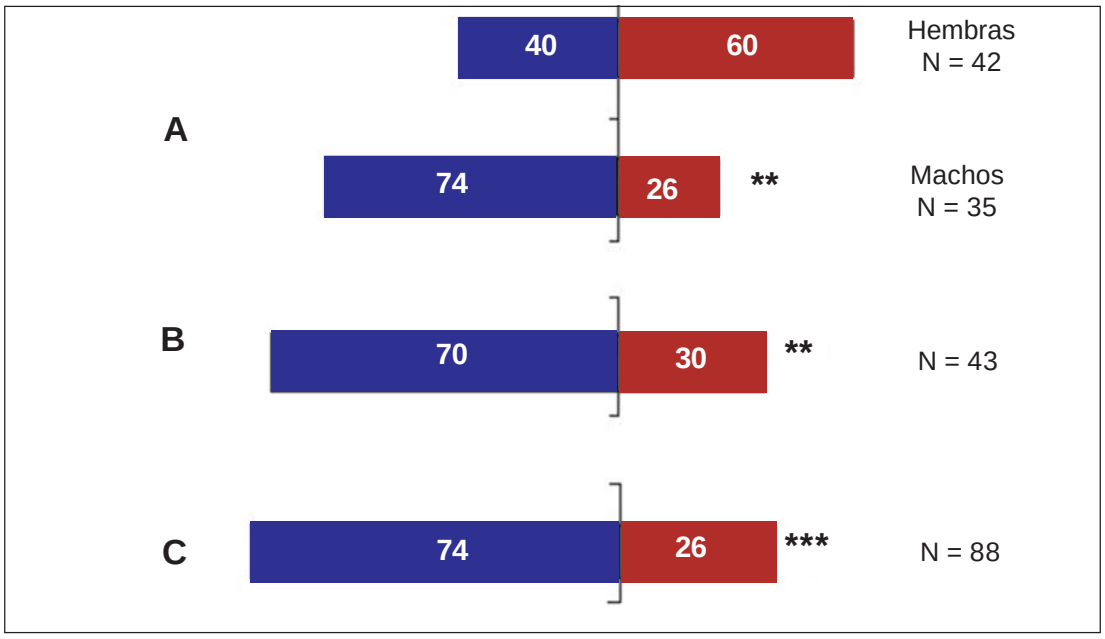

Figura 3. Resultados en olfatómetro de dos vías (Y). Porcentaje de insectos que eligieron el brazo de estímulo (azul) o control (rojo). A: respuesta de hembras y machos a volátiles de machos vivos. B: Respuesta de machos al extracto de volátiles de machos. C: Respuesta de machos a 3-metil-2-butenoato de butilo sintético. Todos los tratamientos y controles incluyeron 2 hojas de *E. tereticornis*. Los asteriscos indican nivel de significancia en tests de Chi-cuadrado (** P < 0,01; *** P < 0,001).

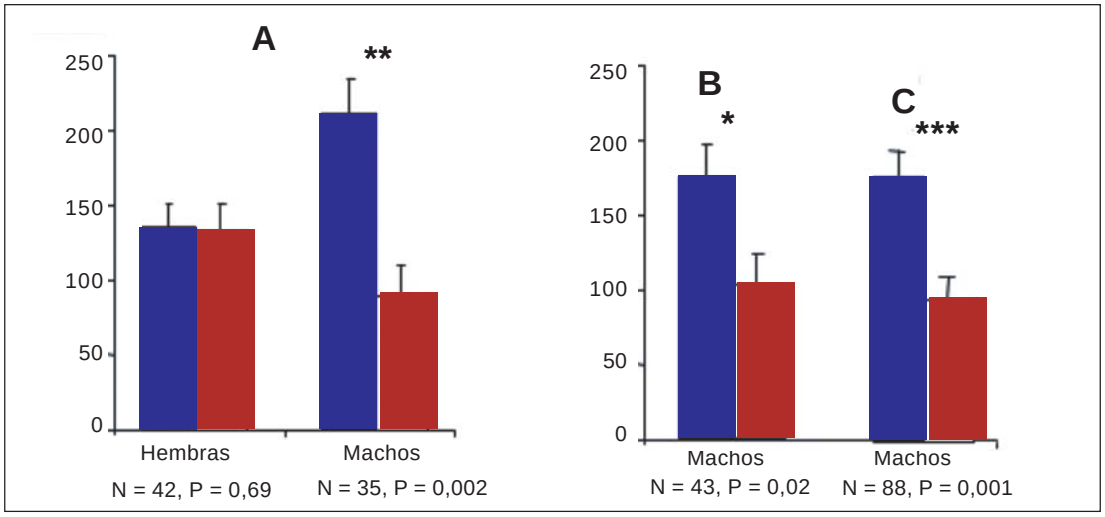

Figura 4. Tiempo de permanencia de *T. peregrinus* en los brazos del olfatómetro con estímulo olfativo (barras azules) y control (barras rojas). Las barras representan el tiempo acumulado durante los 10 min del ensayo. A: respuesta de hembras y machos a volátiles de machos vivos. B: Respuesta de machos al extracto de volátiles de machos. C: Respuesta de machos a 3-metil-2-butenoato de butilo sintético. Todos los tratamientos y controles incluyeron 2 hojas de *E. tereticornis*. Los asteriscos indican nivel de significancia en tests de Wilcoxon (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < ,001). Barras de error representan error estándar de la media.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de INIA y del fondo Innovagro de la Agencia de Investigación e Innovación (ANII, proyecto FSA-2009-1-1522). Se agradece asimismo el aporte de la Prof. Daniela Gamenara de la Facultad de Química en aspectos de síntesis orgánica, y de Florencia Doño, Verónica Hernández y Valeria Cal en las etapas iniciales de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

CARPINTERO, D.L.; DELLAPE, P.M. 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). Zootaxa 1228: 61-68.

DIEA/MGAP. 2011. Anuario estadístico agropecuario 2011. Anuarios. Revisado enero 2012 en http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU.

GONZÁLEZ, A.; CALVO, M.V.; CAL, V.; HERNÁNDEZ, V.; DOÑO, F.; ALVES, L.; GAMENARA, D.; ROSSINI, C.; MARTÍNEZ, G. 2012. A Male Aggregation Pheromone in the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). Psyche: A Journal of Entomology 2012: 7 pp. doi:10.1155/2012/868474.

IDE, M.S.; RUIZ, G.C.; SANDOVAL, C.A.; VALENZUELA, E.J. 2011. Detection of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) associated to *Eucalyptus* spp. in Chile. Bosque 32(3): 309-313.

JACOBS, D.H.; NESER, S. 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees. South African Journal of Science 101(5-6): 233-236.

MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M. 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). Agrociencia Uruguay 14(1): 15-18.

MARTINS, C.B.C.; SOLDI, R.A.; BARBOSA, L.R.; ALDRICH, J.R.; ZARBIN, P.H.G. 2012. Volatile Chemicals of Adults and Nymphs of the *Eucalyptus* Pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). Psyche: A Journal of Entomology 2012: 6 pp. doi:10.1155/2012/275128.

NOACK, A.; COVIELLA, C. 2006. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy Hemiptera:Thaumastocoridae): first record of this invasive species in the Americas. General and Applied Entomology 35: 13-14.

WILCKEN, C.,; SOLIMAN, E.; SÁ, L.D.; BARBOZA, L.; DIAS, T.; FERRERIRA FILHO, P.; OLIVEIRA, R. 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. Journal of Plant Protection Research 50: 201-205.