

# Técnica de sexado de pupas de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae): una forma rápida y fácil de sexar para estudios biológicos

ALMADA, M.S.<sup>1,2</sup>; NUSSENBAUM, A.L.<sup>3</sup>

## RESUMEN

El picudo del algodnero, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es considerado una de las plagas más perjudiciales del cultivo de algodón en América. Muchos estudios requieren la determinación del sexo para lo que se utilizan diferentes técnicas, pero estas tienen limitaciones o requieren cierto entrenamiento previo. En el presente trabajo, contribuimos con mejores ilustraciones y fotografías actualizadas de las diferencias entre sexos de pupas de *A. grandis* para proporcionar una técnica más fácil y rápida para la diferenciación de sexos.

**Palabras clave:** algodón, determinación del sexo, picudo del algodnero, plaga.

## ABSTRACT

*Boll weevil, Anthonomus grandis Boheman (Coleoptera: Curculionidae), is considered the most destructive cotton pest in America. Many studies require sex determination for which different techniques are used, but they have limitations or require previous training. In the present work, we contribute with better illustrations and updated photographs of the differences between sexes of A. grandis pupae to provide an easy and quick technique for sex differentiation.*

**Keywords:** cotton, sex determination, boll weevil, pest.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Reconquista, Ruta 11, km 773 (3560). Reconquista, Santa Fe, Argentina; <sup>2</sup>Universidad Católica de Santa Fe, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Reconquista, Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: almada.melina@inta.gob.ar

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF), G.V.A. Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: nussenbaum.ana@inta.gob.ar

## INTRODUCCIÓN

El picudo del algodónero, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es una de las plagas más importantes del algodón *Gossypium hirsutum* L. (Malvales: Malvaceae) en el continente americano. En la República Argentina se capturó por primera vez en 1993 en áreas no cultivadas de la provincia de Misiones, y en 1994 cerca de cultivos de algodón en el límite con Paraguay (Marengo Lozada y Whitcomb, 1993; Stadler y Buteler, 2007). Luego de los primeros informes en Argentina, la plaga se ha dispersado a nuevas áreas y, finalmente, a pesar de la fuerte acción del gobierno nacional para disminuir su propagación, se obtuvieron registros de la plaga en las principales zonas algodonerías de las provincias de Formosa (1994), Corrientes (1997), Chaco (2002), Santa Fe (2004) y Santiago del Estero (2015) (Lanteri *et al.*, 2003; Sosa *et al.*, 2009), donde se encuentra actualmente establecida.

El picudo del algodónero daña las estructuras reproductivas de las plantas de algodón debido a su estrategia de alimentación y oviposición, produciendo pérdida de calidad de fibra y abscisión de pimpollos (Showler, 2008). Las hembras oviponen en el interior del pimpollo o cápsulas pequeñas y permanecen hasta completar su desarrollo larval en tres estados. Las larvas del segundo o tercer estadio generan la abscisión de la cápsula, lo que permite culminar el desarrollo dentro de este en el suelo, hasta que los adultos emergen (Coakley *et al.*, 1969; Showler, 2005; Showler y Cantú, 2005). La rápida colonización de la plaga está relacionada con características del ciclo de vida de esta especie, como por ejemplo, alta capacidad reproductiva, ciclo de vida multivoltino, desarrollo endofítico de las etapas inmaduras, junto con las condiciones ambientales, donde la depredación y el parasitismo proporcionan un control deficiente, aumentando rápidamente los niveles de infestación (Grilli *et al.*, 2012).

Muchos estudios, especialmente estudios ecológicos de esta plaga, requieren diferenciar los sexos tanto de adultos como de pupas. Sin embargo, las diferentes técnicas utilizadas para el sexado tienen limitaciones o requieren entrenamiento previo. Entre las diferentes técnicas, se pueden mencionar la disección de adultos y la observación de la morfología interna, técnica posible únicamente cuando el estudio no requiere del insecto vivo. Otros métodos que permite el sexado es oprimir suavemente el abdomen del adulto hasta extraer parcialmente los genitales, o levantar los élitros hasta observar la cantidad de terguitos que es diferencial entre los sexos, aunque estos métodos generalmente pueden producir daños en el adulto (Sappington y Spurgeon, 2000).

La técnica más utilizada para sexar al picudo del algodónero fue descrita por Agee (1964) y mejorada por Sappington y Spurgeon (2000). El método para sexar adultos implica la observación del octavo (último) terguito abdominal, que en el macho es fijo y presenta una muesca en el centro, mientras que en la hembra es móvil y se proyecta junto con el ovipositor. Esta técnica fue ampliamente utilizada en diferentes estudios porque es fácil y muy precisa (Firmino *et al.*,

2013; Greenberg *et al.*, 2004a; Lewis *et al.*, 2002; Spurgeon *et al.*, 2003). Sin embargo, se requiere experiencia y habilidad para manipular adultos vivos sin dañarlos o que sufran estrés, fundamental en insectos que luego serán evaluados en ensayos de comportamiento. Otra limitación de esta técnica es que, cuando se necesitan obtener adultos vírgenes es necesario separar adultos recién emergidos para garantizar que los insectos no copulen, teniendo en cuenta que el apareamiento podría ocurrir luego de 12 horas de la emergencia (Mayer y Brazzel, 1963).

Burke (1968) y Anderson (1968) realizaron una descripción de las pupas de la tribu Anthonomini, principalmente de las especies *A. grandis grandis* y *A. grandis thurberiae*. Se reconocieron pupas hembras por la presencia de un par de lóbulos en una vista posteroventral; están ausentes en pupas machos. Esta diferencia de sexo es fácil de distinguir bajo el microscopio binocular. Las ventajas de esta técnica comprenden una manipulación factible de las pupas y permiten el sexado antes de la aparición de adultos. Por lo tanto, es fácil obtener insectos recién emergidos y vírgenes.

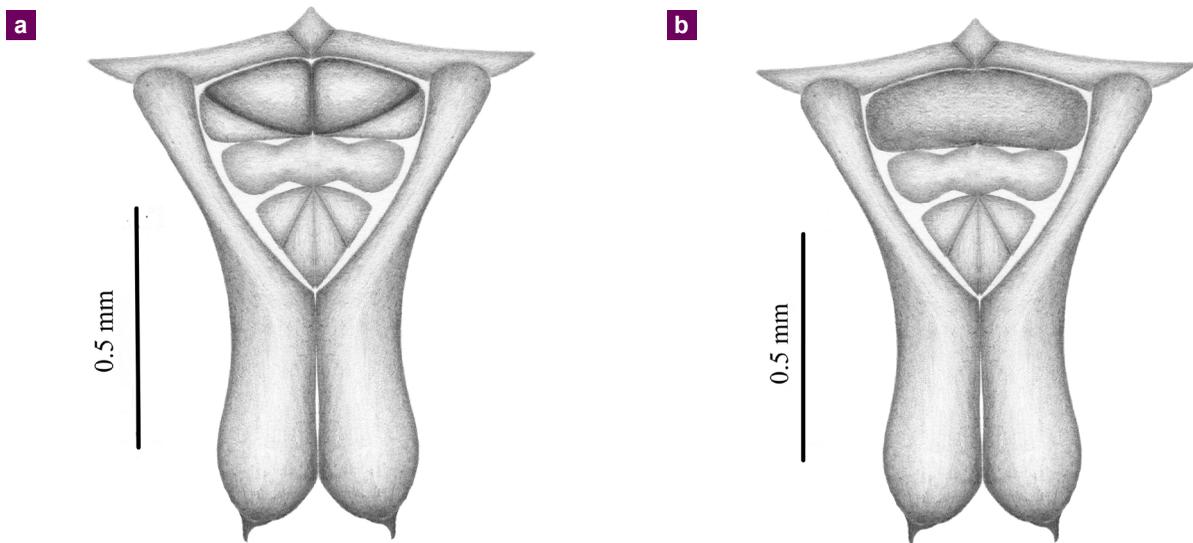
Nuestro objetivo es mostrar fotografías y dibujos interpretativos para ilustrar las diferencias entre las pupas de *Anthonomus grandis* machos y hembras, y mejorar la técnica de sexado en esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los insectos fueron recolectados en el campo y obtenidos de una cría en laboratorio con dieta artificial. Se evaluó un total de 120 pupas (recolección de campo y de cría). La recolección de pupas en el campo consistió en 30 pimpollos de algodón presentes en el suelo, durante el ciclo reproductivo del cultivo de algodón en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA-INTA) Reconquista, Santa Fe, Argentina (29° 11' S, 59° 52' O) de enero a abril de 2017. Respecto a las pupas criadas en laboratorio, se obtuvieron pupas de la colonia mantenida en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), INTA Castelar, iniciada con individuos recolectados en áreas rurales de la provincia de Santa Fe, Argentina en 2007 y de la colonia mantenida en EEA INTA Reconquista. Ambas colonias fueron vigorizadas con gorgojos silvestres una vez al año. Las condiciones de cría fueron 27 ± 1 °C, 50 ± 10% HR y 12:12 fotoperiodo. Las larvas y los adultos fueron alimentados con una dieta artificial, de acuerdo con las modificaciones realizadas en la metodología propuesta por Monnerat *et al.* (2000).

Para sexar las pupas se siguieron las diferencias descritas por Anderson (1968). Estas diferencias se ilustraron utilizando la técnica de dibujo de grafito del último esternón abdominal visible, y las pupas se fotografiaron con un microscopio binocular. Además, observamos diariamente las pupas para evaluar cuándo se identifican estas características desde el principio hasta el final del estadio.

Finalmente, para evaluar las diferencias entre sexos en el tamaño corporal, se midieron la longitud y el peso de las pupas tanto para los insectos recolectados en el campo como para los insectos de la cría obtenida de laboratorio.



**Figura 1.** Vista posteroventral de pupas de (a) hembra ♀ y (b) macho ♂ de *Anthonomus grandis*. Barra de escala = 0,5 mm.

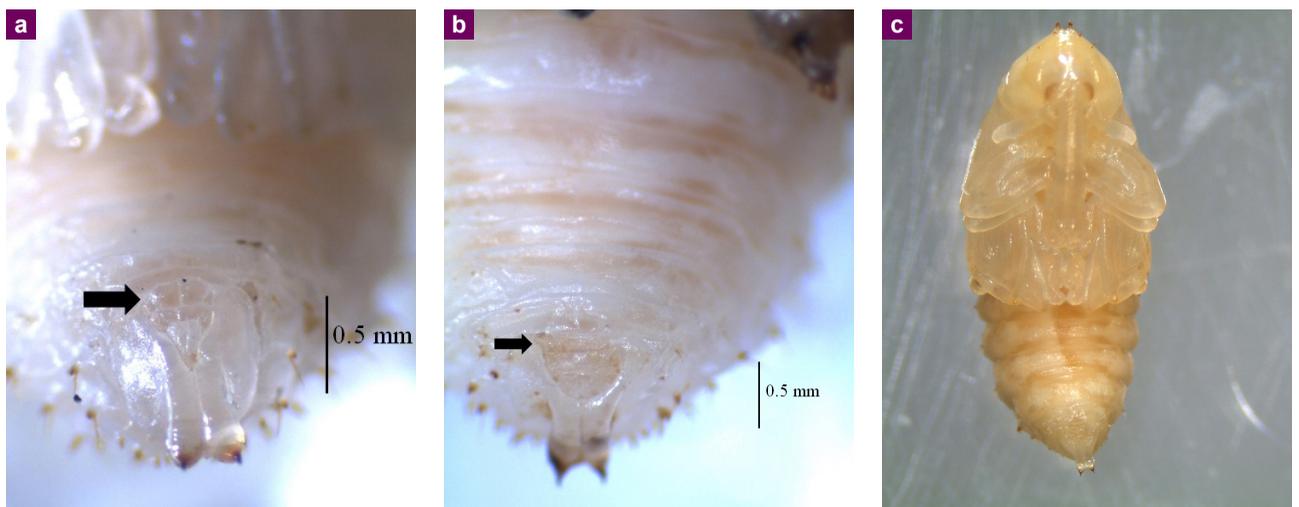
La longitud de las pupas se midió usando una lámina milimétrica bajo un microscopio binocular (20x), luego se pesó individualmente con una balanza analítica (0,1 g). La longitud y el peso se compararon entre machos y hembras, utilizando la prueba t, con el programa R versión 3.4.1. (2017).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La figura 1 ilustra pupas de ambos sexos del picudo algodonero. En las pupas hembras, se observó un par de lóbulos subcontiguos cortos y convexos que se encuentran inmediatamente detrás del último esternito abdominal visible y anterior al ano (figura 1a). En los machos solo hay un área elevada indivisa detrás del último esternito abdominal (figura 1b).

Las estructuras ventrales de diferenciación de sexos también fueron fotografiadas (figura 2). Diariamente, se siguieron las diferencias entre pupas de machos y hembras. Al momento de pupación, los individuos muestran las estructuras que permiten diferenciarlos entre sexos. En las hembras, los lóbulos se distinguen fácilmente desde el comienzo del estado de pupación.

Con respecto al tamaño del cuerpo, la longitud media de las pupas recolectadas en el campo fue de  $6,90 \pm 0,73$  para las hembras (N=31) y  $6,67 \pm 0,60$  para los machos (N=24), y el peso promedio fue de  $25,99 \pm 7,83$  para las hembras y  $24,67 \pm 7,09$  para machos. No hay diferencias significativas entre sexos respecto a la longitud ( $t=1,23$ ; g.l.=53;  $p=0,23$ ) y peso ( $t=0,65$ ; g.l.=53;  $p=0,52$ ). Se encontraron



**Figura 2.** Vista posteroventral de la pupa de *Anthonomus grandis*. La flecha indica pares de lóbulos en (a) hembra ♀, y ausentes en (b) macho ♂. c) Pupas. Barra de escala = 0,5 mm.

los mismos resultados para las pupas de cría en laboratorio. La longitud promedio fue de  $7,10 \pm 0,77$  para las hembras (N=28) y  $6,82 \pm 0,74$  para los machos (N=30), y el peso promedio fue de  $24,49 \pm 7,34$  para las hembras y  $21,99 \pm 7,30$  para los machos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos respecto a la longitud ( $t=1,41$ ; g.l.=56;  $p=0,16$ ) y peso ( $t=1,30$ ; g.l.=56;  $p=0,20$ ). Estos resultados son similares a los de estudios previos en los que no existen diferencias entre los sexos para la longitud corporal y el peso (Sappington y Spurgeon, 2000; Greenberg *et al.*, 2004b). La variación en el acceso al alimento (calidad y disponibilidad) entre las larvas podría dar como resultado una amplia gama de tamaños de adultos (Greenberg *et al.*, 2005) independientemente de su sexo.

En este trabajo, las diferencias entre sexos se identificaron rápidamente en todas las pupas observadas. Nuestros resultados actualizan información ilustrativa permitiendo la separación por sexo de pupas de *A. grandis*, así como aspectos sobre su biología. Esta técnica es fácil y rápida para los rasgos de sexado y es una herramienta útil al momento de realizar acciones necesarias para el Manejo Integrado de Plagas del picudo algodonero en Argentina.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del personal técnico y auxiliar de la Estación Experimental Agropecuaria Reconquista de INTA, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y al Ministerio de Ciencias de Santa Fe ASaCTel (2010-160-16) por su financiamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGEE, H.R. 1964. Characters for determination of sex of the boll weevil. *Journal of Economic Entomology*, 57, 500-501.
- ANDERSON, D.M. 1968. Observations on the Pupae of *Anthonomus grandis grandis* Boheman and *A. grandis thurberiae* Pierce (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 61(1), 125-129.
- BURKE, H.R. 1968. Pupae of the weevil tribe Anthonomini (Coleoptera: Curculionidae). *Texas Agri. Exp. Sta. Tech. Monog.* 5, 92 p.
- COAKLEY, J.M.; MAXWELL, F.G.; JENKINS, J.N. 1969. Influence of feeding, oviposition, and egg and larval development of the boll weevil on abscission of cotton squares. *Journal of Economic Entomology*, 62, 244-245.
- FIRMINO, A.A.P.; FONSECA, F.C.A.; DE MACEDO, L.L.P.; COELHO, R.R.; ANTONINO DE SOUZA, JR.J.D.; TOGAWA, R.C.; SILVA-JUNIOR B.O.; PAPPAS, JR.G.J.; DA SILVA, M.C.M.; ENGLER, G.; DE SA, M.F.G. 2013. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PLoS ONE* 8(12), e85079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085079>
- GREENBERG, S.M.; SAPPINGTON, T.W.; COLEMAN, R.J. 2004b. Population dynamics of overwintering boll weevils, *Anthonomus grandis grandis* (Boheman) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Entomology Presentations, Posters and Proceedings*. (Disponible: [4.https://lib.dr.iastate.edu/ent\\_conf/4](https://lib.dr.iastate.edu/ent_conf/4) verificado: 21 de julio de 2019).
- GREENBERG, S.M.; SPURGEON, D.W.; SAPPINGTON, T.W.; SETAMOU, M. 2005. Size-dependent feeding and reproduction by boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 749-756.
- GRILLI, M.P.; BRUNO, M.A.; PEDEMONTE, M.L.; SHOWLER, A.T. 2012. Boll weevil invasion process in Argentina. *Journal of Pest Science*, 85, 47-54.
- LANTERI, A.A.A.; CONFALONIERI, V.A.; SCATAGLINI, M.A. 2003. El picudo del algodonero en la Argentina: Principales resultados e implicancias de los estudios moleculares. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62, 1-15.
- LEWIS, D.K.; SPURGEON, D.; SAPPINGTON, T.W.; KEELEY, L.L. 2002. A hexamerin protein, AgSP-1, is associated with diapause in the boll weevil. *Journal of Insect Physiology*, 48(9), 887-901.
- MARENGO LOZADA, R.M.; WHITCOMB, W.H. 1993. Hospederas alternantes del picudo mejicano del algodonero (*Anthonomus grandis* Boh.). Ministerio Agricultura Ganadería. Asunción, Paraguay, 40 p.
- MAYER, M.S.; BRAZZEL, J.F. 1963. The mating behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Journal of Economic Entomology*, 56(5), 605-609.
- MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRA NETO, O.B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O.; SÁ, M.F.G. de. 2000. Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 4p.
- R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (Disponible: <https://www.R-project.org/> verificado: 31 de agosto de 2019).
- SAPPINGTON, T.W.; SPURGEON, D.W. 2000. Preferred technique for adult sex determination of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(3), 610-615.
- SHOWLER, A.T. 2005. Relationships of different cotton square sizes to boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition in field conditions. *Journal of Economic Entomology*, 98(5), 1572-1579.
- SHOWLER, A.T. 2008. Longevity and egg development of adult female boll weevils fed exclusively on different parts and stages of cotton fruiting bodies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 127, 125-132.
- SHOWLER, A.T.; CANTÚ, R.V. 2005. Intervals between boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) oviposition and square abscission, and development to adulthood in Lower Rio Grande Valley, Texas, field conditions. *Southwestern Entomology*, 30, 161-164.
- SOSA, M.A.; VITTI, D.E.; ALMADA, M.S. 2009. Avance del picudo del algodonero (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) en el departamento General Obligado (Santa Fe). XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Fitosanidad responsable, base de la calidad de vida. Termas de Rio Hondo. Santiago del Estero.
- SPURGEON, D.W.; SAPPINGTON, T.W.; SUH, C.P.C. 2003. A system for characterizing reproductive and diapause morphology in the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 96(1), 1-11.
- STADLER, T.; BUTELER, M. 2007. Migration and dispersal of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) in South America. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66, 205-217.