

Programa de Doctorado: Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y de Desarrollo  
Rural Sostenible por la Universidad de Córdoba y la Universidad de Sevilla

Tesis Doctoral

**Efectos de la termorregulación en el control de las plagas de la langosta  
mediterránea o marroquí *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg)  
(Orthoptera: Acrididae) por medio de ascomicetos entomopatógenos**

Effects of thermoregulation on the control of Mediterranean or Moroccan locust  
*Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) outbreaks by  
entomopathogenic ascomycetes.

**Doctorando:**

Pablo Valverde Garcia

**Director:**

Prof. D. Enrique Quesada Moraga

Mayo 2019

TITULO: EFECTOS DE LA TERMORREGULACIÓN EN EL CONTROL DE LAS  
PLAGAS DE LA LANGOSTA MEDITERRÁNEA O MARROQUÍ  
DOCIOSTAURUS MAROCCANUS (THUNBERG)(ORTHOPTERA:  
ACRIDIDAE) POR MEDIO DE ASCOMICETOS  
ENTOMOPATÓGENOS

AUTOR: *Pablo Valverde García*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

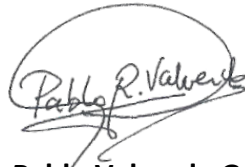




Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes  
Departamento de Agronomía

**Efectos de la termorregulación en el control de las plagas de la langosta mediterránea o marroquí *Docioctaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) por medio de ascomicetos entomopatógenos**

Tesis presentada por D. Pablo Valverde Garcia para optar por el grado de Doctor por la Universidad de Córdoba



Fdo. **Pablo Valverde Garcia**



V°B° del Director

Fdo. **Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga**

Catedrático de Universidad

E.T.S.I.A.M.

Córdoba, mayo de 2019





**TÍTULO DE LA TESIS:** Efectos de la termorregulación en el control de las plagas de la langosta mediterránea o marroquí *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) por medio de ascomicetos entomopatógenos.

**DOCTORANDO:** PABLO VALVERDE GARCIA

#### **INFORME RAZONADO DEL DIRECTOR DE LA TESIS**

**El Prof. D. Enrique Quesada Moraga, Doctor Ingeniero Agrónomo, Catedrático de Producción Vegetal de la Universidad de Córdoba, en el Departamento de Agronomía de la E.T.S.I.A.M., y responsable del Grupo PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola”**

INFORMA: que el trabajo titulado **“Efectos de la termorregulación en el control de las plagas de la langosta mediterránea o marroquí *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) por medio de ascomicetos entomopatógenos”** realizado bajo mi dirección por **D. Pablo Valverde Garcia**, lo considero ya finalizado y se han completado con éxito todos los objetivos planteados en dicho trabajo de investigación.

Los indicios de calidad de esta Tesis Doctoral se indican a continuación:

**Valverde-Garcia, P.,** Santiago-Álvarez, C., Thomas, M.B., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., 2018. Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust *Doclostaurus maroccanus* control. *BioControl*. 63, 819-831. Factor de Impacto: 1.924, Q1 (20/96) en “Entomology”.

Thomas, M.B., Watson, E.L., **Valverde-Garcia, P.**, 2003. Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecol. Lett.* 6, 183-188. Factor de Impacto: 9.137, Q1 (4/160) en “Ecology”.

**Valverde-García, P.,** Santiago-Álvarez, C., Thomas, M.B., Maranhao, E.A.A., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., 2019. Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, *Locusta migratoria*. *J. Invertebr. Pathol.* 161, 61-69. Factor de Impacto: 2.511, Q1 (18/167) en “Zoology”.

Adicionalmente, el doctorando es coautor del capítulo del libro: Santiago-Álvarez, C., **Valverde-García, P.,** Quesada-Moraga, E., 2008. El control biológico de langostas y saltamontes, en: Jacas, J., Urbaneja, A. (Eds.), Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma, España, pp. 165-178; que ha sido utilizado como base en algunas secciones de la Introducción de esta Tesis Doctoral

Por todo ello, puede ser presentada para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, mayo de 2019

A handwritten signature in black ink, enclosed within a circular scribble. The signature is cursive and appears to read 'Enrique Quesada Moraga'.

Fdo.: Prof. D. Enrique Quesada Moraga

***A mis padres***





## **AGRADECIMIENTOS**

*Me gustaría agradecer sinceramente al Prof. Dr. Enrique Quesada Moraga y al Prof. Dr. Cándido Santiago Álvarez por su orientación, esfuerzo, enseñanzas y sobre todo por su desinteresada amistad durante tantos años. Sin vuestra insistencia, ayuda y paciencia, esta Tesis Doctoral no se habría concluido. Vuestro ejemplo y la formación que me habéis proporcionado, primero durante la realización del periodo de investigación, y luego durante las numerosas interacciones y colaboraciones a lo largo de tantos años, me han hecho mejor profesional y mejor persona.*

*A mis padres, Rafael y Chari, sin duda merecedores de los mayores agradecimientos. Sé que vuestra ilusión por que este momento llegara ha sido probablemente mayor incluso que la mía. Ha tomado mucho tiempo, pero nunca olvidaré vuestra confianza y apoyo.*

*A mi mujer, Sara, y a mis hijos Juan Antonio y María, por haber tenido la paciencia de aguantar todas esas horas de mi "ausencia", dedicadas al trabajo en esta Tesis. Poder celebrar este gran hito con vosotros, da mucha más recompensa a tanto esfuerzo.*

*Al Prof. Matt Thomas, por su contribución científica y su amistad, que han sido muy importantes para la realización de todo este trabajo. Gracias por todas las oportunidades que me ofreciste durante el periodo de investigación y por tu ayuda y colaboración para la finalización de la Tesis Doctoral.*

*A la Prof. Dra. Inmaculada Garrido, por su constante apoyo personal y orientación científica. Gracias por todas esas colaboraciones que me han ayudado a no olvidar mi espíritu de entomólogo y, sobre todo, gracias por tu amistad y por compartir tantos ratos al teléfono en la distancia animándome a seguir adelante.*

*A la Dra. Elizabeth Maranhao, aunque llevamos muchos años sin vernos, todavía recuerdo los buenos momentos que pasamos trabajando juntos en el laboratorio. Sin tu ayuda, la gran mayoría del trabajo presentado en esta Tesis no hubiera sido posible.*

*Al Dr. Karl Schnelle, por su amistad, disponibilidad y ayuda totalmente desinteresada. Gracias por enseñarme a entender que la brevedad y la claridad son buenos atributos de la escritura científica en inglés y por hacer posible la publicación de los artículos incluidos en este documento.*

*Al Dr. Scott Ray, Scott no sabes cómo me hubiera gustado haber celebrado contigo este momento...pero sé que te sentirás orgulloso.*

*A mis hermanos, familiares y amigos, gracias por hacerme mantener la constancia para conseguir algo que parecía imposible. Especialmente a Juan Fabios y a Javier López, por darme tantos ánimos y escucharme cuando lo necesitaba.*

*A los Doctores María Fernández y Meelad Yousef y a la Doctoranda Natalia González, gracias por haberme hecho modestamente partícipe en muchos de vuestros trabajos científicos, y por habérmelo recompensado de manera tan sobrada. Esta relación me ha ayudado indudablemente a continuar mi trabajo.*

*A María Victoria Paredes y a todos los Ingenieros y Doctores que se han formado en la unidad de Entomología Agrícola, con los que he podido compartir muy buenos momentos personales y científicos durante estos años.*

*Por último, pero no menos importante, a todo el personal de los Departamentos de Agronomía, Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, y del Instituto de Estudios de Posgrado de la Universidad de Córdoba que me han ayudado a ir completando los requisitos académicos desde tan lejos. Gracias por vuestra disponibilidad y eficiencia.*

## RESUMEN

El control preventivo de la langosta marroquí o mediterránea *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) ha evolucionado en los últimos 70 años desde el uso de insecticidas químicos de amplio espectro, hacia medidas más adaptadas a los criterios de la agricultura sostenible. Entre estas medidas, destaca el control microbiano por medio de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs). Los AMEs presentan ventajas tanto por su modo de acción por contacto, como por su presencia natural en las poblaciones de acrididos. La cepa EABb 90/2-Dm de *Beauveria bassiana*, obtenida a partir de poblaciones de *D. maroccanus* de La Serena (Badajoz) y la cepa IMI 330189 de *Metarhizium acridum*, han mostrado eficacia para el control de la langosta mediterránea o marroquí en condiciones de laboratorio y campo. Sin embargo, el estudio de la adaptación ambiental de estas dos cepas para expresar su máxima virulencia en las condiciones de temperatura prevalentes en las áreas de reserva, así como su relación con la condición ectotérmica de estos acrididos -expresada en su capacidad para termorregular, e incluso la existencia de fiebre comportamental- se ha convertido en el principal objetivo de esta Tesis Doctoral.

En el **Capítulo II**, experimentos *in vitro* para evaluar la germinación de los conidios y el crecimiento fúngico, en condiciones de temperaturas constantes y fluctuantes (simulando condiciones de termorregulación), indicaron que la cepa IMI 330189 tuvo mejor adaptación a temperaturas por encima de 27 °C y la cepa EABb 90/2-Dm estuvo mejor adaptada a temperaturas en el rango 10–25 °C. Estos efectos fueron análogos a los obtenidos *in vivo*, donde la termorregulación de los insectos causó una importante pérdida de virulencia de la cepa EABb 90/2-Dm, frente a la obtenida en condiciones de no termorregulación [dosis:  $1 \times 10^4$  conidios por insecto; el tiempo medio de supervivencia (TMS) aumentó 2.6 veces; la mortalidad se redujo 23.6%], pero solo una moderada reducción de la virulencia de la cepa IMI 330189 [dosis:  $1 \times 10^4$  conidios por insecto; el tiempo medio de supervivencia (TMS) aumentó 1.8 veces; no hubo reducción de la mortalidad]. Los experimentos en gradiente de temperatura revelaron la inducción de fiebre comportamental en *D. maroccanus* causada por la cepa IMI 330189 de *M. acridum*, con una preferencia por temperaturas aproximadamente 4 °C superior en los insectos tratados en comparación a los insectos del testigo, aunque solo causó una ligera reducción de la virulencia. La cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* no indujo dicha respuesta comportamental de manera significativa.

Debido a la termorregulación comportamental de *D. maroccanus*, se ha propuesto la co-formulación de cepas para optar por un solape de actividad en un rango mayor de condiciones de temperatura. La compatibilidad de las dos cepas seleccionadas en esta Tesis Doctoral (EABb 90/2-Dm e IMI 330189) en tratamientos conjuntos y su repercusión sobre el proceso infeccioso en condiciones de termorregulación se han abordado en los Capítulos III y IV de la misma. En el **Capítulo III**, los resultados de las infecciones mixtas con la cepa IMI 330189 de *M. acridum* y dos

cepas autóctonas de *B. bassiana* -aisladas de ortópteros del área de reserva de La Serena (Badajoz)- en el hospedante modelo *Schistocerca gregaria*, ponen de manifiesto que la eficacia insecticida de un patógeno virulento puede verse modificada por la interacción con otros patógenos, incluso aunque estos sean avirulentos, dependiendo de las condiciones ambientales, especialmente temperatura ambiental y termorregulación, y del orden de infección. Estas interacciones podrían contribuir a una variabilidad inesperada en la eficacia de un agente de control, dependiendo de la naturaleza de la comunidad microbiana autóctona de la zona.

En el **Capítulo IV**, se ha evaluado el efecto de las infecciones individuales y mixtas con las cepas EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* y IMI 330189 de *M. acridum* sobre la supervivencia, alimentación y fecundidad de *D. maroccanus* en condiciones de termorregulación. Las langostas fueron tratadas con dosis reducidas de ambas cepas individualmente y en mezcla (dosis totales para las cepas individuales y su mezcla:  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^3$  conidios por insecto). Aunque las condiciones de temperatura (termorregulación, no termorregulación) tuvieron un efecto significativo en los resultados del experimento, la interacción entre ambas cepas fue aditiva para los efectos letales. Además, se detectaron efectos subletales como un 32–51% de reducción de la alimentación *per capita*, un 21-53% de reducción en el número de ootecas por hembra y una reducción del 30-65% en el número de huevos fértiles por hembra. La fecundidad (número de ootecas por hembra) y la alimentación *per capita* estuvieron positivamente correlacionadas ( $r = 0.783$ )

Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que, aunque la cepa IMI 330189 de *M. acridum* se adapta mejor a las altas temperaturas durante la termorregulación comportamental, su co-formulación con la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* podría permitir un solape de actividad de acuerdo a las condiciones de temperatura existentes. Los efectos subletales (alimentación y reproducción) deben ser considerados y añadidos a la mortalidad de los insectos para la evaluación del efecto global de los tratamientos fúngicos. En las áreas de reserva de la Península Ibérica, donde la temperatura muestra gran variación durante el día en los meses de primavera y verano, con el uso de esta co-formulación, la cepa de *M. acridum* proporcionaría un mejor control a las horas del día con temperaturas más altas (por encima de 27 °C) y *B. bassiana* sería más efectivo en las horas más templadas (10-25 °C). No obstante, estudios adicionales, incluyendo aplicaciones en campo, son necesarios para evaluar el impacto ecológico de esta combinación de cepas en las áreas de reserva de *D. maroccanus*.

**Palabras clave:** *Dociostaurus maroccanus*, Ascomicetos mistospóricos entomopatógenos, *Metarhizium acridum*, *Beauveria bassiana*, langosta, termorregulación, fiebre comportamental, interacción insecto-patógeno, infección mixta, alimentación, reproducción.

## ABSTRACT

The preventive control of the Moroccan or Mediterranean locust *Dociopterus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) has evolved in the last 70 years from the use of broad-spectrum insecticides to other measures better adapted to sustainable agriculture. Among those measures, the use of microbial control with entomopathogenic mitosporic ascomycetes (EMAs) can be highlighted. EMAs have the advantage of their contact mode of action and natural occurrence in acridids populations. Strain *Beauveria bassiana* EABb 90/2-Dm, isolated from Mediterranean locust populations in La Serena (Badajoz), and strain *Metarhizium acridum* IMI 330189 have proven acceptable efficacy against the Moroccan or Mediterranean locust in laboratory bioassays and field applications. However, the assessment of the environmental fitness of these two strains to express their maximum virulence in the temperature conditions of the breeding areas and their interaction with the ectothermic condition of these acridids -expressed through thermoregulation and behavioral fever- has been the main objective of this Doctoral Thesis.

In **Chapter II**, *in vitro* experiments measuring conidial germination and hyphal growth either at constant or at fluctuating temperatures simulating thermoregulatory conditions, indicated that strain IMI 330189 had greater fitness at temperatures above 27 °C and the strain EABb 90/2-Dm was better adapted to the temperature range of 10–25 °C. These effects were mirrored *in vivo*, where locust thermoregulation caused a marked reduction in the virulence of EABb 90/2-Dm in comparison to no thermoregulation conditions [dose:  $1 \times 10^4$  spores per insect; average survival time (AST) increased 2.6 times; mortality decreased 23.6%], but only a moderate reduction in the virulence of IMI 330189 [dose:  $1 \times 10^4$  spores per insect; AST increased 1.8 times; no reduction in mortality). Thermal gradient experiments revealed that the strain IMI 330189 induced behavioral fever in *D. maroccanus*, with preferred temperatures approximately 4 °C above the uninfected control, although it only led to a slight reduction in virulence. Strain EABb 90/2-Dm did not induce such a clear behavioral response.

Due to the behavioral thermoregulation of *D. maroccanus*, the use of a co-formulation of strains to effectively overlap their activity in a broader range of temperature conditions has been proposed. The compatibility of the two selected strains in this Doctoral Thesis (EABb 90/2-Dm and IMI 330189) and their effect on the infection process in thermoregulatory conditions have been studied in Chapters III and IV. In **Chapter III**, the results of mixed infections with the strain *M. acridum* and two indigenous strains of *B. bassiana* -isolated from orthopterans in the breeding area of La Serena (Badajoz)- using *Schistocerca gregaria* as model host, showed that the insecticidal activity of a virulent pathogen can be altered by the interaction with other pathogens, even if they are avirulent, due to the environmental conditions (i.e. ambient temperature and thermoregulation) and the order of infection. These interactions could contribute to an

unexpected variability of the efficacy of a control agent, depending on the nature of the resident microbial community.

In **Chapter IV**, the effects of single and mixed infections with *B. bassiana* (EABb 90/2-Dm) and *Metarhizium acridum* (IMI 330189) strains on survival, feeding and reproduction of thermoregulating *D. maroccanus* were evaluated. The locusts were treated with low doses of both fungal pathogens alone and in mixture (total doses for single treatments and combinations =  $1 \times 10^2$  and  $1 \times 10^3$  spores per insect). Although the temperature conditions (thermoregulation, no thermoregulation) had a significant effect on the results of the experiment, the interaction between both strains was additive for the lethal effects. Also, sublethal effects were detected, with a 32-51% in the reduction of *per capita* feeding, 21-53% reduction in the number of egg-pods per female, and 30-65% reduction in the number of fertile eggs per female. Locust fecundity (egg-pods per female) and *per capita* feeding were positively correlated ( $r = 0.783$ ).

The results of this Doctoral Thesis indicated that although the strain *M. acridum* IMI 330189 was better adapted to the high temperatures of locust behavioral thermoregulation, its co-formulation with the strain *B. bassiana* EABb 90/2-Dm would allow for an overlap in their performance according to the temperature conditions. The sublethal effects (feeding and reproduction) should also be considered and added to the insect mortality when evaluating the global effect of the fungal treatments. In the breeding areas of the Iberian Peninsula, where temperature shows large within-day variation during spring-summer, with the use of this co-formulation, the *M. acridum* strain would provide a better control at the time of the day with higher temperatures (above 27 °C) and *B. bassiana* strain would be more effective in the more temperate conditions (10-25 °C). Nonetheless, further studies involving field applications are required to evaluate the ecological impact of this strain combination in the breeding areas of *D. maroccanus*.

**Keywords:** *Dociostaurus maroccanus*, Entomopathogenic mitosporic ascomycetes, *Metarhizium acridum*, *Beauveria bassiana*, locust, thermoregulation, behavioral fever, insect-pathogen interaction, mixed infection, feeding, reproduction.

## **ABREVIATURAS**

AMEs= Ascomicetos Mitospóricos Entomopatógenos

AST= Average Survival Time

*ca.*= circa, aproximadamente

CARMA= The Case-based Range Management Advisor

*cf.*= confer, compárese

EMAs= Entomopathogenic Mitosporic Ascomycetes

FAO = Food and Agriculture Organization

MAPA= Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MST= Median Survival Time

RAMSES = Reconnaissance and Monitoring System of the Environment of *Schistocerca*

REML = Restricted Maximum Likelihood

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

SIG = Sistemas de Información Geográfica

TMS= Tiempo Medio de Supervivencia

UBV= Ultra Bajo Volumen





# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1. Introducción .....	3
2. Las especies de langosta en nuestra fauna.....	5
3. La langosta mediterránea o marroquí, <i>Dociostaurus maroccanus</i> .....	7
3.1. Descripción .....	8
3.2. Ciclo biológico .....	10
3.3. Las fases.....	10
4. Las plagas de langosta en España .....	11
4.1. Gestación de una plaga de langosta .....	12
5. Control de las plagas de langosta .....	13
5.1. Medidas de control que inciden en el medio .....	15
5.2. Medidas de control que inciden en el fitófago.....	15
5.3. Medidas de control que inciden en las relaciones intraespecíficas .....	17
5.4. Medidas de control que inciden en las relaciones interespecíficas .....	18
5.4.1. Los vertebrados depredadores .....	19
5.4.2. Los invertebrados depredadores .....	19
5.4.3. Los invertebrados parásitos y parasitoides.....	20
5.4.4. El control microbiano .....	21
5.4.5. Los hongos entomopatógenos .....	23
6. Control de <i>D. maroccanus</i> con ascomicetos mitosporicos entomopatógenos (AMEs) .....	24
7. Factores que influyen en la eficacia de los hongos AMEs para el control de <i>D. maroccanus</i> .....	26
7.1. Factores que inciden sobre las cepas fúngicas .....	26
7.1.1. Temperatura.....	26
7.1.2. Humedad .....	28
7.1.3. Radiación Solar .....	29

7.2. Factores que inciden sobre el insecto hospedante .....	29
7.2.1. La termorregulación fisiológica .....	30
7.2.2. La termorregulación comportamental.....	31
7.3. Factores relacionados con la interacción entre las cepas fúngicas y el insecto hospedante.....	33
7.3.1. Efectos subletales.....	33
7.3.2. Infecciones mixtas .....	34
8. Objetivos .....	35
9. Referencias.....	36
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>49</b>
<b>Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust <i>Locusta migratoria</i> control.....</b>	<b>51</b>
Abstract .....	51
1. Introduction .....	53
2. Materials and methods .....	55
2.1. Fungal culture and inoculum preparation .....	55
2.2 Insects.....	55
2.3. Conidial germination .....	55
2.4. Hyphal growth .....	56
2.5. Fungal virulence .....	57
2.6. Behavioral fever .....	57
2.7. Statistical analysis.....	58
3. Results .....	60
3.1. Conidial germination .....	60
3.2. Hyphal growth .....	61
3.3. Fungal virulence and behavioral fever .....	65
4. Discussion.....	67
5. Acknowledgements.....	69
6. References.....	70

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>75</b>
<b>Mixed infections and insect-pathogen interactions .....</b>	<b>77</b>
Abstract .....	77
1. Introduction .....	79
2. Materials and methods .....	80
3. Results .....	82
4. Discussion .....	83
5. Acknowledgements .....	87
6. References .....	87
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>91</b>
<b>Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, <i>Doclostaurus maroccanus</i> .....</b>	<b>93</b>
Abstract .....	93
1. Introduction .....	95
2. Materials and methods .....	97
2.1. Fungal culture and inoculum preparation .....	97
2.2. Insects .....	98
2.3. Hyphal growth <i>in vitro</i> .....	98
2.4. Fungal virulence .....	99
2.5. Locust feeding .....	100
2.6. Locust reproduction .....	100
2.7 Statistical analysis .....	100
3. Results .....	103
3.1. Hyphal growth <i>in vitro</i> .....	103
3.2. Fungal virulence .....	105
3.3. Locust feeding .....	107
3.4. Locust reproduction .....	109
4. Discussion .....	110
5. Acknowledgements .....	114

6. References.....	115
<b>CAPÍTULO V: Discusión General .....</b>	<b>119</b>
Referencias.....	125
<b>CAPÍTULO VI: Conclusiones .....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO VII: Anexo .....</b>	<b>133</b>
Curriculum Vitae del Doctorando .....	135

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabla 1.</b> Principales especies de langosta, tamaño y distribución geográfica. ....	5
--	---

### CAPÍTULO II

<b>Table 1.</b> Effect of constant temperature on conidial germination <i>in vitro</i> . Percentage of conidial germination and time for the germination of 50% of conidia (GT <sub>50</sub> ).....	62
---	----

<b>Table 2.</b> Virulence of <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm) to <i>D. maroccanus</i> . ....	65
--	----

### CAPÍTULO IV

<b>Table 1.</b> Virulence of single treatments and combinations of the strains <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm) to <i>D. maroccanus</i> . ....	106
--	-----

<b>Table 2.</b> Effect of single treatments and combinations of the strains <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm) on fecundity and egg fertility of <i>D. maroccanus</i> . ....	111
--	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Fig. 1.</b> Esquema evolutivo de la langosta según la Teoría de las Fases. ....	4
--	---

<b>Fig. 2.</b> <i>Dociostaurus maroccanus</i> y <i>Calliptamus italicus</i> . ....	6
--	---

<b>Fig. 3.</b> Distribución geográfica de <i>D. maroccanus</i> . ....	8
---	---

<b>Fig. 4.</b> Adultos de <i>D. maroccanus</i> procedentes de La Serena (Badajoz) y la isla del Hierro (Canarias). ....	9
---	---

<b>Fig. 5.</b> <i>Decticus albifrons</i> y <i>Platystolus martinezii</i> . ....	20
---	----

<b>Fig. 6.</b> Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos. ....	25
<b>Fig. 7.</b> Cadáveres de <i>D. maroccanus</i> con crecimiento fúngico de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium acridum</i> . ....	26
<b>Fig. 8.</b> Crecimiento fúngico <i>in vitro</i> de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium acridum</i> en condiciones de temperaturas diarias fluctuantes .....	28
<b>Fig. 9.</b> Termorregulación comportamental.....	32

## **CAPÍTULO II**

<b>Fig. 1.</b> <i>In vitro</i> experiments at constant temperatures. Effect of temperature on conidial germination and hyphal growth rate of <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm) and <i>M. acridum</i> (IMI 330189). ....	63
<b>Fig. 2.</b> Experiments at fluctuating temperatures. Conidial germination <i>in vitro</i> , hyphal growth <i>in vitro</i> and insect cumulative survival.....	64
<b>Fig. 3.</b> Thermal gradient preference for insects infected by <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm) and <i>M. acridum</i> (IMI 330189). ....	66

## **CAPÍTULO III**

<b>Fig. 1.</b> Cumulative survival of desert locusts following single and co-infection with three strains of fungal pathogens. ....	83
---	----

## **CAPÍTULO IV**

<b>Fig. 1.</b> <i>In vitro</i> hyphal growth rate of single treatments and combinations of the strains <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm).....	104
<b>Fig. 2.</b> Proportional survival of <i>D. maroccanus</i> infected with single treatments and combinations of the strains <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm). ....	107
<b>Fig. 3.</b> Fecal production per insect and day of <i>D. maroccanus</i> infected with single treatments and combinations of the strains <i>M. acridum</i> (IMI 330189) and <i>B. bassiana</i> (EABb 90/2-Dm). ....	108



## **CAPÍTULO I. Introducción**





## 1. Introducción

El Orden Orthoptera incluye unas 28 000 especies, distribuidas por todas las regiones del globo, a excepción de las más frías, de talla grande, acusada movilidad, hábito alimenticio, en general, fitófago con manifiesta polifagia; pero, aun así, solo un reducido número de ellas interfiere con los intereses del hombre. Unas pertenecen al Suborden Ensifera: grillos, chicharras y cigarrones; otras al Suborden Caelifera: saltamontes y langostas; sin embargo la mayor notoriedad corresponde a estas últimas, como atestiguan los innumerables registros de sus devastaciones ocurridas en el correr de los tiempos históricos en todos los continentes, y la amenaza del azote sigue presente.

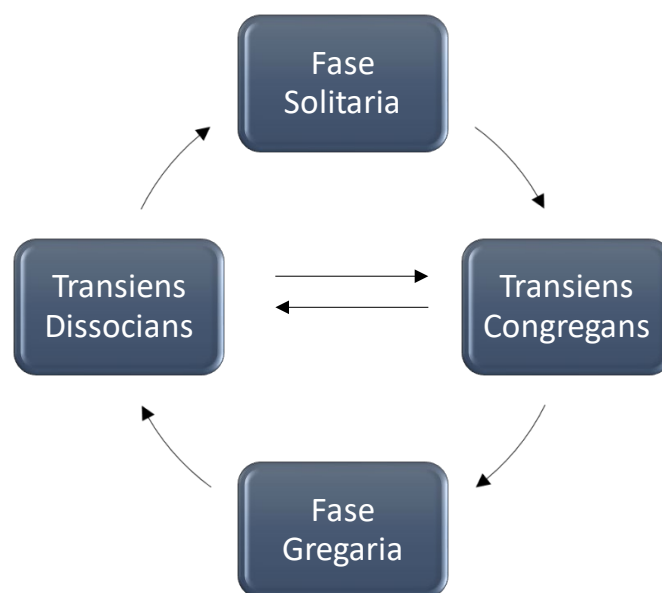
El término **langosta**, patrimonial derivado del lat. *Locusta*, se emplea para nombrar a un limitado número de especies de la familia Acrididae (Orthoptera: Caelifera) que sobresalen por su carácter dañino para la agricultura. Son saltamontes que manifiestan plasticidad morfológica, de comportamiento y tendencia al gregarismo, factor que promueve la ocurrencia de dos formas o fases con diferencias muy acusadas. Una, llamada **fase solitaria**, resulta inocua por ser limitada en efectivos, con tendencia al aislamiento, de comportamiento sedentario; otra, llamada **fase gregaria**, la que explota como plaga, está caracterizada por poblaciones con individuos de exacerbada voracidad con tendencia al agrupamiento y a la emigración por el vuelo.

La transformación es un proceso continuo y reversible a través de fases intermedias (**transiens congregans** = desde la fase solitaria a la fase gregaria y **transiens dissocians** = desde la fase gregaria a la fase solitaria), que depende de factores bióticos y abióticos del medio (Uvarov, 1921) (Fig. 1). El cambio de fase ocurre dentro de las llamadas **zonas de reserva o permanencia** de la especie, en los focos gregarígenos, desde aquí los voraces individuos de la fase gregaria, en cantidad desbordante, parten en vuelo hacia lugares alejados, conocidos como **áreas de invasión** (Eig, 1935; Santiago-Álvarez et al., 2008), donde concluye la manifestación de lo que denominamos plaga de langosta.

El título de langosta apenas supera la veintena de las especies de saltamontes (Pener y Simpson, 2009; Song, 2011), son las que de modo cíclico forman densos grupos, bandas de saltones y enjambres de adultos migrantes en cuyas poblaciones se aprecia el **polifenismo** (del gr. πολύς, polýs, mucho, numeroso; φαίνω, féno, mostrar, brillar) esto es, la presencia de varios fenotipos en respuesta a la densidad, no bajo control genético. El fenómeno se da en al menos seis subfamilias de la familia Acrididae, lo que señala que ha aparecido varias veces, de manera independiente, y es considerado como un carácter

reciente en la evolución de los saltamontes (Song, 2005; 2011); no obstante, la plena expresión del polifenismo de fase tan solo resulta evidente en *Locusta migratoria* (L) y *Locustana pardalina* (Walker) (Oedipodinae) *Schistocerca gregaria* (Forskål), *S. piceifrons* (Walker), *S. cancellata* (Serville) y *Nomadacris septemfasciata* (Serville) (Cyrtacanthacridinae) y en menor medida en *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Gomphocerinae).

Los saltamontes también originan plagas con efectos devastadores pero su acción queda confinada al emplazamiento donde se desencadenan por lo que resultan menos espectaculares (Santiago-Álvarez et al., 2008). Las cíclicas fluctuaciones demográficas de las poblaciones de unas y de otros son de irregular amplitud pero mientras las alarmantes irrupciones de los saltamontes, en la mayoría de los casos, aparecen de manera inadvertida, las de las langostas, en general, se pueden prevenir si se realiza un exhaustivo seguimiento de la transformación de fases en las zonas de reserva o permanencia (Zhang et al., 2019).



**Fig. 1.** Esquema evolutivo de la langosta según la Teoría de las Fases.

Las mayores plagas de langosta recientes incluyen dos invasiones de *S. gregaria* en áreas de África y del sudeste asiático en el periodo 1986-1989 (con un área tratada/protegida de 16.8 millones de hectáreas y un coste de control de 274 millones de US\$) y en el periodo 2003-2005 (13 millones de ha, 500 millones US\$); y dos invasiones de *L. migratoria* en Madagascar en el periodo 1997-2000 (4.2 millones de ha, 50 millones de US\$) y en el periodo 2013-2016 (4.2 millones de ha, 50 millones de US\$) (Zhang et al., 2019).

**Tabla 1.** Principales especies de langosta, tamaño y distribución geográfica (Latchininsky, 2017).

N°	Nombre común	Nombre científico	Longitud del cuerpo (mm) <sup>a</sup>		Distribución geográfica
			♂	♀	
1	Langosta del desierto	<i>Schistocerca gregaria</i> (Forsk.)	45-56	50-65	África, Europa S, Asia SO y Cent.
2	Langosta migratoria	<i>Locusta migratoria</i> (L.)	35-50	45-65	África, Eurasia, Australia
3	Langosta marroquí o mediterránea	<i>Dociostaurus maroccanus</i> (Thunb.)	15-30	20-40	África N., Europa, Asia Cent.
4	Langosta italiana	<i>Calliptamus italicus</i> (L.)	15-30	20-42	Europa, Asia
5	Langosta roja	<i>Nomadacris septemfasciata</i> (Aud-Serv)	35-50	50-62	África
6	Langosta marrón	<i>Locustana parladina</i> (Walk.)	35-45	40-65	África S.
7	Langosta australiana	<i>Chortoicetes terminifera</i> (Walk.)	20-30	30-45	Australia
8	Langosta pájaro americana	<i>Schistocerca americana</i> (Drur.)	40-50	45-56	América S. y Cent.
9	Langosta de Bombay	<i>Nomadacris sucinta</i> (Joh.)	40-50	55-65	Asia SE.
10	Langosta de las Rocosas <sup>b</sup>	<i>Melanoplus spretus</i> (Wals.)	15-25	20-30	América N.

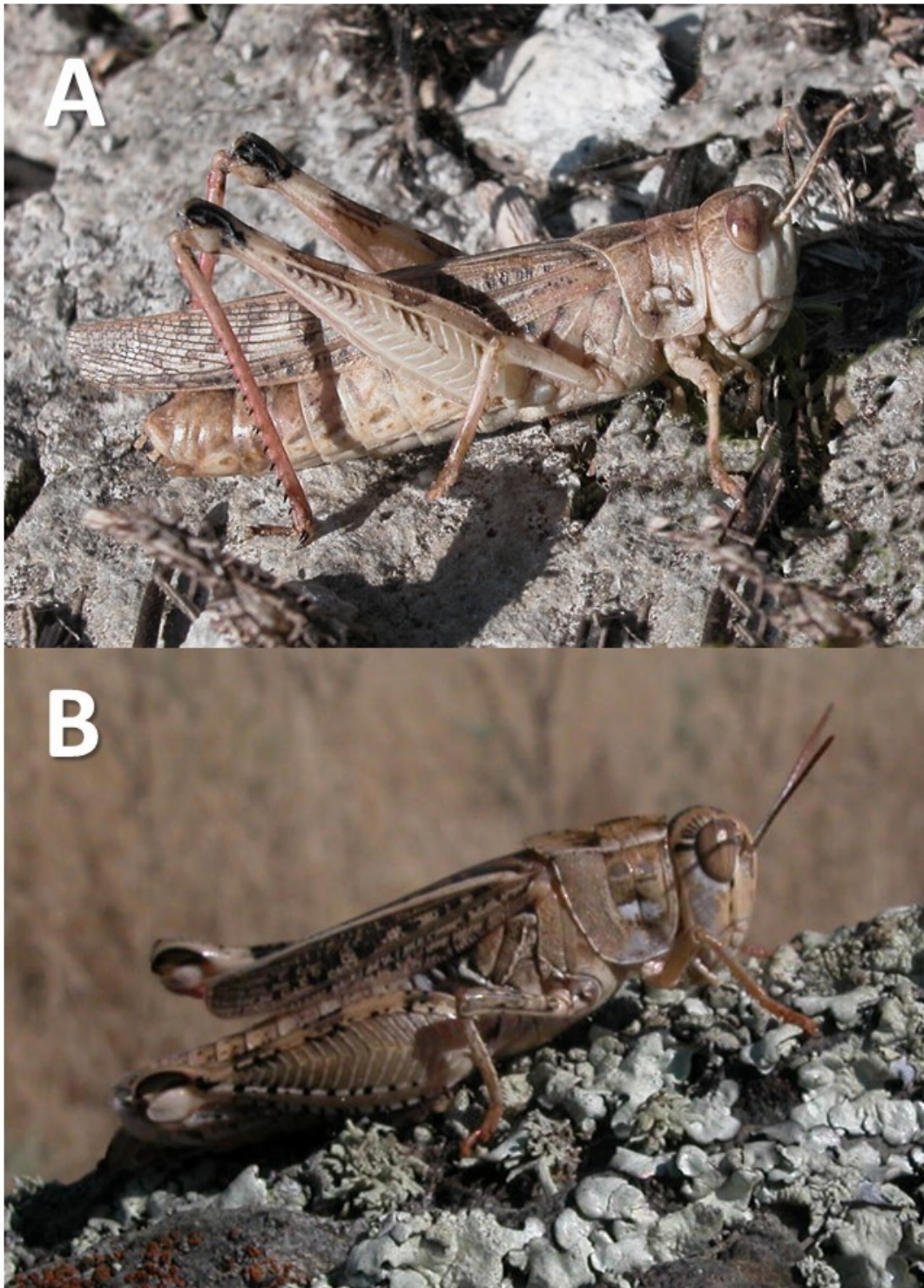
<sup>a</sup>Medida desde el extremo de la cabeza al extremo del abdomen

<sup>b</sup>Extinguida a principios del siglo XX

## 2. Las especies de langosta en nuestra fauna

La fauna española de ortópteros muestra gran diversidad, consecuencia de la heterogeneidad geográfica y climática observables en la Península Ibérica así como por el aislamiento y localización entre Europa y África. Se han identificado unas 350 especies de ortópteros, de las que el 56% corresponden al Suborden Ensifera (Pascual y Barranco, 2013) y el 44% al Suborden Caelifera (Presa et al., 2007), que pertenecen a más de 140 géneros de distribución paleártica, atlántica, mediterránea y etíope, siendo algunos de ellos cosmopolitas y otros endémicos (Gangwere y Morales-Agacino, 1970; Herrera, 1982).

El conjunto engloba cuatro especies consideradas langostas, cada una pertenece a una subfamilia de la familia Acrididae (Pener y Simpson, 2009; Song, 2005; 2011): la “langosta italiana”, *Calliptamus italicus* (L.) (Calliptaminae); la “langosta común”, “de la cruz”, “indígena”, “marroquí” o “mediterránea”, *Dociostaurus maroccanus*; la “langosta emigrante”, *Locusta migratoria* y la “langosta del desierto”, *Schistocerca gregaria*.



**Fig. 2.** A) *Dociostaurus maroccanus*, B) *Calliptamus italicus*.

La especie *D. maroccanus* (Fig. 2A) presente tanto en la península como en el archipiélago canario es la que reviste mayor importancia económica (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993); *L. migratoria*, a pesar de encontrarse en las faunas íbero-baleares (Gangwere y Llorrente, 1992; Gangwere y Morales-Agacino, 1970; Presa et al., 2007) y canaria (Bland et al., 1996), no consta que presente comportamiento de langosta, sino más bien de saltamontes, se trata de la forma *danica* o fase solitaria (Cañizo, 1939). El *C. italicus* (Fig. 2B) inculpa de ocasionar plagas en la provincia de Albacete (Cañizo, 1939), tiene pendiente la revisión de su distribución peninsular y la confirmación de su tendencia al gregarismo y cambio de fases (Santiago-Álvarez et al., 2008).

En cuanto a *S. gregaria*, “langosta del desierto”, ahora excluida de la fauna íbero-baleares (Presa et al., 2007) pero no de la canaria (Bland et al., 1996), bandas de adultos de la fase gregaria invaden ocasionalmente desde África las Islas Canarias, con consecuencias devastadoras (Cañizo, 1954) o sin causar tantos daños, como ocurrió en el año 2004; raramente lo hacen a la Península, donde no consta que hayan causado estragos (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993). La invasión canaria suele suceder, si durante el vuelo de emigración, iniciado en el sur de Mauritania, en dirección al Norte del continente para de ahí dirigirse al Este, se alteran las condiciones meteorológicas normales (Santiago-Álvarez et al., 2008).

### **3. La langosta mediterránea o marroquí, *Dociostaurus maroccanus***

La langosta mediterránea está considerada como una de las mayores plagas de la agricultura (Anónimo, 1982) dado su alto grado de polifagia, que abarca unas 150 especies pertenecientes a 33 familias botánicas, entre las que se encuentran aproximadamente 50 especies cultivadas (Latchininsky y Launois-Luong, 1992; Moreno-Márquez, 1944).

Esta especie, propia de la región Paleártica, ocupa una franja de aproximadamente 10 000 km en sentido longitudinal y 2 000 km en el latitudinal, asentada en los tres continentes del Viejo Mundo (Fig. 3), con límite occidental en los Archipiélagos Atlánticos de Canarias y Madeira, circunda y rebasa el Mediterráneo hasta Afganistán y el sur de Kazakstán, su límite oriental (Latchininsky, 1998; Uvarov, 1977).

En esta zona, consecuencia de estrictos requerimientos ecológicos, las poblaciones de *D. maroccanus* se distribuyen de modo discontinuo por superficies de extensión variable, con altitudes entre 400 y 800 m, topografía irregular que no permite el uso

agrícola del territorio, y determina la existencia de suelos compactos, con un tapiz vegetal, estepa semiárida o semidesértica donde abundan pequeñas gramíneas anuales.

Estos lugares son las zonas de reserva o permanencia en las que el régimen pluviométrico de carácter irregular, 300 a 500 mm anuales, incide en el espesor y uniformidad de la cubierta vegetal cuya asociación de especies varía de unas áreas geográficas a otras, aunque existe una gramínea, *Poa bulbosa*, que es común a todas ellas (Moreno-Márquez, 1944; Uvarov, 1977). Esta vegetación brota muy pronto después de las primeras lluvias primaverales, desaparece casi por completo al final de la estación y el aspecto de las mismas localizaciones en verano es un mosaico con manchas desnudas que ávidamente buscan las hembras para realizar la puesta.

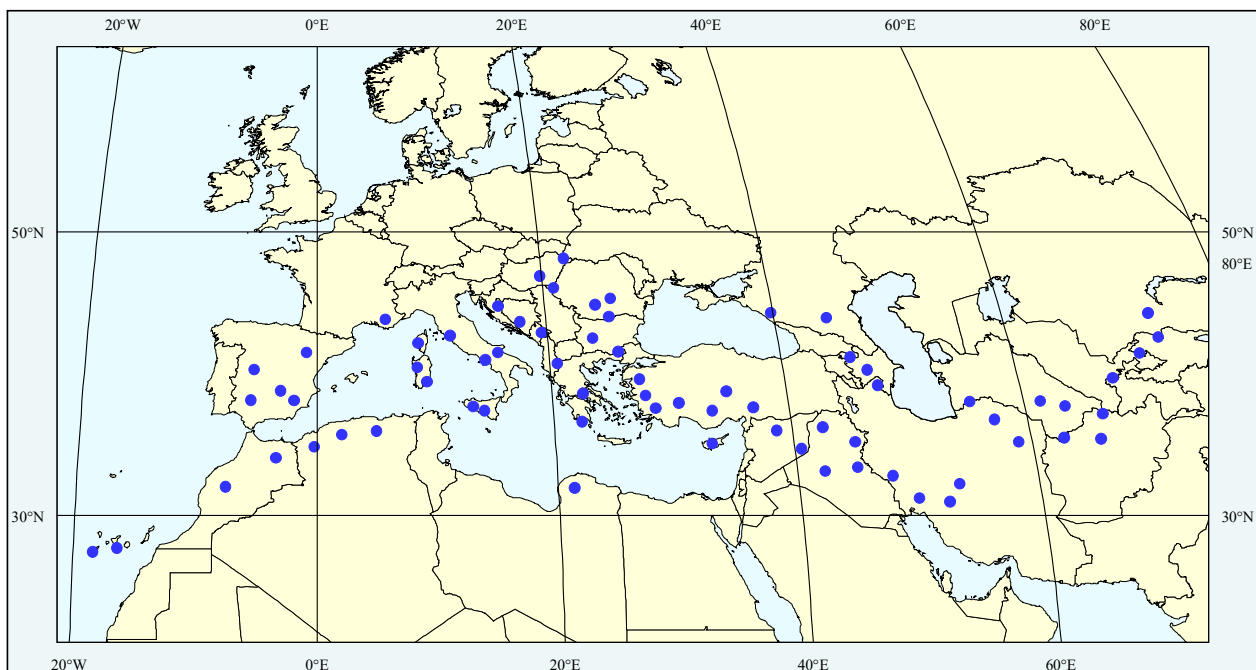


Fig. 3. Distribución geográfica de *D. maroccanus* (de Latchininsky, 1998, modificado).

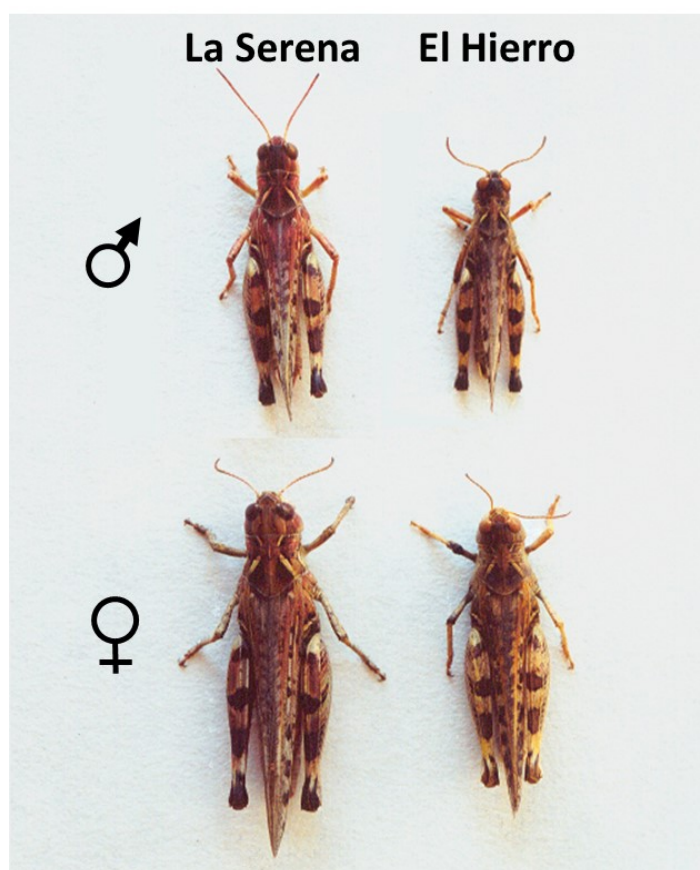
### 3.1. Descripción

El **huevo** tiene forma cilíndrica, alargado, cóncavo-convexo y algo achatado en los extremos; el corion opaco y de color amarillo-carnoso; miden de 4.4 a 6 mm de longitud y de 1 a 2 de anchura. Siempre encerrados en la **ooteca** o **canuto** de forma cilíndrico-curvada, con la extremidad inferior redondeada y la superior ligeramente cóncava cubierta por el opérculo (Morales-Agacino, 1941). En la eclosión aparece la **prelarva**, **larva neonata** o **larva vermiforme** de 0.72 mm de longitud y color tierra clara, a la que le siguen cinco estadios de ninfa, la primera o **mosquito**, mide 4.6-5.4 mm, tiene color general



oscuro, casi negro y antenas de 13 artejos, las segunda y tercera o **moscas**, miden 6.1-9.0 mm y 9.7-13.0 mm, tienen color general castaño oscuro y antenas con 15-17 y 20 artejos respectivamente. La ninfa de cuarta edad o **saltón** tiene color castaño y una longitud de 12.5-21.0 mm y las antenas con 21-23 artejos. La de quinta edad, también **saltón**, tiene color castaño tirando a rosa térreo y mide 17.0-28.0 mm y antenas con 23-24 artejos (Morales-Agacino, 1941).

Los **adultos** tienen una longitud de 20-38 mm, la hembra, y 17-30 mm, el macho, color general gris pardusco, con manchas sombrías: en el pronoto una marcada quilla central y una X (o cruz de san Andrés) formada por dos estrechas bandas blanco amarillentas; élitros en ambos sexos más largos que el abdomen, algo hialinos, con mancha y puntos oscuros; alas del segundo par hialinas ligeramente ahumadas; fémures de las patas posteriores con tres manchas oscuras, ápice negruzco y las tibias rojas con una mancha amarilla en la base (Morales-Agacino, 1941). Existe variabilidad en el tamaño de los adultos, con aparentes diferencias entre poblaciones de distinto origen geográfico (Fig. 4).



**Fig. 4.** Adultos de *D. maroccanus* procedentes de La Serena (Badajoz) y la isla del Hierro (Canarias).



### 3.2. Ciclo biológico

*D. maroccanus* es una especie univoltina por toda el área de distribución, con un ciclo vital que se desenvuelve en dos etapas, la hipogea, o desarrollo embrionario, que dura de 9 a 10 meses (Bodenheimer y Shulov, 1951; Merton, 1959; Santiago-Álvarez et al., 2003). La morfogénesis del embrión, que consta de 20 estados arbitrariamente definidos por Bodenheimer y Shulov (1951), transcurre en dos fases, la anatrepsis (estados I a XIV) y la catatrepsis (estados XV a XX), entre las que se intercala una parada ecológica, la diapausa en el estado XIV.

La anatrepsis arranca a los pocos días de realizar la puesta las hembras al final de la primavera (Bodenheimer y Shulov, 1951; Santiago-Álvarez et al., 2003), prosigue en pleno verano sin ningún tipo de interrupción siempre que la temperatura del suelo no rebase el óptimo situado a 25 °C -en caso contrario se detiene por quiescencia (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 1999; 2000b)- para concluir a principios del otoño en el estado XIV, el de diapausa. Esta requiere un período de exposición, más o menos prolongado, a temperaturas entre 8 y 16 °C (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 1999; 2000b) para reiniciar la morfogénesis de la segunda fase del embrión o catatrepsis (estados XV a XX), lo que ocurre al inicio del invierno. El progreso de la misma está en relación directa con la temperatura, y la eclosión ocurre al comienzo de la primavera (entre el 12 de marzo y el 12 de abril), cuando el embrión ha acumulado una cantidad de grados-día determinada (Santiago-Álvarez et al., 2003) y siempre que la humedad del suelo esté próxima a la capacidad de campo. El descubrimiento de la relación que guarda la evolución del embrión con la temperatura, ha permitido por primera vez la cría de la especie en cautividad (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2001c).

El desarrollo postembrionario transcurre entre los meses de marzo y mayo, en función de la fecha del avivamiento y de la temperatura diaria. Los adultos hacen su aparición a finales de mayo, y su presencia en campo se prolonga hasta primeros de julio, lo que supone una longevidad de 35 a 40 días, período durante el cual las hembras realizan la puesta consistente en dos canutos espaciados en el tiempo (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2001a).

### 3.3. Las fases

El polimorfismo de fase es menos evidente en esta especie que en las otras langostas, así, en cuanto al color no se observan cambios tan llamativos como en “la langosta del

desierto” o en “la emigrante”. En esta especie la caracterización de las fases se realiza por morfometría. Los adultos de la fase gregaria son mayores que los de la solitaria, al contrario de lo que ocurre con otras especies; su mayor tamaño se refleja en las dimensiones de las alas, élitros y fémures posteriores. La determinación biométrica establecida, el **Índice élitro-femoral** (E/F) calculado para cada uno de los sexos, esto es el ratio entre la longitud del élitro o tegmen y la del fémur de las patas posteriores, es mayor en la fase gregaria (macho = 1.74; hembra = 1.72) que en la solitaria (macho = 1.49; hembra = 1.58) (Moreno-Márquez, 1942). Los machos son normalmente menores que las hembras en ambas fases, pero las diferencias de tamaño entre sexos se acentúan en las solitarias.

En lo referente al comportamiento, se dan las mismas características que en las otras especies. Los individuos de la fase solitaria tienden al aislamiento y sedentarismo, esto es, una distribución uniforme por el territorio infestado; por el contrario los de la gregaria se reúnen en grupos densos, primero constituyen **manchones** (moscas, 2ª y 3ª edad), luego **cordones** (saltones, 4ª y 5ª edad) para concluir en **bandos** que no se desintegran cuando aparecen los adultos que emigran por el vuelo.

En cuanto a la fecundidad potencial de las hembras, en esta especie a diferencia de las otras citadas, es mayor la de las gregarias que las solitarias: el número de ovariolos por ovario varía entre 31 y 36, siendo los valores más altos aquellos para la fase gregaria (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2001a). En lo que respecta al comportamiento de puesta las hembras de *D. maroccanus* son muy exigentes en cuanto al lugar apropiado para hacerla, requieren suelos compactos, desprovistos de vegetación y a salvo de encharcamientos. Los rodales de puesta acogen la oviposición de varias hembras, atraídas por estímulos varios, aunque la densidad de canutos será mayor o menor dependiendo de la fase. Así, las hembras de fase solitaria la dispersan más que las hembras de la fase gregaria. En este último caso se dan las mayores densidades, de hasta 1 000 canutos por m<sup>2</sup> (Benlloch y Cañizo, 1941).

#### 4. Las plagas de langosta en España

La Península y el Archipiélago Canario son los dos territorios nacionales que soportan plagas de langosta. La Península Ibérica ha padecido estas plagas con acusada frecuencia desde tiempos remotos. La primera de la que se tiene noticia documental ocurrió en el año 846 de nuestra era (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993) y la última al finalizar la guerra civil (Peña, 1941; 1942).

Las plagas de langosta en España fueron adjudicadas científicamente al acrídido gonfocerino, *Doclostaurus maroccanus*, “langosta común”, “mediterránea” o “marroquí”, presente en las ortopterofaunas peninsular (Gangwere y Morales-Agacino, 1970) y canaria (Bland et al., 1996), sin ningún género de dudas, por D. Ignacio Bolívar (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993), en el último tercio del siglo XIX (Bolívar, 1876). En la actualidad, las plagas de langosta han perdido la relevancia del pasado porque se mantiene activado un sistema de prevención, eficaz, aunque precisa de adaptación a las nuevas exigencias medioambientales (Anónimo, 2004-2007).

#### 4.1. Gestación de una plaga de langosta

La ocurrencia de las plagas de *D. maroccanus*, cuyo carácter cíclico es constatado por el registro histórico (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993), fue atribuida a aspectos no siempre basados en el conocimiento científico, hasta que se promulgó la Teoría de las Fases en el primer tercio del s. XX (Uvarov, 1921), y se constató el cumplimiento de la misma por parte de la langosta mediterránea o marroquí (Cañizo y Moreno-Márquez, 1940; Moreno-Márquez, 1942), por lo que las inesperadas bandas de adultos que llegaban volando a los cultivos eran individuos en fase gregaria procedentes de alguna zona de reserva.

Una plaga de langosta sobreviene en dos etapas, la primera tiene lugar en terrenos poco aptos para el uso agrícola, donde nace un exorbitante número de ninfas, que arruina el tapiz vegetal antes de alcanzar el estado adulto. Esto ocurre en las áreas de permanencia, bien delimitadas y diseminadas por todo el territorio nacional, muy en particular en la parte meridional; las cuales, aunque con leves variaciones, han mantenido fijeza a lo largo de los siglos (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993).

Las zonas de reserva o permanencia peninsulares fueron reconocidas y delimitadas (Cañizo y Moreno-Márquez, 1940) en Extremadura (**La Serena**, Badajoz; **Llanos de Cáceres y Trujillo**, Cáceres), Andalucía (**Valle de los Pedroches**, Córdoba), La Mancha (**Valle de Alcudia**, Ciudad Real) y Aragón (**Los Monegros**; Huesca-Zaragoza); en el archipiélago canario, *D. maroccanus* está presente en todas las islas que componen la provincia de Tenerife, y en Gran Canaria (Anónimo, 1933-54; Bland et al., 1996), las de mayores altitudes.

El régimen pluviométrico en las zonas de reserva juega un papel importante en la dinámica poblacional de *D. maroccanus*. Así, cuando se suceden años con lluvias oportunas y de cuantía conveniente, los individuos se dispersan por la extensa superficie cubierta de

---

abundante vegetación. Por el contrario, cuando se suceden años de sequía o de lluvias escasas, los individuos se concentran en las zonas con vegetación favorable y, en consecuencia, se propicia la formación de la fase gregaria (Cañizo, 1942). Desde la aparición de las moscas ( $N_2$  y  $N_3$ ), se forman **manchones**, luego por coalescencia de varios, ya saltones ( $N_4$  y  $N_5$ ), pasan a **cordones**, sin desagregarse al llegar a adultos, componen el **bando volador**, que realizará los **vuelos de emigración** (Cañizo y Moreno-Márquez, 1940) cuya amplitud se cifra en 70 a 100 km, rara vez superando los 200 km (Latchininsky, 1998).

Ahora da comienzo la segunda etapa que transcurre en tierras feraces, y distantes, a donde emigraron por el vuelo las miríadas de adultos, con voracidad exacerbada, que las dejarán completamente devastadas. Los individuos en fase gregaria originan las plagas de langosta, pero éstos no aparecen de forma brusca, sino de modo continuo, a través de fases intermedias, lo que requiere la acción ininterrumpida de los factores que inducen a la transformación durante un número variable de generaciones cuya cadencia es anual.

Cuando la plaga remite, la superficie ocupada por la especie retrocede dramáticamente y las únicas poblaciones notables vuelven a ser las que se encuentran en las áreas de reserva. A menudo, durante varios años consecutivos, la especie no pasa de ser un amenazante miembro de la acridofauna local (Santiago-Álvarez et al., 2008).

## 5. Control de las plagas de langosta

Los programas de control de las distintas especies de langosta eran en el pasado en su mayoría curativos y, aunque todavía estas medidas son necesarias, el reconocimiento de los trastornos causados por las mismas ha cambiado el paradigma hacia un **control fundamentalmente preventivo**. Estas estrategias son más racionales, efectivas, económicamente viables y respetuosas con el medio (Zhang et al., 2019). Las medidas de control preventivo tienen como objetivo tratar el mayor número posible de focos de langosta en las áreas de reserva o permanencia antes de la formación de la plaga y que se produzcan daños en las zonas de cultivo (Uvarov, 1977).

Un componente crítico del control preventivo es la rápida localización de los focos con alta infestación, como focos de avivamiento o, posteriormente, focos con alta densidad de ninfas o adultos. Aunque evitar la formación de la fase gregaria es el principal objetivo del control preventivo, la utilización de herramientas de genética de poblaciones, como marcadores moleculares, ha demostrado igualmente la importancia de la fase solitaria en la dinámica de poblaciones en varias especies de langostas. Los individuos en

la fase solitaria son mucho más móviles y abundantes que lo que se pensaba, y en el caso de la langosta del desierto, las migraciones de la fase solitaria son una adaptación clave en ambientes hostiles (Chapuis et al., 2014).

Las prospecciones de focos de langosta en fase solitaria son importantes para detectar los estados iniciales que pueden derivar en una plaga. Los sistemas de soporte a la información consisten generalmente en **sistemas de información geográfica (SIG)** que combinan numerosos tipos de datos sobre las langostas, su hábitat y condiciones climáticas que determinan cuándo y dónde deben realizarse las prospecciones de las ninfas y adultos y proporcionan consejo sobre la mejor estrategia de control (Zhang et al., 2019). Ejemplo de programas de control de langostas y saltamontes basados en SIG son el usado por la FAO, **RAMSES** (Reconnaissance and Monitoring System of the Environment of *Schistocerca*), y el utilizado en el oeste de los Estados Unidos, **CARMA** (The Case-based Range Management Advisor) (Cressman, 2013; Hastings et al., 2009).

En el caso de *D. maroccanus*, las actuaciones para contener las plagas se realizan de modo principal en las zonas de reserva o permanencia, que están claramente delimitadas, ubicadas en ecosistemas de indudable valor ecológico y además soportan una actividad pecuaria nada desdeñable para la economía regional y nacional. El control de las poblaciones de langosta es competencia de la Administración y está regulado por **Real Decreto 1507/2003, de 28 de noviembre**, por el que se establece el **Programa Nacional de Control de las Plagas de Langosta y otros Ortópteros**. Adicionalmente, algunas de las comunidades autónomas donde es mayor la problemática, emiten normativa más específica (p. ej. Orden de 28 de febrero de 2018 por la que se establecen normas de control integrado contra la langosta mediterránea para la campaña 2018, Junta de Extremadura). Este modo de proceder, restablecido al finalizar la guerra civil (Peña, 1941; 1942), ha privado de notoriedad a las plagas de langosta en España no sin un apreciable coste económico anual, justificable no solo en base a los daños reales sino también al enorme daño potencial que representan las bandas de adultos emigrantes (Anónimo, 2004-2007).

En España se trataron con insecticidas para el control de langostas y ortópteros asociados una media anual de 162 000 ha entre los años 2004 y 2007, con un coste estimado de 1 860 000 € por año (Anónimo 2004-2007). En otros países del área de distribución de la especie los tratamientos de grandes áreas, con el consiguiente coste económico y ambiental, han sido comunes en las últimas décadas (p. ej. 650 000 ha en

---

Uzbekistán en 1984; 219 000 ha en Turkmenistán en 1984; 124 000 ha en Marruecos en 1996) (Latchininsky, 1998).

### 5.1. Medidas de control que inciden en el medio

El tipo de suelo constituye el factor más limitante para la colonización de *D. maroccanus*. Las hembras solo realizan la oviposición en suelos compactos, sin alterar, con alto contenido en arcilla (Arias et al., 1994; Latchininsky, 1998; Moreno-Márquez, 1943). La **roturación de tierras** parece ser catastrófica para la langosta mediterránea. En muchas regiones, la agricultura intensiva ha causado la completa desaparición de la especie (Latchininsky, 1998). La roturación de tierras era frecuentemente recomendada en el pasado como medida de control, realizándose en invierno, con el objetivo de la **destrucción de las ootecas** (Moreno-Márquez, 1940; Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993). No existe una coincidencia de pareceres sobre si resultan más beneficiosa las labores profundas o superficiales; las primeras entierran las ootecas para que no puedan eclosionar, las últimas las sacan a la superficie quedando expuestas a la acción destructiva de las heladas, desecación y aves acridípagas (Alfaro, 2005). No obstante, esta medida no está exenta de dificultades y controversias, de una parte, la existencia de suelos poco profundos, y con afloramientos de la roca madre, como los del área de reserva de La Serena en Extremadura, que limitan su aplicación; de la otra, los aspectos económicos y medioambientales que desaconsejan la estrategia en grandes áreas.

### 5.2. Medidas de control que inciden en el fitófago

Existen varias medidas que inciden directamente en el insecto, como la ya mencionada **roturación de tierras** para la destrucción de las ootecas. Debido a que esta especie realiza las puestas generalmente en zonas de poco suelo y con abundancia de piedras, el laboreo mecánico resultaba complicado en la práctica. También se ha tratado de reducir las poblaciones de la especie mediante **trochas, fuego**, y hasta el **golpeo** de los insectos (Alfaro, 2005; Dobson, 2001; Moreno-Márquez, 1940; Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993). Estas medidas, aunque empleadas en el pasado, han sido utilizadas como último recurso para el control de las langostas incluso a finales del siglo XX. Como ejemplo, podemos citar el control de *D. maroccanus* en el norte de Afganistán, donde en 1996 se acabaron los fondos que habían mantenido los programas de emergencia para luchar contra esta plaga, que se habían desarrollado desde 1990 y estaban basados en el empleo de insecticidas. Los países donantes fueron reticentes a

mantener la compra de insecticidas en un país al borde de la guerra, como consecuencia, los métodos mecánicos usados por generaciones de agricultores afganos fueron reintroducidos. Las medidas de control mecánico consistieron en el monitoreo de rodales de puesta en la primavera para detectar el avivamiento y la movilización de las comunidades para cavar trochas y así evitar el avance de los saltones. Entre los años 1996 y 1999 se controlaron unas 30 000 ha con un ahorro de 300 000 US\$ (Stride et al., 2003).

La mayoría de los programas para el control de langostas y saltamontes todavía emplean como medida principal **insecticidas químicos**. Aunque los preparados en forma de polvo mojable son utilizados dada la disponibilidad de los equipos, las **aplicaciones en ultra bajo volumen (UBV)** –con formulaciones normalmente en aceite- bien terrestres o aéreas son el método principal de aplicación, al ser requeridos volúmenes de caldo muy inferiores a los anteriores. Los insecticidas recomendados para el control de langostas y saltamontes, con sus ventajas e inconvenientes, están detallados en los boletines de FAO (<http://www.fao.org/ag/LOCUSTS/en/publicat/gl/gl/index.html>).

Las aplicaciones pueden hacerse para cubrir la zona total a tratar o en franjas, en cuyo caso, se realizan aplicaciones aéreas separadas unos 300-500 m de distancia, utilizadas comúnmente contra la langosta del desierto y langosta australiana. En este tipo de aplicaciones, los insectos van desplazándose e impregnándose del insecticida. En los Estados Unidos se realizan aplicaciones similares con áreas reducidas de tratamiento, alternando bandas de 5 a 30 m con otras zonas similares sin tratar. En ambos casos, el objetivo de las aplicaciones es facilitar la presencia de áreas de refugio, zonas sin tratar, para artrópodos no diana incluyendo parásitos y depredadores (Zhang et al., 2019).

En el caso de ***D. maroccanus* en España**, el uso de insecticidas químicos se realiza de un modo racional dentro de programas de **control preventivo**. Estos programas, con los correctos métodos de prospección, permiten la localización y tratamiento de rodales de puesta, focos de avivamiento, o focos con alta densidad de ninfas o adultos, impidiendo la transición a la fase gregaria. La adopción del sistema ha supuesto una enorme disminución de los costes económico y social porque la aplicación de las medidas de control se limita a zonas específicas de las áreas de reserva y no alcanzan a las zonas de invasión (Anónimo, 2004-2007).

Los insecticidas más utilizados en las últimas décadas, muchos de ellos ya prohibidos en España, han sido organofosforados (malatión, fenitotrión, clorpirifos) y, posteriormente, inhibidores de la síntesis de quitina (diflubenzurón, flufenoxurón). En la actualidad, las

---

sustancias activas registradas en España para el control de langostas y ortópteros asociados son azadiractina, clorpirifos, deltametrín y lambda cihalotrín (MAPA, 2019).

Sin embargo, aunque la utilización de insecticidas para el control de langostas y saltamontes se realiza de un modo cada vez más racional, intentando minimizar el impacto en áreas de valor ecológico, aún presenta un gran número de potenciales efectos adversos sobre la salud humana, organismos no diana y resto del ecosistema (Everts y Ba, 1997; Lockwood et al., 2002; Peveling, 2001; Smith et al., 2006).

### 5.3. Medidas de control que inciden en las relaciones intraespecíficas

En las especies de langostas, aunque la transición desde la fase solitaria a la fase gregaria está determinada principalmente por la densidad de individuos, existen diversos mecanismos de interacción intraespecíficos que afectan a la gregarización y la consecuente formación de una plaga. Estos mecanismos incluyen **estímulos visuales y táctiles, feromonas, factores alimenticios y la historia previa de fase** (Cullen et al., 2017; Hassanali et al., 2005; Zhang et al., 2019). Los efectos de las **feromonas** más estudiados son aquellos asociados a la agregación de individuos, maduración sincronizada, ovoposición conjunta y transferencia materna de los caracteres de fase (Hassanali et al., 2005).

Parece poco probable que, al contrario que otras plagas, en el caso de langostas y saltamontes las feromonas puedan ser utilizadas para la interrupción de la cópula o trampeo masivo. Sin embargo, las feromonas sexuales podrían ser utilizadas en trampas de luz o color para monitorizar poblaciones en el área de reserva y contaminar los individuos del sexo atraído con patógenos que serían dispersados más tarde en el resto de la población. Similar práctica podría realizarse con las feromonas de agrupación para la oviposición o las feromonas de agregación de individuos, siempre que esas feromonas puedan ser detectadas desde la distancia (El Bashir, 1997).

Otra alternativa más plausible es la aplicación de feromonas que puedan tener un efecto anti-agregante para forzar a los individuos a un estado solitario (El Bashir, 1997). Con este propósito, el **fenilacetónitrilo** es uno de los candidatos más estudiados para el control de langostas. En la especie *S. gregaria* existe un complejo de feromonas para la agregación, una específica para ninfas y otra para adultos. La feromona para adultos es un complejo de químicos entre los que destaca el fenilacetónitrilo, compuesto predominante en la fracción volátil de las heces de los adultos macho maduros, pero a la



que responden ambos sexos (Hassanali et al., 2005). Aunque el fenilacetoneitrilo estimula la agregación en adultos, sin embargo ha mostrado un **efecto de promoción de la fase solitaria para ninfas** (Bashir y Hassanali, 2010). Específicamente, las ninfas en fase gregaria expuestas al fenilacetoneitrilo ven interrumpida la comunicación olfativa entre individuos, volviéndose hiperactivas, mostrando alto grado de canibalismo y los individuos que sobreviven fueron cambiando a la fase solitaria (Bashir et al., 2016; Bashir y Hassanali, 2010).

En el caso de *D. maroccanus*, se ha comprobado la existencia de una **feromona sexual** (Furstenau et al., 2013; Guerrero et al., 2019). Estos estudios han identificado al **fital** como posible componente de la feromona sexual de la langosta mediterránea. El fital es producido en alas y patas de machos sexualmente maduros y atrae tanto a machos como a hembras. Este compuesto es específico de *D. maroccanus*, ya que no se ha detectado en otros acrídidos que comparten el mismo hábitat como el congénico *D. jagoi* Soltani ni en el caliptamino *Calliptamus wattenwylanus* Pantel. Aunque se ha avanzado en las últimas décadas en la comprensión del efecto de feromonas y otros semioquímicos en el comportamiento de las langostas, su posible utilización práctica para la monitorización y control de las poblaciones de estas especies necesita ser clarificado (Zhang et al., 2019).

#### **5.4. Medidas de control que inciden en las relaciones interespecíficas**

El control natural que ejercen los diversos enemigos entomófagos, vertebrados e invertebrados y entomopatógenos de la langosta mediterránea, *D. maroccanus*, no es suficiente para evitar la transformación de fases (Latchininsky, 1998; Latchininsky y Launois-Luong, 1992; Santiago-Álvarez et al., 2008). Sin embargo, la fácil localización y delimitación de las zonas de reserva y focos gregarígenos (Moreno-Márquez, 1946), favorece el aprovechamiento del potencial que encierran para este fin, el conjunto y cada una en particular, por las cuatro estrategias siguientes: a) **conservación**, manipulación del medio para favorecer que los enemigos naturales aumenten en número, b) **inoculación**, suelta de enemigos naturales para que se multipliquen y controlen al insecto durante un período de tiempo, no permanentemente, c) **inundación**, suelta de organismos para alcanzar el control por este modo y d) el control biológico **clásico**, suelta de un agente natural no indígena para su establecimiento en el medio y control permanente (Eilenberg et al., 2001).

#### 5.4.1. Los vertebrados depredadores

Los estados postembrionarios de *D. maroccanus* son pasto de aves, mamíferos, anfibios y reptiles (Latchininsky y Launois-Luong, 1992), depredadores generalistas cuya acción en el control natural de las poblaciones resulta insignificante. Las aves insectívoras están consideradas enemigos de la langosta desde muy antiguo (Vázquez-Lesmes y Santiago-Álvarez, 1993), no faltan en la rica **avifauna** española especies **devoradoras de canutos, ninfas y adultos** de *D. maroccanus* (Cañizo, 1939; Navarro, 1901; Navas, 1922) pero por no ser específica su acción son desestimadas como agentes de control de las plagas de langosta (Santiago-Álvarez et al., 2008).

#### 5.4.2. Los invertebrados depredadores

Las larvas de un conjunto de especies de insectos, **dípteros** de la familia Bombyliidae, *Cytherea obscura* (F.), *Cytherea (Glossista) infuscata* (Meigen), (Alfaro, 2005; Cañizo, 1943; Hernández-Crespo, 1993; Peña, 1941) y *Systoechus sulfureus* (Mikan) (Benlloch y Cañizo, 1941; Navarro, 1923; Peña, 1941); **coleópteros** de la familia Cleridae, *Trichodes amnios* Fabricius (en Benlloch y Cañizo, 1941; Cañizo, 1939; 1956; Lapazarán, 1925; Navarro, 1901; Peña, 1941) ahora *T. flavocinctus* Spin (Hernández-Crespo, 1993), y de la familia Meloidae, *Mylabris quadripunctata* (L.), *M. duodecimpunctata* Olivier etc. (Alfaro, 2005; Cañizo, 1956) y *M. variabilis* Pallas (Navarro, 1923), viven a expensas de los huevos contenidos en los canutos de *D. maroccanus*.

Su incidencia es cuantificable aunque varía en el tiempo y en el espacio. La estrategia de control biológico por conservación es la única aplicable a estos depredadores de huevos, que son especies univoltinas (Benlloch y Cañizo, 1941; Cañizo, 1943; Hernández-Crespo, 1993), y que presentan enormes dificultades para obtener en cautividad las grandes cantidades de adultos para la suelta en campo donde, además, su actividad de puesta queda a merced de las disponibilidades de polen. Los estados postembrionarios son depredados por otros **ortópteros**, como *Decticus albifrons* (F.) y *Platystolus martinezii* Bolívar (Hernández-Crespo, 1993) (Fig. 5), cazados por adultos de **himenópteros** de la familia Sphecidae, así *Sphex paludosa* Rossi (Navarro, 1901) que los transportan a sus nidos para alimento de sus larvas, o depredados por algún **arácnido**, pero todos estos generalistas no son muy efectivos en el control natural de *D. maroccanus* (Hernández-Crespo, 1993)



Fig. 5. A) *Decticus albifrons*, B) *Platystolus martinezii*.

### 5.4.3. Los invertebrados parásitos y parasitoides

Los parásitos encontrados hasta ahora en poblaciones naturales de *D. maroccanus* tienen desigual importancia para el control biológico de esta especie. El **protozoo** *Gregarina acridiorum* Léger (Eugregarinorida: Apicomplexa) alojado en el mesenterón de los adultos (Lipa et al., 1996) no causa síndrome patológico alguno, su incidencia en la reducción de efectivos es nula y, si afecta al potencial reproductor, no se ha cuantificado por ahora (Santiago-Álvarez et al., 2008).

El **nematodo** mermítido *Hexameris serenensis* Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997a) parásito intrahemocélico que causa la muerte a ninfas y adultos de *D. maroccanus* (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1991), actúa sobre las poblaciones naturales de manera consistente. Aunque se han obtenido huevos en laboratorio (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997b), la cría en estas condiciones no parece fácil por lo que, de momento, están descartadas las aplicaciones inoculativas y es más factible la estrategia de conservación (Santiago-Álvarez et al., 2008).

Los **ácaros** de la familia Trombididae, *Trombidium* sp., *Eutrombidium* sp., alojados con preferencia en la inserción de las alas, no causan debilitamiento de los individuos parasitados a los que parece acuden por un comportamiento forético (Hernández-Crespo, 1993; Navarro, 1901).

Los adultos son parasitados por larvas de diversas especies de **dípteros**. En su mayor parte pertenecen a la familia Sarcophagidae: *Sarcophaga* sp. (Delgado de Torres, 1929), *S. haemorrhoidalis* (Fallen) (Alfaro, 2005), *Sarcophaga lineata* Fall (Peña, 1941) y *Blaesoxipha* sp., *B. paoli* Villeneuve (Hernández-Crespo, 1993); tan solo se ha encontrado una especie, no

identificada, de la familia Nemestrinidae (Hernández-Crespo, 1993). La estrategia de conservación es la única aplicable a éstas dados los escasos conocimientos sobre su biología y las enormes dificultades para obtener en cautividad las grandes cantidades de individuos necesarios para la suelta en campo.

#### 5.4.4. El control microbiano

La estrategia de control biológico de plagas de langosta y saltamontes, por inoculación o inundación, se centra en los **microorganismos entomopatógenos, virus, bacterias, hongos y microsporidios** (Lomer et al., 2001), muy en particular los que presentan **especificidad, seguridad de empleo y bajo coste de producción**, además de mostrar **eficacia en medios con elevada iluminación y baja humedad relativa**, como son los que habitan estos insectos. Por otro lado, deben ser **fáciles de formular** para su empleo por los medios convencionales y son preferidos los que actúan por contacto a los que lo hacen por ingestión (Lomer et al., 2001).

La idea de utilizar microorganismos entomopatógenos para el control de la langosta mediterránea surge en España muy tempranamente, al igual que en otros países, en los inicios del s. XX, cuando todavía los estudios de patología de insectos estaban poco afianzados (Santiago-Álvarez et al., 2008). Un primer ensayo, sin éxito aparente, se realizó en 1901 en la provincia de Cáceres (Navarro, 1901) con el hongo que tantas expectativas había creado, *Empusa acridii* Cooper (Cooper, 1898), aislado en Sudáfrica de *Acridium purpuriferum* (Walker), pero en realidad se trataba del saprofítico *Mucor racemosus* Fres. (MacLeod y Müller-Köglert, 1973). Años más tarde, en vano, se intentó lo propio en Aragón con la bacteria *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle (Lapazarán, 1925), aislada en México de *Schistocerca pallens* Thunb. (Hérelle, 1911), la cual, transcurrido algún tiempo, fue relegada al olvido por la inconsistencia de resultados y el descubrimiento de su verdadera identidad, *Aerobacter aerogenes* (Kruse) (Steinhaus, 1951).

**Los patógenos asociados a *D. maroccanus* de manera natural son bacterias, hongos y protozoos** (Latchininsky y Launois-Luong, 1992), por eso avanzado el siglo XX, ya en su último cuarto, el **grupo de investigación PAIDI AGR3 163 “Entomología Agrícola” de la Universidad de Córdoba (UCO)** puso todo su empeño para detectar la **presencia de patógenos en las poblaciones de *D. maroccanus* y otros acrididos en las zonas de reserva de España**. Este modo de proceder, buscar patógenos en el medio donde se desenvuelven las poblaciones de la langosta que se quiere controlar, es el adecuado a la selección del más idóneo, en términos de virulencia, eficacia, seguridad y persistencia, para su desarrollo como

bioinsecticida (Lomer et al., 2001). La investigación ha puesto en evidencia la presencia de bacterias (Aldebis et al., 1994) y hongos (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997c) en las poblaciones del acrídido tanto de la península como de Canarias.

Las cepas de la bacteria esporígena *Bacillus thuringiensis* Berliner, aisladas de larvas vermiformes y de ninfas de primer estadio de *D. maroccanus* de la zona de La Serena (Badajoz) y la isla de El Hierro (Aldebis et al., 1994), mostraron cierto grado de actividad tóxica para ninfas de 3ª, 4ª y 5ª edad, por bioensayos de laboratorio (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2003). Un aislado de una larva vermiforme, del serovar *azawai*, causó elevada mortalidad y deterioro tisular en el mesenterón, un claro signo de intoxicación (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2001b). Esta representa la primera cita de una cepa de *B. thuringiensis* con patogeneidad para un ortóptero después de tantos esfuerzos realizados para conseguirlo (Zelazny et al., 1997). El empleo práctico de esta cepa de *B. thuringiensis*, implica una formulación que incorpore un fagostimulante, aplicada en forma de cebo o por pulverización sobre la cubierta vegetal para ser ingerida por las ninfas.

*Paranosema locustae* (E.U.Canning) Y.Y.Sokolova, V.V.Dolgikh, E.V.Morzhina, E.S.Nassonova, I.V.Issi, R.S.Terry & J. es un microsporidio patógeno de langostas y saltamontes que infecta los adipocitos del cuerpo graso, y permanece como el único microsporidio registrado y comercialmente disponible para el control de plagas (Solter et al., 2012). El amplio rango de hospedantes entre langostas y saltamontes (más de 100 especies), la eficiente transmisión horizontal, complementada con transmisión vertical, y la facilidad para el almacenamiento de los conidios durante largos periodos, son los factores favorables para su desarrollo como bioinsecticida. Este patógeno ha sido observado en poblaciones peninsulares de *D. maroccanus*, pero aún no se han publicado los resultados (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, comunicación personal).

Aunque no se tiene noticia de infecciones naturales de *D. maroccanus* por los **nematodos entomopatógenos** (Sterneinematidae y Heterorhabditidae), por ensayos de laboratorio sabemos que las ninfas son susceptibles a una cepa autóctona de *Steinernema glasseri* (Steiner); dado que invaden a los hospedantes de forma activa por los espiráculos etc, el empleo práctico, de tipo inundativo, podría realizarse pero circunscrito a los rodales de puesta para alcanzar a las de 1ª edad (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2000a). Sin embargo, la aplicación presenta algunos inconvenientes, el alto coste y el requerimiento de una considerable cantidad de agua para la dispersión de los juveniles infectivos.

Los **hongos entomopatógenos** presentan una serie de propiedades que les convierte en la principal alternativa para el control microbiano de langostas, tanto por su modo de acción por contacto, como sus buenas perspectivas de desarrollo comercial (Lomer et al., 2001; Santiago-Álvarez et al., 2008).

#### 5.4.5. Los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos constituyen un conjunto diverso de 700-750 especies en el reino Mycota, si bien, este carácter es poco frecuente en las divisiones, Blastocladiomycota y Basidiomycota, y resulta más frecuente en Ascomycota y único en Entomophthoromycota, una división que solo incluye especies de esta condición (Gryganskyi et al., 2013; Gryganskyi et al., 2012; Hibbett et al., 2007; Humber, 2012; Wang et al., 2016). Sin embargo, los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs) están considerados como el grupo de mayor importancia al estar integrado por más de 600 especies que infectan insectos y ácaros (Chandler, 2017); pues su **eficacia, fácil manejo y producción en masa** mediante medio artificial ha permitido su desarrollo comercial y los convierte en una opción excepcional para su comercialización como micoinsecticidas, en especial, las familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae, del orden Hypocreales, y Trichocomaceae, del orden Eurotiales (Lacey, 2017; Lacey et al., 2015). Entre los géneros más importantes se encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* y *Lecanicillium* (Lacey, 2017; Lacey et al., 2015).

La patogénesis de los AMEs está determinada por tres fases principales: infección, crecimiento y reproducción (Boomsma et al., 2014) (Fig. 6). La fase de infección se inicia con la adhesión de las esporas a la cutícula del insecto hospedante, seguida de la germinación y formación de estructuras de anclaje tipo apresorio, antesala de la fase de crecimiento, en la que el hongo penetra la cutícula gracias a la acción conjunta de la presión mecánica y la producción de enzimas, en especial quitinasas y proteasas (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Vega y Kaya, 2012).

Tras la penetración, las estructuras fúngicas (hifas o blastosporas) alcanzan el hemocele, donde deben vencer la respuesta inmunológica celular y humoral del insecto, para infectar sus órganos y tejidos hasta causarle la muerte. Más adelante, si las condiciones microclimáticas son propicias, se inicia la fase de reproducción, donde el hongo culmina la invasión del cadáver y vuelve a atravesar la cutícula para producir en el exterior nuevos conidióforos y conidios que se dispersarán a través del viento, la lluvia o

los propios insectos y darán lugar a un nuevo ciclo de infección (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Vega y Kaya, 2012).

Las especies de hongos entomopatógenos que de forma natural infectan a los acrididos (Goettel y Johnson, 1992) son el entomofitoráceo *Entomophaga grylli* (Fresenius) Batko (Entomophthoromycotina: Entomophthorales), y los AMEs *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *M. flavoviride* Gams y Rozsypal [= ahora *M. acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber] y *Sorosporella* sp. (Ascomycota: Hypocreales). Unas aparecen con mayor frecuencia en las regiones tropicales, p. ej. *M. acridum*, otras, por el contrario, lo hacen en las templadas, p. ej. *B. bassiana* (Shah et al., 1997). Las poblaciones de la langosta mediterránea, *D. maroccanus*, se ven afectadas por *E. grylli*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bein. (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997c; Latchininsky y Launois-Luong, 1992).

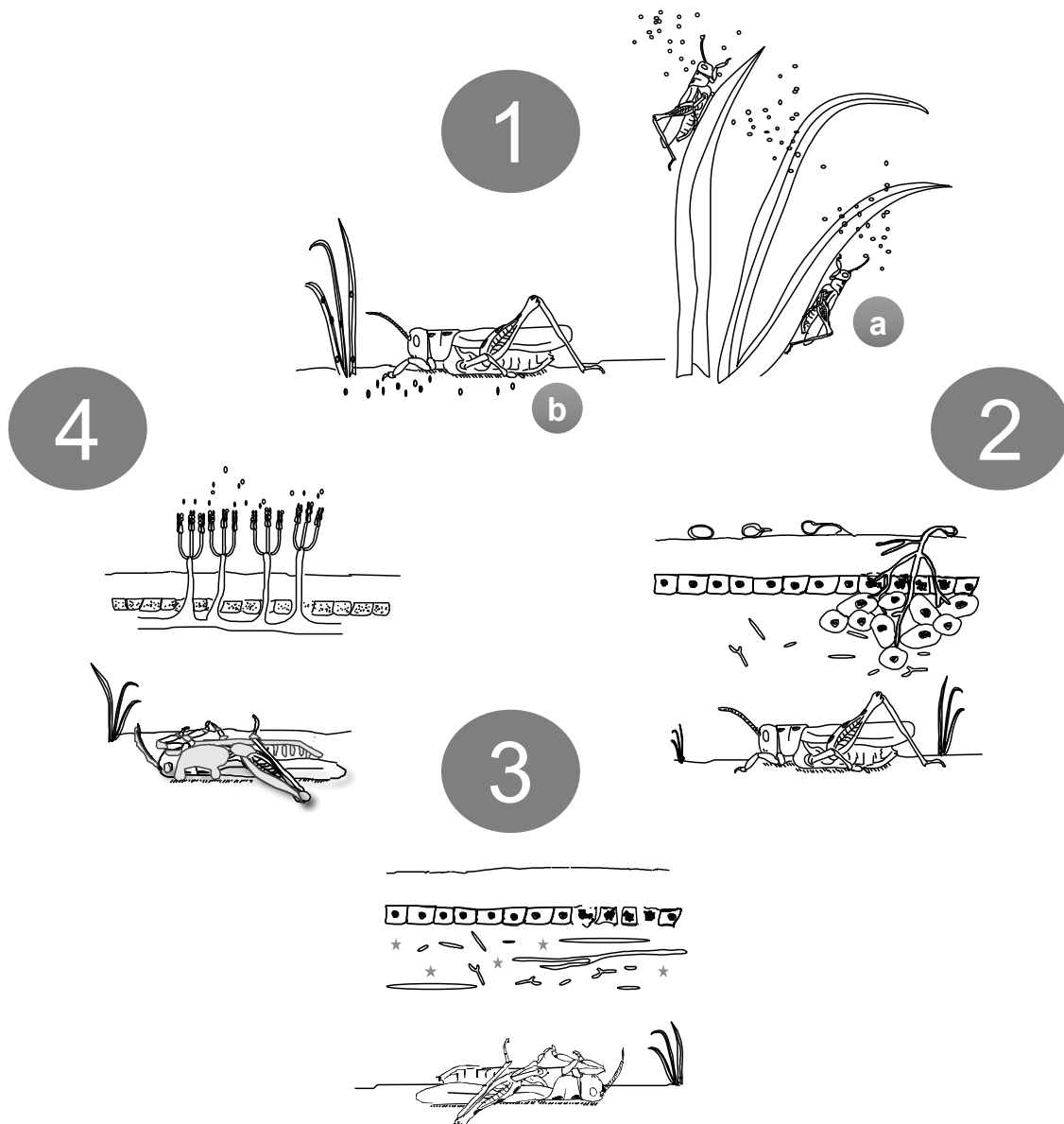
El entomofitoráceo *E. grylli* fue señalado en España sobre *D. maroccanus* en 1901 (Navarro, 1901), después en 1948 (Benlloch, 1949) y en 1998 (Quesada-Moraga, Valverde-García y Santiago-Álvarez, datos no publicados) cuando observamos una espectacular epizootia. Por esta impresionante manifestación está situado en la cúspide de los agentes de control biológico de langostas. Sin embargo, para explotar todo el potencial que encierra, es necesario dilucidar los factores ambientales que intervienen en la supervivencia de los propágulos infectivos así como superar las dificultades de aislamiento y de multiplicación *in vitro* por ser este entomofitoráceo un biotrofo obligado (Carruthers et al., 1997).

## 6. Control de *D. maroccanus* con ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs)

La aplicación inundativa de bioinsecticidas a base de **ascomicetos mitospóricos entomopatógenos**, entre los que destacan los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, es utilizada mundialmente para el control de langostas y saltamontes (Lacey et al., 2015; Lacey, 2017). En España, dos cepas fúngicas, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) (**EABb 90/2-Dm**) y *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber (Hypocreales: Clavicipitaceae) (**IMI 330189**), han sido evaluadas con resultados prometedores como candidatas para el control de *D. maroccanus* (Fig. 7).

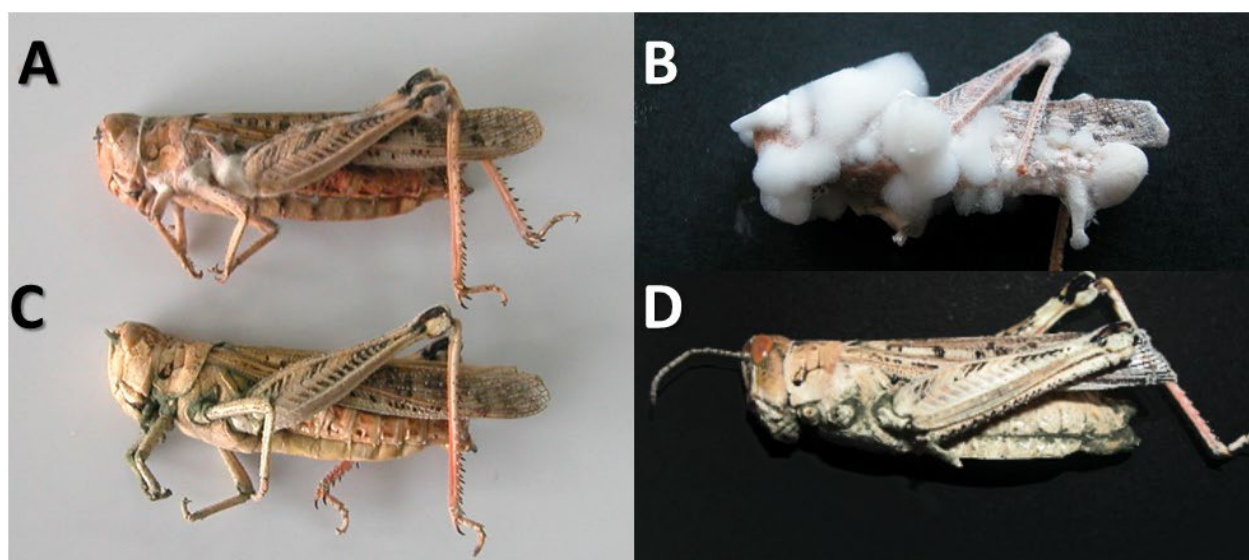
La cepa **EABb 90/2-Dm** fue aislada de *D. maroccanus* en el área de reserva de **La Serena (Badajoz)** (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997c). Esta cepa ha mostrado aceptable eficacia frente a *D. maroccanus* en ensayos de laboratorio y aplicaciones de

campo (Jiménez-Medina, 1999; Jiménez-Medina et al., 1998; Quesada-Moraga, 1998). La cepa **IMI 330189** es utilizada para el control de langostas en distintos continentes con el **programa LUBILOSA**, procedente de ejemplares del acrídido *Ornithacris cavroisi* Finot en Niamey, Níger (Lomer et al., 2001). Su potencial para el control de *D. maroccanus* ha sido evaluado en condiciones de laboratorio y de campo (Collar-Urquijo et al., 2002; Klass et al., 2007; Quesada-Moraga, 1998).



**Fig. 6.** Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos: 1) Infección por a) Tratamiento con micoinsecticida b) Contaminación del ambiente. 2) Adhesión, germinación y penetración; con la reacción defensiva celular y humoral del insecto. 3) Muerte del insecto provocado por cuerpos hifales, blastosporas y moléculas insecticidas del patógeno. 4) Invasión del cadáver y formación de conidios y conidióforos que darán lugar a un nuevo ciclo de infección.





**Fig. 7.** Cadáveres de *D. maroccanus* con crecimiento fúngico de *Beauveria bassiana* (A y B) y *Metarhizium acridum* (C y D)

## **7. Factores que influyen en la eficacia de los hongos AMEs para el control de *D. maroccanus***

La eficacia de los hongos AMEs aplicados como micoinsecticidas por inundación para el control de las plagas de langostas y saltamontes, puede ser afectada por un conjunto de factores abióticos y bióticos. Estos factores se agrupan en tres categorías: factores que inciden sobre las cepas fúngicas, factores que inciden sobre el insecto hospedante y factores relacionados con la interacción cepas fúngicas/hospedante.

### **7.1. Factores que inciden sobre las cepas fúngicas**

#### **7.1.1. Temperatura**

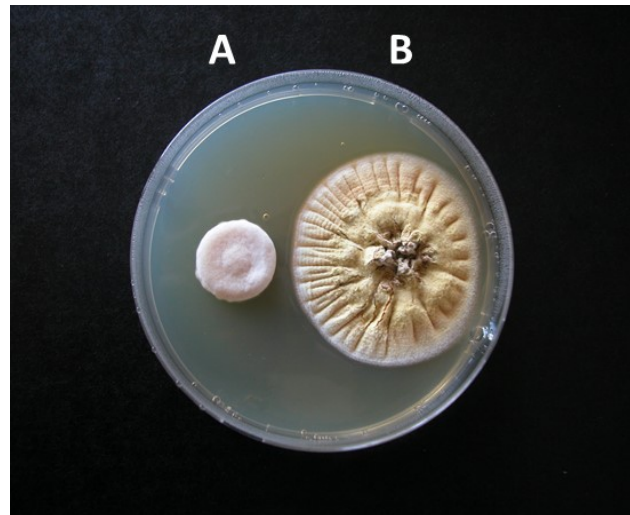
La temperatura ambiental es, probablemente, el principal factor abiótico que afecta a la eficacia de los bioinsecticidas a base de AMEs para el control de langostas y saltamontes, con potencial reducción o retraso de la mortalidad del insecto (Arthurs y Thomas, 2001; Blanford y Thomas, 2000; Blanford et al., 1998; Klass et al., 2007; Ouedraogo et al., 2004; Vega y Kaya, 2012). La temperatura puede afectar a la virulencia de estos hongos en diferentes fases del proceso infeccioso, con **variaciones inter o intraespecíficas en los requerimientos térmicos** principalmente relacionadas con el hábitat, origen geográfico y el insecto hospedante (Inglis et al., 2001; Jaronski, 2010).

---

Algunos estudios han mostrado que *B. bassiana* es una especie fúngica más psicrófila que *M. anisopliae* (Bidochka et al., 1998). Igualmente, se ha observado que ciertos grupos genéticos dentro de estas dos especies dominan suelos del ártico y forestales (aislados con habilidad para crecer a temperaturas frías p. ej. 8 °C) y otros grupos genéticos dominan suelos de hábitats agrícolas más cálidos (aquellos aislados con habilidad para crecer a altas temperaturas p. ej. 37 °C) (Bidochka et al., 2000; Bidochka et al., 2002). El efecto de temperatura en la eficacia de los hongos AMEs es especialmente importante en las áreas de reserva de *D. maroccanus* en el territorio nacional, ya que **estas áreas muestran gran variabilidad diaria en la temperatura** durante los meses del ciclo epigeo de la especie (marzo-julio), pues en La Serena, las temperaturas máximas diarias pueden llegar a exceder 40 °C y la mínimas diarias pueden ser consistentemente menores que 20 °C (Klass et al., 2007).

Los requerimientos térmicos para la germinación y crecimiento fúngico han sido un criterio comúnmente utilizado para la selección de aislados de hongos AMEs con potencial para el control de langostas, saltamontes y otros insectos (Darbro et al., 2011; Jaronski, 2010; Ouedraogo et al., 1997; Quesada-Moraga et al., 2006; Yeo et al., 2003). La exposición a altas temperaturas puede retrasar o incluso evitar la germinación de los propágulos sobre el insecto (Alves et al., 2017; Fernandes et al., 2010; Keyser et al., 2014). Por estudios *in vitro* se ha demostrado que la germinación de conidios de las especies *Beauveria* y *Metarhizium* se retrasa o limita a temperaturas en el rango 10–15 °C y 35–40 °C respectivamente (Fargues et al., 1997b; Inglis et al., 1996; Yeo et al., 2003). El crecimiento fúngico, en general, es óptimo en el rango 20–30 °C y es limitado o inexistente a temperaturas por debajo de 5 °C y por encima 37 °C (Fargues et al., 1997a; Quesada-Moraga et al., 2006; Vega y Kaya, 2012).

Una limitación de estos estudios es que, **en general, se evalúa el efecto en condiciones de temperaturas constantes, pero no en fluctuantes**, más similares a la realidad del ecosistema (Jaronski, 2010). Para evitar el efecto negativo de la temperatura ambiental en la supervivencia y virulencia del hongo, algunos estudios han demostrado que la formulación de los conidios con aceites resulta eficaz frente a temperaturas extremas (Barreto et al., 2016).



**Fig. 8.** Crecimiento fúngico *in vitro* en condiciones de temperaturas diarias fluctuantes: temperatura >35 °C durante 10 h (con máximo de 42 °C) y 25 °C durante el resto del día. A) *B. bassiana* b) *M. acridum*.

### 7.1.2. Humedad

La humedad relativa puede afectar la germinación de los conidios, el crecimiento del micelio durante la infección y la posterior conidiogénesis y esporulación sobre el cadáver del insecto. El efecto de la humedad depende fundamentalmente de la ecología del insecto, en especial del **microclima que rodea al conidio** en el filoplano y en la cutícula del insecto (Inglis et al., 2001; Vega y Kaya, 2012). De hecho, se ha puesto de manifiesto que la capacidad de los AMEs para germinar en ambientes con una baja humedad es debido a que existe una humedad suficiente en el microhábitat donde llevan a cabo su actividad (Fargues et al., 2003; Inglis et al., 2001; Wraight et al., 2000).

Los conidios necesitan para germinar una humedad relativa (HR) de un 90-95% y una actividad del agua ( $a_w$ ) de al menos 0.92 en la mayoría de las especies de AMEs (Gillespie y Crawford, 1986). Aunque existe variabilidad intra e interespecífica en el efecto de la humedad sobre la germinación de conidios, se ha demostrado que en *B. bassiana* el hábitat de origen (filoplano o suelo) no tuvo influencia determinante en acción de la humedad sobre la germinación de conidios (Fernández-Bravo et al., 2016). No obstante, las condiciones ambientales del ecosistema pueden favorecer la selección de aislados que han desarrollado ventajas adaptativas a situaciones limitantes (Gonzalez-Mas et al., 2019). La posibilidad de formulación oleosa de estos bioinsecticidas, proporcionando la humedad relativa necesaria en el microambiente donde se producen las fases iniciales de

la infección (adherencia del conidio, germinación y penetración), permite minimizar el efecto de este factor abiótico (Ibrahim et al., 1999; Jaronski, 2010).

### **7.1.3. Radiación Solar**

**La radiación solar**, en particular la región UV-B, es uno de los factores abióticos más limitantes para la eficacia de los hongos AMEs, al disminuir la supervivencia del conidio en el hábitat epigeo especialmente cuando se realizan aplicaciones aéreas para el control de fitófagos ectófitos (Fernandes et al., 2015). El daño causado por la radiación UV-B es debido a **fotorreacción de los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y membranas** (Vega y Kaya, 2012). La exposición subletal a la radiación UV-B puede causar alteraciones fisiológicas o genéticas que reducen y retrasan la germinación de los conidios y su posterior desarrollo, lo cual se traduce en un detrimento en la persistencia y virulencia de los propágulos infectivos reduciendo la eficacia en campo (Braga et al., 2001a; Fernandes et al., 2015).

Los métodos artificiales desarrollados para proteger los conidios de la radiación UV-B, como el empleo de bloqueadores solares que reflejan la radiación (p. ej. tinopal) y absorbentes de la radiación UV-A/UV-B (p. ej. colorante rojo Congo) han dado distintos resultados (Inglis et al., 1995; Shah et al., 1998). Los pigmentos naturales contenidos en los aceites vegetales usados para la formulación del bioinsecticida, pueden también proteger a los conidios bloqueando la radiación solar (Braga et al., 2001b). Igualmente, en la búsqueda constante de aislados tolerantes a la radiación UV-B, la mira está puesta en la ingeniería genética para la producción de pigmentos que aumenten la tolerancia a la radiación UV-B (Fang y St Leger, 2012; Shang et al., 2012; Tseng et al., 2011). A este respecto, se ha demostrado recientemente que el efecto de la UV-B sobre los conidios es más acusado cuando se produce sobre superficies inertes como la hoja, o una placa Petri, que cuando se produce sobre el insecto, cuando los conidios ya han entrado en contacto con la epicutícula (Fernández-Bravo et al., 2017).

## **7.2. Factores que inciden sobre el insecto hospedante**

La regulación de la temperatura corporal del insecto puede afectar igualmente a la eficacia de los bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos. Los insectos son animales relativamente pequeños en los que la relación superficie/volumen es superior a la que presentan los de mayor tamaño y como consecuencia, manifiestan incapacidad para mantener una temperatura corporal constante, por ello se dice que son

poiquiloterms. Sin embargo, muchas especies pueden regular su temperatura en determinadas condiciones hasta aproximarse a un óptimo. Este fenómeno es conocido como **termorregulación** y puede ser realizado de manera **comportamental** y en algunos casos **fisiológica** (Chapman, 2013).

### 7.2.1. La termorregulación fisiológica

Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los saltamontes y langostas pueden considerarse exclusivamente ectotérmicos, es decir, su temperatura corporal depende de la temperatura ambiental. No obstante, algunas especies actúan como endotérmicas en determinadas situaciones, principalmente durante el vuelo al producir cantidades considerables de calor metabólico (Chapman, 2013; Chappell y Whitman, 1990; Heinrich, 1974).

La mayoría de los estudios de endotermia en langostas están centrados en las especies migratorias como *S. gregaria*, en la que la temperatura del tórax debe exceder un límite inferior antes de que los músculos de las alas puedan producir potencia para mantener el vuelo. El calentamiento por endotermia previo al vuelo, que ha sido observado en polillas, abejas, libélulas y escarabajos no se ha descrito con detalle en langostas y saltamontes (Chappell y Whitman, 1990).

Después del establecimiento del vuelo, la temperatura torácica se incrementa debido a la intensa actividad muscular estabilizándose posteriormente. *S. gregaria* puede continuar el vuelo a temperaturas del aire excediendo el máximo soportado por el insecto combinando movimiento de las alas con planeo sin movimiento, perdiendo calor por convección. Al contrario que en otros insectos voladores endotérmicos, las langostas no poseen el mecanismo del aparato circulatorio que permite la pérdida del exceso de calor metabólico por disipación por el abdomen (Chappell y Whitman, 1990).

La pérdida de calor por evaporación no es importante para la termorregulación de langostas y saltamontes, principalmente porque estos carecen de adecuadas reservas de agua corporal para mantener un mecanismo de este tipo de manera significativa (Chappell y Whitman, 1990). Como hemos mencionado, todos estos mecanismos endotérmicos de termorregulación no son especialmente relevantes en langostas y saltamontes, por lo que no afectan a la potencial eficacia de los hongos entomopatógenos.

### 7.2.2. La termorregulación comportamental

En la mayoría de las langostas y saltamontes, la **termorregulación comportamental** es el único mecanismo disponible en la práctica para ajustar la temperatura del cuerpo. Estos comportamientos son bien conocidos, no en vano, algunos de los primeros trabajos desarrollados en termorregulación comportamental en insectos se centraron en *S. gregaria* (Chappell y Whitman, 1990; Fraenkel, 1929; 1930).

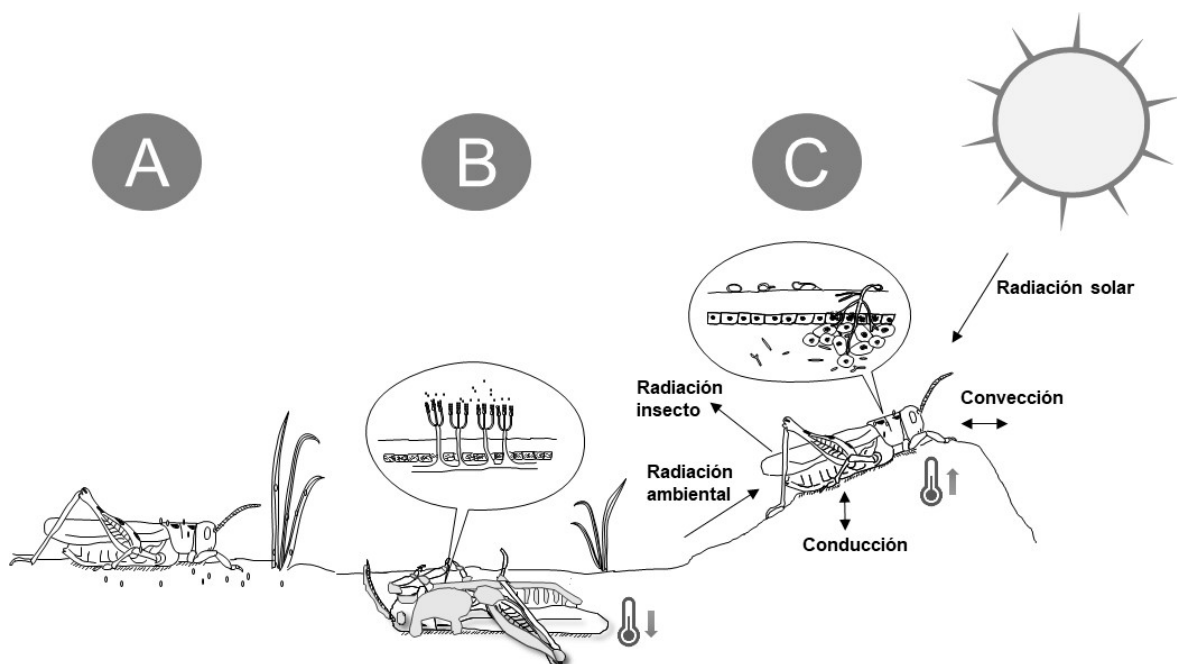
Las langostas y saltamontes realizan la termorregulación comportamental mediante el **control de la postura corporal, orientación al sol y la selección de microhábitats** para absorber calor directamente del sol o de sustratos más calientes (Chappell y Whitman, 1990). Con este comportamiento, pueden mantener su temperatura corporal varios grados por encima de la temperatura del ambiente. Esta temperatura recibe el nombre de temperatura corporal preferida o “de ajuste” (Carruthers et al., 1992; Jaronski, 2010). *D. maroccanus* ha mostrado tener termorregulación comportamental manteniendo temperaturas en el rango de los 38-40 °C durante 8-10 horas diarias en el área de reserva de la Serena (Klass et al., 2007).

Este comportamiento de termorregulación puede ser más pronunciado tras la infección por un hongo entomopatógeno, fenómeno conocido como **fiebre comportamental**, que es una respuesta de defensa adaptativa que tiene como resultado la supresión del crecimiento del patógeno e incrementar la respuesta del sistema inmune de la langosta (Fig. 9) (Blanford et al., 1998; Clancy et al., 2018; Elliot et al., 2002; Hunt y Charnley, 2011; Inglis et al., 1996; Ouedraogo et al., 2004; Sangbaramou et al., 2018). La fiebre comportamental ha sido descrita en vertebrados e invertebrados ectotermos infectados con patógenos pertenecientes a varios taxones (virus, bacterias, protozoos y hongos; también macroparásitos) (Anderson et al., 2013; Kluger et al., 1996; Rakus et al., 2017).

El sistema inmune del insecto proporciona mecanismos celulares y humorales que actúan de manera complementaria para controlar el desarrollo de la enfermedad. Los mecanismos humorales incluyen moléculas como péptidos antimicrobianos, proteínas y enzimas que regulan la formación de melanina, aunque requieren un periodo prolongado en el tiempo para actuar. Por el contrario, los mecanismos celulares responden inmediatamente cuando la infección ocurre. Estos consisten en fagocitosis, nodulación y encapsulación, que son realizados principalmente por los hemocitos (Vega y Kaya, 2012). En diferentes estudios con *L. migratoria* y *S. gregaria*, se ha comprobado que la fiebre

comportamental inhibió el crecimiento de *M. acridum* y *B. bassiana*, estimulando los mecanismos celulares del sistema inmune, manteniendo el nivel de hemocitos o incluso aumentándolo, incrementando la actividad fagocítica e inhibiendo la propagación de las blastosporas (Clancy et al., 2018; Ouedraogo et al., 2003; Sangbaramou et al., 2018). Igualmente, la temperatura alcanzada por el insecto en termorregulación fue directamente proporcional a la dosis del hongo aplicada (Clancy et al., 2018).

La fiebre comportamental, como otros mecanismos de defensa frente a patógenos, podría tener efectos positivos o negativos en la eficacia biológica del insecto hospedante. En *S. gregaria* se ha observado que las temperaturas alcanzadas con la fiebre comportamental no tuvieron efecto negativo en supervivencia y fecundidad. Sin embargo, la capacidad para el vuelo y la competencia por el apareamiento se vieron reducidas, aunque esta respuesta no estuvo correlacionada con el tiempo de exposición a la temperatura. Aunque estos resultados podrían indicar un coste biológico de la fiebre comportamental, son también consistentes con la transformación a la fase solitaria, que en el contexto ecológico podría interpretarse como una respuesta adaptativa para limitar el impacto de la enfermedad en la población (Elliot et al., 2002; Elliot et al., 2005).



**Fig. 9.** Termorregulación comportamental. A) Infección por los conidios del hongo entomopatógeno. B) Temperatura favorable al patógeno (no termorregulación), provocando la muerte del insecto. C) Termorregulación comportamental, el insecto aumenta su temperatura mediante modificación de la postura corporal, orientación al sol y selección de microhábitats, incrementándose la respuesta del sistema inmune y luchando contra la infección.

### 7.3. Factores relacionados con la interacción entre las cepas fúngicas y el insecto hospedante

El principal efecto de la interacción de la cepa fúngica con el insecto hospedante es obviamente el propio proceso patogénico, caracterizado por una determinada virulencia y consecuente mortalidad de individuos en la población de *D. maroccanus*. Sin embargo, existen otros tipos de interacciones patógeno-insecto hospedante que pueden modificar la eficacia de un bioinsecticida para el control de las poblaciones de langosta, tales como los efectos pre y subletales y la presencia de infecciones mixtas con varios patógenos.

#### 7.3.1. Efectos subletales

Una de las mayores limitaciones de los agentes de control microbiano podría ser su relativa lentitud para causar la mortalidad si se comparan con los insecticidas neurotóxicos. Desde un punto de vista práctico, sin embargo, el control efectivo se determina como el grado de protección proporcionado al ecosistema agrícola, independientemente de la velocidad a la que los insectos mueren (Arthurs y Thomas, 2000; Jaronski, 2010; Lomer et al., 2001; Roy et al., 2006).

Además de la mortalidad, los AMEs inducen una serie de efectos pre y subletales en el insecto hospedante, que contribuyen a la valoración final del tratamiento (Arthurs y Thomas, 2000; Blanford y Thomas, 2001; Roy et al., 2006). Estos efectos subletales pueden verse influenciados por la termorregulación, ya que ésta afecta al tiempo de supervivencia del insecto hospedante. Un número importante de insectos ortópteros ha mostrado **reducción en la alimentación** como respuesta a la infección por AMEs. *M. acridum* redujo la alimentación en *S. gregaria* (Moore et al., 1992; Seyoum et al., 1994), *S. americana* (Drury) (Sieglaff et al., 1997), *Zonocerus variegatus* (L.) (Thomas et al., 1997), *Hieroglyphus daganensis* Krauss (Thomas et al., 1998), *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (de Faria et al., 1999), *Locustana pardalina* Walker (Arthurs y Thomas, 2000), *S. piceifrons* (Walker) (Hernández-Velázquez et al., 2007), *Tropidacris collaris* (Stoll), *Cornops frenatum* (Marschall) y *Parascopas obesus* (Giglio-Tos) (Schmidt et al., 2018), mientras que *B. bassiana* redujo la alimentación en *Uvarovistia zebra* (Uvarov) (Mohammadbeigi y Port, 2015).

Otro efecto subletal causado por AMEs es la **reducción en la fecundidad**. En ortópteros, *M. acridum* causó reducción en el número total de ootecas en *S. gregaria* (Blanford y Thomas, 2001), *B. bassiana* y *M. acridum* causaron reducción en el número de



ootecas por hembra y en el número de huevos por ooteca en *S. gregaria* y *Euprepocnemis plorans* Charp. (El-Maghraby et al., 2009), y *B. bassiana* causó similares efectos en *Dichroplus maculipennis* (Blanchard) y *Ronderosia bergi* (Stål) (Pelizza et al., 2013).

### 7.3.2. Infecciones mixtas

Debido a que los insectos están expuestos a una gran diversidad de especies y aislados de parásitos y patógenos (Vega y Kaya, 2012), existe la posibilidad de la ocurrencia natural de infecciones mixtas (Ishii et al., 2002; Lecuona et al., 1996; Malakar et al., 1999). Además, la utilización de mezclas de entomopatógenos ha sido propuesta como estrategia para incrementar la eficacia de los bioinsecticidas (Inglis et al., 1997; Lacey et al., 2015).

Aunque no muy numerosos, existen varios estudios que evalúan las interacciones entre AMEs en insectos (Chandler et al., 1993; Cruz et al., 2006; Geetha et al., 2012; Inglis et al., 1999; Inglis et al., 1997; Klinger et al., 2015; Mnyone et al., 2009; Pauli et al., 2018; Vojvodic et al., 2012). El insecto hospedante presenta recursos limitados, por lo que la coocurrencia de diferentes patógenos o parásitos dentro del mismo hospedante hace la competencia entre ellos inevitable. **En las infecciones mixtas pueden aparecer complejas interacciones**, donde el efecto de uno o de ambos patógenos podría verse incrementado, uno o ambos patógenos podrían verse limitados o uno podría verse incrementado y el otro limitado (Alizon et al., 2013; Cox, 2001). Además, estas interacciones pueden verse modificadas por la temperatura ambiental y por la termorregulación del insecto (Inglis et al., 1999; Inglis et al., 1997).

El aumento de la virulencia en las infecciones mixtas puede ser debido al efecto restrictivo en el sistema inmunológico del insecto causado por el incremento total de la densidad de patógenos, o a la ineficiencia de dicho sistema en la eliminación de infecciones múltiples. En otros casos, la virulencia de la infección mixta refleja simplemente la virulencia del patógeno-aislado más virulento (Alizon et al., 2013; Cox, 2001; Vojvodic et al., 2012).

La disminución de la virulencia con la infección mixta puede deberse a la competencia o al antagonismo entre los patógenos (Alizon et al., 2013; Cox, 2001). Esta misma respuesta, disminución de la virulencia, puede ser también el resultado de la cooperación entre patógenos que causan efectos subletales, cuando los recursos del insecto son

compartidos resultando en una infrautilización de los mismos (Schjorring y Koella, 2003; Vojvodic et al., 2012).

Debido al efecto de factores como la temperatura y termorregulación del insecto en la eficacia de los hongos AMEs, el uso de mezclas de aislados de una o de distintas especies de patógenos ha sido propuesta como una estrategia para mejorar la eficacia de los biopesticidas en un rango más amplio de condiciones ambientales (Inglis et al., 1999; Inglis et al., 1997; Lacey et al., 2015).

**En este sentido, la posible existencia de termorregulación comportamental en *D. maroccanus* así como su impacto sobre el desarrollo de estrategias de control de este acrídido basadas en el empleo de hongos entomopatógenos, con énfasis en las ya mencionadas cepas *B. bassiana* EABb 90/2-Dm y *M. acridum* IMI 330189, permanecen desconocidos, y su estudio es el principal objetivo de la presente tesis doctoral.**

## 8. Objetivos

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Evaluar y comparar el efecto de temperaturas constantes y fluctuantes (simulando termorregulación) en la germinación de conidios y crecimiento de las cepas *B. bassiana* (EABb 90/2-Dm) y *M. acridum* (IMI 330189).
2. Evaluar y comparar el efecto de la termorregulación en la virulencia de las cepas *B. bassiana* (EABb 90/2-Dm) y *M. acridum* (IMI 330189) sobre *D. maroccanus*. Evaluar la existencia de fiebre comportamental en *D. maroccanus* frente a la infección por ambas cepas.
3. Evaluar la influencia de la termorregulación en la virulencia de la infección conjunta con *Metarhizium acridum* (IMI 330189) y dos cepas autóctonas de *Beauveria bassiana* procedentes del área de reserva de La Serena sobre un hospedante acrídido modelo (*Schistocerca gregaria*).
4. Estudiar los efectos subletales (alimentación y fecundidad) causados por infecciones simples y mixtas con las cepas *B. bassiana* (EABb 90/2-Dm) y *M. acridum* (IMI 330189) en *D. maroccanus* en condiciones de termorregulación.

Los resultados de los objetivos 1 y 2 se recogen en el Capítulo II, que comprende el manuscrito “**Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust *Dociopterus maroccanus* control**” publicado en la revista *Biocontrol* (IP=1.924, 20/96, Q1 en Entomology). Los resultados del objetivo 3 se recogen en el Capítulo III, que comprende el manuscrito “**Mixed infections and insect-pathogen interactions**” publicado en la revista *Ecology Letters* (IP=9.137, 4/160, Q1 en Ecology). Los resultados del objetivo 4 se recogen en el Capítulo IV, que comprende el manuscrito “**Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, *Dociopterus maroccanus***” publicado en la revista *Journal of Invertebrate Pathology* (IP=2.511, 18/167, Q1 en Zoology).

## 9. Referencias

- Aldebis, H.K., Vargas-Osuna, E., Santiago-Álvarez, C., 1994. Caracterización serológica de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner aisladas de insectos españoles. *Bol. San. Veg. Plagas.* 20, 765-769.
- Alfaro, A., 2005. Entomología agraria. Los parásitos animales de las plantas cultivadas. (Edición a cargo de Cándido Santiago Álvarez). Imprenta Diputación Provincial de Soria, Soria.
- Alizon, S., de Roode, J.C., Michalakis, Y., 2013. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecol. Lett.* 16, 556-567.
- Alves, F.M., Bernardo, C.C., Paixao, F.R.S., Barreto, L.P., Luz, C., Humber, R.A., Fernandes, E.K.K., 2017. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitol. Res.* 116, 111-121.
- Anderson, R.D., Blanford, S., Thomas, M.B., 2013. House flies delay fungal infection by fevering: at a cost. *Ecol. Entomol.* 38, 1-10.
- Anónimo, 1933-54. Las plagas del campo. Memoria del servicio fitopatológico agrícola. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Anónimo, 1982. Locust and grasshopper agricultural manual. Centre for Overseas Pest Research, London, UK.
- Anónimo, 2004-2007. Informe de la reunión del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Langosta y otros Ortópteros asociados (2004-2007). Reuniones anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios. Dirección General de Agricultura. MAPYA. Madrid.
- Arias, A., Morales-Agacino, E., Cobos, J.M., Sopeña, J.M., Martín-Bernal, E., 1994. La langosta mediterránea. Publicaciones de la secretaría general técnica MAPYA, Madrid.
- Arthurs, S., Thomas, M.B., 2000. Effects of a mycoinsecticide on feeding and fecundity of the brown locust *Locustana pardalina*. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 321-329.
- Arthurs, S., Thomas, M.B., 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 59-65.
- Barreto, L.P., Luz, C., Mascarín, G.M., Roberts, D.W., Arruda, W., Fernandes, E.K.K., 2016. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. *J. Invertebr. Pathol.* 138, 94-103.

- Bashir, M., Hassanali, A., Korena, H., Bashir, A.W., 2016. Semi-field evaluation of the effects of sub-lethal doses of pesticides, with and without adult *Schistocerca gregaria* pheromone, on hoppers. *Entomol. Exp. Appl.* 160, 72-76.
- Bashir, M.O., Hassanali, A., 2010. Novel cross-stage solitarising effect of gregarious-phase adult desert locust (*Schistocerca gregaria* (Forskål)) pheromone on hoppers. *J. Insect Physiol.* 56, 640-645.
- Benlloch, M., 1949. Observaciones fitopatológicas en el año 1948. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agric.* 16, 203-242.
- Benlloch, M., Cañizo, J.del, 1941. Observaciones biológicas sobre la langosta común (*Dociostaurus maroccanus*) recogidas en los años 1940 y 1941. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agric.* 10, 110-124.
- Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., Wild, G.A.M., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* 76, 1198-1204.
- Bidochka, M.J., Melzer, M.J., Lavender, T.M., Kamp, A.M., 2000. Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA viruses. *Mycol. Res.* 104, 1094-1097.
- Bidochka, M.J., Menzies, F.V., Kamp, A.M., 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Arch. Microbiol.* 178, 531-537.
- Bland, R.G., Gangwere, S.K., Morales-Martín, M., 1996. An annotated list of the Orthoptera (sens. lat.) of the Canary Islands. *J. Orthoptera Res.*, 159-173.
- Blanford, S., Thomas, M.B., 2000. Thermal behavior of two acridid species: effects of habitat and season on body temperature and the potential impact on biocontrol with pathogens. *Environ. Entomol.* 29, 1060-1069.
- Blanford, S., Thomas, M.B., 2001. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 1-8.
- Blanford, S., Thomas, M.B., Langewald, J., 1998. Behavioral fever in the Senegalese grasshopper, *Oedaleus senegalensis*, and its implications for biological control using pathogens. *Ecol. Entomol.* 23, 9-14.
- Bodenheimer, F.S., Shulov, A., 1951. Egg-development and diapause in the Moroccan locust. *Bull. Res. Coun. Israel.* 1, 59-75.
- Bolívar, I., 1876. Sinopsis de los ortópteros de España y Portugal (3ª parte). *An. R. Soc. Esp. Hist. Nat.* 4, 249-348.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 467-485.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001a. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 105, 874-882.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001b. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochem. Photobiol.* 73, 140-146.
- Cañizo, J.del, 1939. Las plagas de langosta en España. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agric.* 8, 27-48.

- Cañizo, J.del, 1942. La langosta y el clima. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 11, 179-200.
- Cañizo, J.del, 1943. Parásitos de la langosta en España: I. Dípteros bombílidos. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 12, 77-99.
- Cañizo, J.del, 1954. Invasión de “langosta peregrina” en Canarias (octubre 1954). Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 20, 409-431.
- Cañizo, J.del, 1956. Parásitos de la langosta en España: II. Los Trichodes (Col. Cleridae). Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 22, 297-312.
- Cañizo, J.del, Moreno-Márquez, V., 1940. Ideas actuales sobre las plagas de langosta. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 9, 107-137.
- Carruthers, R.I., Larkin, T.S., Firstencel, H., Feng, Z.D., 1992. Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper. Ecology. 73, 190-204.
- Carruthers, R.I., Ramos, M.E., Larkin, T.S., Hostetter, D.L., Soper, R., 1997. The *Entomophaga grylli* (Fresenius) Batko species complex: its biology, ecology, and use for biological control of pest grasshoppers. Mem. Entomol. Soc. Can. 171, 329-353.
- Chandler, D., 2017. Basic and applied research on entomopathogenic fungi, en: Lacey, L. (Ed.), Microbial control of insect and mite pests. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp. 69-89.
- Chandler, D., Heale, J.B., Gillespie, A.T., 1993. Competitive interaction between strains of *Verticillium lecanii* on 2 insect hosts. Ann. Appl. Biol. 122, 435-440.
- Chapman, R.F., 2013. The insects: structure and function. 5th ed. Cambridge University Press, New York, USA.
- Chappell, M.A., Whitman, D.W., 1990. Grasshopper thermoregulation, en: Chapman, R. F., Joern, A. (Eds.), Biology of grasshoppers. Wiley Interscience, New York, USA, pp. 143-172.
- Chapuis, M.-P., Plantamp, C., Blondin, L., Pages, C., Vassal, J.-M., Lecoq, M., 2014. Demographic processes shaping genetic variation of the solitary phase of the desert locust. Mol. Ecol. 23, 1749-1763.
- Clancy, L.M., Jones, R., Cooper, A.L., Griffith, G.W., Santer, R.D., 2018. Dose-dependent behavioural fever responses in desert locusts challenged with the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. Sci. Rep. 8, art. no. : 14222.
- Collar-Urquijo, J.L., Celma-Calamita, J., Blandford, S., Thomas, M.B., 2002. Control de *Dociostaurus maroccanus* y *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) mediante aplicaciones en campo de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. Bol. San. Veg. Plagas. 28, 185-192.
- Cooper, A.W., 1898. Informe sobre la enfermedad entre las langostas en el Natal causada por un hongo: *Empusa acridii*. Trans. S. African Philos. Soc. 9, 92-95.
- Cox, F.E.G., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology. 122, S23-S38.
- Cressman, K., 2013. Role of remote sensing in desert locust early warning. J. Appl. Remote Sens. 7, art. no. : 075098.
- Cruz, L.P., Gaitan, A.L., Gongora, C.E., 2006. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 918-926.
- Cullen, D.A., Cease, A.J., Latchininsky, A.V., Ayali, A., Berry, K., Buhl, J., De Keyser, R., Foquet, B., Hadrich, J.C., Matheson, T., Ott, S.R., Poot-Pech, M.A., Robinson, B.E., Smith, J.M., Song, H., Sword, G.A., Vanden Broeck, J., Verdonck, R., Verlinden, H., Rogers, S.M., 2017. From

- molecules to management: mechanisms and consequences of locust phase polyphenism. *Adv. Insect Physiol.* 53, 167-285.
- Darbro, J.M., Graham, R.I., Kay, B.H., Ryan, P.A., Thomas, M.B., 2011. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 21, 1027-1047.
- de Faria, M.R., Almeida, D.d.O., Magalhães, B.P., 1999. Food consumption of *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) infected by the fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. *An. Soc. Entomol. Brasil* 28, 91-99.
- Delgado de Torres, D., 1929. Dípteros parásitos de la langosta en España. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agric.* 4, 65-68.
- Dobson, H.M., 2001. Desert locust guidelines.4-Control. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Eig, A., 1935. Ecologie du Criquet marocain en Irak. *Bull. Entomol. Res.* 26, 26:293-315.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl.* 46, 387-400.
- El-Maghraby, M.M.A., Gomaa, E.A., Metaweh, H.H., Abdelatef, G.M., 2009. Susceptibility of *Schistocerca gregaria* (Forskål) and *Euprepocnemis plorans* (Charpentier) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metchnikoff) Soroken, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Nosema locustae* Canning. *Egypt. J. Biol. Pest Co.* 19, 55-61.
- El Bashir, S., 1997. Alternative strategy and tactics for the management of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.), en: Krall, S., et al. (Eds.), *New Strategies in Locust Control*. Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 305-312.
- Elliot, S.L., Blanford, S., Thomas, M.B., 2002. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 269, 1599-1607.
- Elliot, S.L., Horton, C.M., Blanford, S., Thomas, M.B., 2005. Impacts of fever on locust life-history traits: costs or benefits? *Biol. Lett.* 1, 181-184.
- Everts, J.W., Ba, L., 1997. Environmental effects of locust control: state of the art and perspectives, en: Krall, S., et al. (Eds.), *New Strategies in Locust Control*. Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 331-336.
- Fang, W.G., St Leger, R.J., 2012. Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *Plos One.* 7, e43069.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Rougier, M., 1997a. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia.* 89, 383-392.
- Fargues, J., Ouedraogo, A., Goettel, M.S., Lomer, C.J., 1997b. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 345-356.
- Fargues, J., Vidal, C., Smits, N., Rougier, M., Boulard, T., Mermier, M., Nicot, P., Reich, P., Jeannequin, B., Ridray, G., Lagier, J., 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera : Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biol. Control.* 28, 320-331.

- Fernandes, E.K.K., Keyser, C.A., Chong, J.P., Rangel, D.E.N., Miller, M.P., Roberts, D.W., 2010. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *J. Appl. Microbiol.* 108, 115-128.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Roberts, D.W., 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Curr. Genet.* 61, 427-440.
- Fernández-Bravo, M., Flores-León, A., Calero-López, S., Gutiérrez-Sánchez, F., Valverde-García, P., Quesada-Moraga, E., 2017. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp strains. *J. Invertebr. Pathol.* 148, 142-151.
- Fernández-Bravo, M., Garrido-Jurado, I., Valverde-García, P., Enkerli, J., Quesada-Moraga, E., 2016. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. *J. Invertebr. Pathol.* 141, 6-17.
- Fraenkel, G., 1929. Untersuchungen über lebensgewohnheiten, sinnesphysiologie und sozialpsychologie der wandernden larven der Afrikanischen wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biol. Zentralbl.* 49, 657-680.
- Fraenkel, G., 1930. Die orientierung von *Schistocerca gregaria* zu strahlender wärme. *Z. Vergl. Physiol.* 13, 300-313.
- Furstenau, B., Munoz, L., Coca-Abia, M., Rosell, G., Guerrero, A., Quero, C., 2013. Phytal: a candidate sex pheromone component of the Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus*. *ChemBioChem.* 14, 1450-1459.
- Gangwere, S.K., Llorrente, V., 1992. Distribution and habitats of the Orthoptera (sens. lat.) of the Balearic Islands. *EOS.* 68, 51-87.
- Gangwere, S.K., Morales-Agacino, E., 1970. The biogeography of Iberian orthopteroids. *Misc. Zool.* 2, 9-75.
- Geetha, N., Preseetha, M., Hari, K., Santhalakshmi, G., Bai, K.S., 2012. In vivo interactions of entomopathogenic fungi, *Beauveria* spp. and *Metarhizium anisopliae* with selected opportunistic soil fungi of sugarcane ecosystem. *J. Environ. Biol.* 33, 721-727.
- Gillespie, A.T., Crawford, E., 1986. Effect of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. and *Verticillium lecanii*, en: Samson, R. A., et al. (Eds.), *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*. Society of Invertebrate Pathology, Wageningen, Netherlands, pp. 254.
- Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1992. Environmental Impact and Safety of Fungal Biocontrol Agents, en: Lomer, C., Prior, C. (Eds.), *Biological control of locusts and grasshoppers*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 356-361.
- Gonzalez-Mas, N., Ortega-García, L., Garrido-Jurado, I., Dembilio, O., Jaques, J.A., Quesada-Moraga, E., 2019. Which came first: the disease or the pest? Is there a host mediated spread of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) by invasive palm pests? *J. Invertebr. Pathol.* 162, 26-42.
- Gryganskyi, A.P., Humber, R.A., Smith, M.E., Hodge, K., Huang, B., Voigt, K., Vilgalys, R., 2013. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia.* 30, 94-105.
- Gryganskyi, A.P., Humber, R.A., Smith, M.E., Miadlikovska, J., Wu, S., Voigt, K., Walther, G., Anishchenko, I.M., Vilgalys, R., 2012. Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. *Mol. Phylogenet. Evol.* 65, 682-694.

- Guerrero, A., Ramos, V.E., Lopez, S., Álvarez, J.M., Dominguez, A., Coca-Abia, M.M., Bosch, M.P., Quero, C., 2019. Enantioselective synthesis and activity of all diastereoisomers of (E)-Phytal, a pheromone component of the Moroccan locust, *Dociostaurus maroccanus*. *J. Agric. Food Chem.* 67, 72-80.
- Hassanali, A., Njagi, P.G.N., Bashir, M.O., 2005. Chemical ecology of locusts and related acridids. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 223-245.
- Hastings, J., Latchininsky, A.V., Schell, S.P., 2009. Sustainability of grasshopper management and support through CARMA. Proceedings of the 42nd Annual Hawaii International Conference on Systems Sciences, Los Alamitos, CA, pp. 1-10.
- Heinrich, B., 1974. Thermoregulation in endothermic insects. *Science.* 185, 747-756.
- Hérelle, F.D., 1911. Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur des sauterelles au Mexique. *Comp. Rend. Acad. Scien. Paris.* 152, 1413-1415.
- Hernández-Crespo, P., 1993. La langosta mediterránea, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg), sus enemigos naturales y el posible control de sus plagas por medio de microorganismos patógenos. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Hernández-Crespo, P., Santiago-Álvarez, C., 1991. On the occurrence of a mermithid on Spanish acridids. *IOBC wprs Bull.* 17, 208-211.
- Hernández-Crespo, P., Santiago-Álvarez, C., 1997a. Description of *Hexameris serenensis* sp. n. (Nematoda: Mermithidae), a parasite of *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera, Acrididae) in Spain. *Fund. Appl. Nematol.* 20, 37-42.
- Hernández-Crespo, P., Santiago-Álvarez, C., 1997b. Egg-laying and development of *Hexameris serenensis* (Nematoda, Mermithidae) under laboratory conditions. *Fundam. Appl. Nematol.* 20, 43-45.
- Hernández-Crespo, P., Santiago-Álvarez, C., 1997c. Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae) and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 357-363.
- Hernández-Velázquez, V.M., Berlanga-Padilla, A., Toriello, C., 2007. Reduction of feeding by *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera : Acrididae), following infection by *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Fla. Entomol.* 90, 786-789.
- Herrera, L., 1982. Catalogue of the Orthoptera of Spain (Catálogo de los Ortópteros de España). Dr W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509-547.
- Humber, R.A., 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon.* 120, 477-492.



- Hunt, V.L., Charnley, A.K., 2011. The inhibitory effect of the fungal toxin, destruxin A, on behavioural fever in the desert locust. *J. Insect Physiol.* 57, 1341-1346.
- Ibrahim, L., Butt, T.M., Beckett, A., Clark, S.J., 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 103, 901-907.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Kawchuk, L.M., Goettel, M.S., 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol. Control.* 14, 111-120.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests, en: Butt, T. M., et al. (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI International, Wallingford, UK, pp. 23-69.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1995. Influence of ultraviolet-light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol. Control.* 5, 581-590.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Cheng, K.J., Goettel, M.S., 1997. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. *Biol. Control.* 8, 143-152.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S., 1996. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biol. Control.* 7, 131-139.
- Ishii, T., Takatsuka, J., Nakai, M., Kunimi, Y., 2002. Growth characteristics and competitive abilities of a nucleopolyhedrovirus and an entomopoxvirus in larvae of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biol. Control.* 23, 96-105.
- Jaronski, S.T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl.* 55, 159-185.
- Jiménez-Medina, J., 1999. Evaluación de hongos aislados de acrídidos en el "área de reserva" de La Serena para el control de las plagas de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815). Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Jiménez-Medina, J., Aldebis, H.K., Santiago-Álvarez, C., 1998. Valoración insecticida de diversos aislados de hongos hifomicetos para el control de la langosta mediterránea, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg). *Bol. San. Veg. Plagas.* 24, 867-872.
- Keyser, C.A., Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Roberts, D.W., 2014. Heat-induced post-stress growth delay: a biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy? *J. Invertebr. Pathol.* 120, 67-73.
- Klass, J.I., Blandford, S., Thomas, M.B., 2007. Development of a model for evaluating the effects of environmental temperature and thermal behaviour on biological control of locusts and grasshoppers using pathogens. *Agric. Forest Entomol.* 9, 189-199.
- Klinger, E.G., Vojvodic, S., DeGrandi-Hoffman, G., Welker, D.L., James, R.R., 2015. Mixed infections reveal virulence differences between host-specific bee pathogens. *J. Invertebr. Pathol.* 129, 28-35.
- Kluger, M.J., Kozak, W., Conn, C.A., Leon, L.R., Soszynski, D., 1996. The adaptive value of fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10, 1-20.
- Lacey, L.A., 2017. Entomopathogens used as microbial control agents, en: Lacey, L. (Ed.), *Microbial control of insect and mite pests*. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp. 3-12.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 1-41.

- Lapazarán, J.C., 1925. La plaga de langosta en la región aragonesa (decenio 1914-1924). Consejo Provincial de Fomento de Zaragoza, Zaragoza.
- Latchininsky, A.V., 1998. Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815): a faunistic rarity or an important economic pest? *J. Insect Conserv.* 2, 167-178.
- Latchininsky, A.V., 2017. Locusts, en, Reference module in life sciences. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.01204-8>.
- Latchininsky, A.V., Launois-Luong, M.H., 1992. Le criquet marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) dans la partie orientale de son aire de distribution. Etude monographique a L'ex-URSS et aux pays proches. CIRAD-PRIFAS, Montpellier/VIZR: Saint-Petersbourg.
- Lecuona, R.E., Berretta, M., Grau, O., 1996. Differential features of ten strains of *Beauveria Bassiana* isolated from a single adult of *Nezara Viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Cordoba University, Cordoba, Spain, pp. 47.
- Lipa, J.J., Hernández-Crespo, P., Santiago-Álvarez, C., 1996. Gregarines (Eugregarinorida, Apicomplexa) in natural-populations of *Dociostaurus maroccanus*, *Calliptamus italicus* and other Orthoptera. *Acta Protozool.* 35, 49-59.
- Lockwood, J.A., Sprecher, R.A., Schell, S.P., 2002. When less is more: optimization of reduced agent-area treatments (RAATs) for management of rangeland grasshoppers. *Crop Prot.* 21, 551-562.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 667-702.
- MacLeod, D.M., Müller-Köglert, E., 1973. Entomogenous fungi: *Entomophthora* species with pear-shaped to almost spherical conidia (Entomophthorales: Entomophthoraceae). *Mycologia.* 64, 823-893.
- Malakar, R., Elkinton, J.S., Hajek, A.E., Burand, J.P., 1999. Within-host interactions of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J. Invertebr. Pathol.* 73, 91-100.
- MAPA, 2019. Registro de productos fitosanitarios. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>
- Merton, F.H., 1959. Studies in the ecology of the Moroccan locust (*Dociostaurus maroccanus* Thunberg) in Cyprus. *Anti-Locust Bull.* 34, 1-123.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Russell, T.L., 2009. Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malar. J.* 8, 12.
- Mohammadbeigi, A., Port, G., 2015. Effect of infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the feeding of *Uvarovistia zebra*. *J. Insect. Sci.* 15, 88.
- Moore, D., Reed, M., Le Patourel, G., Abraham, Y.J., Prior, C., 1992. Reduction of feeding by the desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 304-307.
- Morales-Agacino, E., 1941. El género *Dociostaurus* en España. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agric.* 10, 341-360.

- Moreno-Márquez, V., 1940. La langosta y las roturaciones. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 9, 145-153.
- Moreno-Márquez, V., 1942. Dos formas de langosta común o marroquí (*Docioctaurus maroccanus* Thunb.), reveladas biométricamente. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 11, 155-178.
- Moreno-Márquez, V., 1943. Observaciones sobre la oviposición de *Docioctaurus maroccanus* (Thunb.). Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 12, 107-123.
- Moreno-Márquez, V., 1944. Zonas permanentes de la langosta en España I: Boceto ecológico de La Serena. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 13, 335-376.
- Moreno-Márquez, V., 1946. Orientaciones para la localización de focos gregarígenos del *Docioctaurus maroccanus*. Bol. Pat. Veg. Ent. Agric. 14, 237-252.
- Navarro, L., 1901. Medios naturales de extinción de la plaga de la langosta. Memoria de la Campaña contra la langosta, 1900-1901. M<sup>o</sup> Agric., Ind., Com. y O.P., Madrid.
- Navarro, L., 1923. Plagas de langosta. Catecismos del agricultor y del ganadero. Serie V. Pat. Veg. N<sup>o</sup> 7-8.
- Navas, L.S.J., 1922. Medios naturales de defensa contra la langosta. Rev. Acad. Ciencias de Zaragoza. 7, 94-118.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C.J., 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia. 137, 37-43.
- Ouedraogo, R.M., Cusson, M., Goettel, M.S., Brodeur, J., 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. J. Invertebr. Pathol. 82, 103-109.
- Ouedraogo, R.M., Goettel, M.S., Brodeur, J., 2004. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. Oecologia. 138, 312-319.
- Pascual, F., Barranco, P., 2013. Los ortópteros y dermápteros (Orthoptera y Dermaptera), en: Ruano, F., et al. (Eds.), Los insectos de Sierra Nevada: 200 años de historia. Asociación Española de Entomología, España, pp. 141-155.
- Pauli, G., Mascarín, G.M., Eilenberg, J., Delalibera, I., 2018. Within-host competition between two entomopathogenic fungi and a granulovirus in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insects. 9, 64.
- Pelizza, S.A., Mariottini, Y., Russo, M.L., Cabello, M.N., Lange, C.E., 2013. Survival and fecundity of *Dichroplus maculipennis* and *Ronderosia bergi* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) following infection by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) under laboratory conditions. Biocontrol Sci. Technol. 23, 701-710.
- Peña, F.d.I., 1941. La campaña contra la langosta en 1939-1940. Dir. Gral. de Agricultura. Servicio de lucha contra la langosta. Public. N<sup>o</sup> 8.
- Peña, F.d.I., 1942. Presente y futuro de la plaga de langosta en España. Dir. Gral. de Agricultura. Servicio de lucha contra la langosta. Public. N<sup>o</sup> 16.
- Pener, M.P., Simpson, S.J., 2009. Locust phase polyphenism: an update, en: Simpson, S. J., Casas, J. (Eds.), Advances in Insect Physiology, Vol 36. Academic Press Ltd, London, UK, pp. 1-272.
- Peveling, R., 2001. Environmental conservation and locust control — possible conflicts and solutions. J. Orthoptera Res. 10, 171-187.
- Presa, J.J., García, M.D., Clemente, M.E., 2007. Catalogue of Orthoptera Caelifera from the Iberian Peninsula and Balearic Islands (Orthoptera: Caelifera). J. Orthoptera Res. 16, 175-179.

- Quesada-Moraga, E., 1998. Biología y ecología de la reproducción y desarrollo embrionario de la langosta mediterránea *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) y su posible interferencia como estrategia de lucha. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E.A.A., Valverde-García, P., Santiago-Álvarez, C., 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialetrodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biol. Control*. 36, 274-287.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 1999. Inducción de la salida de la diapausa en la langosta mediterránea *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *J. Orthoptera Res.* 8, 13-16.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2000a. The susceptibility of *Dociostaurus maroccanus* (Orthoptera:Acrididae) nymphs to a Spanish isolate of *Steinernema* sp. (glaseri group). *IOBC wprs Bull.* 23, 41-46.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2000b. Temperature-related effects on embryonic-development of the Mediterranean locust, *Dociostaurus maroccanus*. *Physiol. Entomol.* 25, 191-195.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2001a. Assessment of sexual maturation in the Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg). *J. Orthoptera Res.* 10, 1-8.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2001b. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 183-186.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2001c. Rearing and breeding of the Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthop., Acrididae) under laboratory conditions. *J. Appl. Entomol.-Z. Angew. Entomol.* 125, 121-124.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2003. Screening *Bacillus thuringiensis* strains with activity against *Dociostaurus maroccanus* (Orthoptera: Acrididae). *IOBC wprs Bull.* 26, 209-213.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2008. Hongos entomopatógenos, en: Jacas, J., Urbaneja, A. (Eds.), *Control biológico de plagas agrícolas*. Phytoma, Spain, pp. 98-120.
- Rakus, K., Ronsmans, M., Vanderplasschen, A., 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 84-91.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 331-357.
- Sangbaramou, R., Camara, I., Huang, X.Z., Shen, J., Tan, S.Q., Shi, W.P., 2018. Behavioral thermoregulation in *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae) in response to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Plos One.* 13, 19.
- Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E., Hernández-Crespo, P., 2003. Diapause termination and postdiapause development in the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus* (Orthoptera: Acrididae) under field conditions. *J. App. Entomol.* 127, 369-373.
- Santiago-Álvarez, C., Valverde-García, P., Quesada-Moraga, E., 2008. El control biológico de langostas y saltamontes, en: Jacas, J., Urbaneja, A. (Eds.), *Control biológico de plagas agrícolas*. Phytoma, España, pp. 165-178.
- Schjorring, S., Koella, J.C., 2003. Sub-lethal effects of pathogens can lead to the evolution of lower virulence in multiple infections. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 270, 189-193.

- Schmidt, F.G.V., Conceição, P.D., Benito, N.P., Lopes, R.B., 2018. Susceptibility of three orthopteran species to infection by *Metarhizium acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 38, 1-5.
- Seyoum, E., Moore, D., Charnley, A.K., 1994. Reduction in flight activity and food consumption by the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskål (Orth., Cyrtacanthacrinae), after infection with *Metarhizium flavoviride*. *J. Appl. Entomol.-Z. Angew. Entomol.* 118, 310-315.
- Shah, P.A., Douro-Kpindou, O.K., Sidibe, A., Daffe, C.O., Van der Pauuw, H., Lomer, C.J., 1998. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera : Acrididae) in Mali, West Africa. *Biocontrol Sci. Technol.* 8, 357-364.
- Shah, P.A., Kooyman, C., Paraiso, A., 1997. surveys for fungal pathogens of locusts and grasshoppers in Africa and the Near East. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171, 27-35.
- Shang, Y.F., Duan, Z.B., Huang, W., Gao, Q., Wang, C.S., 2012. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 105-109.
- Sieglaff, D.H., Pereira, R.M., Capinera, J.L., 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) to *Schistocerca americana* (Orthoptera : Acrididae). *J. Econ. Entomol.* 90, 1539-1545.
- Smith, D.I., Lockwood, J.A., Latchininsky, A.V., Legg, D.E., 2006. Changes in non-target arthropod populations following application of liquid bait formulations of insecticides for control of rangeland grasshoppers. *Int. J. Pest Manage.* 52, 125-139.
- Solter, L.F., Becnel, J.J., Oi, D.H., 2012. Microsporidian Entomopathogens, en: Vega, F., Kaya, H. K. (Eds.), *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 221-263.
- Song, H., 2005. Phylogenetic perspectives on the evolution of locust phase polyphenism. *J. Orthoptera Res.* 14, 235-245.
- Song, H., 2011. Density-dependent phase polyphenism in nonmodel locusts: a minireview. *Psyche*. 2011, 16 pp.
- Steinhaus, E.A., 1951. Report on diagnoses of diseased insects, 1944-1950. *Hilgardia*. 20, 629-678.
- Stride, B., Shah, A., Sadeed, S.M., 2003. Recent history of Moroccan locust control and implementation of mechanical control methods in northern Afghanistan. *Int. J. Pest Manage.* 49, 265-270.
- Thomas, M.B., Blandford, S., Gbongboui, C., Lomer, C.J., 1998. Experimental studies to evaluate spray applications of a mycoinsecticide against the rice grasshopper, *Hieroglyphus daganensis*, in Northern Benin. *Entomol. Exp. Appl.* 87, 93-102.
- Thomas, M.B., Blandford, S., Lomer, C.J., 1997. Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 327-334.
- Tseng, M.N., Chung, P.C., Tzean, S.S., 2011. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4508-4519.
- Uvarov, B.P., 1921. A revision of the Genus *Locusta*, L. (= *Pachytylus*, Fieb.), with a new theory as to the periodicity and migrations of locusts. *Bull. Entomol. Res.* 12, 135-163.

- 
- Uvarov, B.P., 1977. Behaviour, ecology, biogeography, population dynamics, en, Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology, vol II. Centre for Overseas Pest Research, London, UK.
- Vázquez-Lesmes, R., Santiago-Álvarez, C., 1993. Las plagas de langosta en Córdoba. Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. Colección Mayor, Córdoba.
- Vega, F.E., Kaya, H.K., 2012. Insect Pathology. 2nd ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Vojvodic, S., Boomsma, J.J., Eilenberg, J., Jensen, A.B., 2012. Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. *Front. Zool.* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-5>.
- Wang, J.B., St Leger, R.J., Wang, C., 2016. Advances in genomics of entomopathogenic fungi. *Adv. Genet.* 94, 67-105.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J., Galaini-Wraight, S., 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control.* 17, 203-217.
- Yeo, H., Pell, J.K., Alderson, P.G., Clark, S.J., Pye, B.J., 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag. Sci.* 59, 156-165.
- Zelazny, B., Goettel, M.S., Keller, B., 1997. The potential of bacteria for the microbial control of grasshoppers and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171, 147-156.
- Zhang, L., Lecoq, M., Latchininsky, A., Hunter, D., 2019. Locust and grasshopper management. *Annu. Rev. Entomol.* 64, 15-34.



Este capítulo es una versión adaptada del artículo:

BioControl (2018) 63:819–831  
<https://doi.org/10.1007/s10526-018-9904-6>



### Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* control

Pablo Valverde-García · Cándido Santiago-Alvarez · Matthew B. Thomas ·  
Inmaculada Garrido-Jurado · Enrique Quesada-Moraga

Received: 24 March 2018 / Accepted: 21 August 2018 / Published online: 30 August 2018  
© International Organization for Biological Control (IOBC) 2018

**Abstract** Strains IMI 330189 of *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber (Hypocreales: Clavicipitaceae) and EABb 90/2-Dm of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) are a promising biocontrol tool of *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae), although the effects of thermoregulation and Moroccan locust-fever on the infection process of these fungi remain unknown. In vitro experiments, measuring conidial germination and hyphal growth either at constant or at fluctuating temperatures simulating thermoregulatory conditions, indicated that

strain IMI 330189 had greater fitness at temperatures above 27 °C and the strain EABb 90/2-Dm was better adapted to the temperature range of 10–25 °C. These effects were mirrored in vivo, where locust thermoregulation caused a marked reduction in the virulence of EABb 90/2-Dm in comparison to no thermoregulation conditions (average survival time: 6.10 vs. 15.83 days; mortality: 100% vs. 73.7%) but only a moderate reduction in the virulence of IMI 330189 (average survival time: 4.57 vs. 8.26 days; mortality: 100% vs. 100%). Thermal gradient experiments revealed that the strain IMI 330189 induced behavioral fever in *D. maroccanus* (preferred temperatures approximately 4 °C above the uninfected control), although it only led to a slight reduction in virulence. Strain EABb 90/2-Dm did not induce such a clear behavioral response. Under the temperature conditions of the main breeding areas of the Moroccan locust, strain IMI 330189 is likely a better candidate for use in biocontrol, although strain EABb 90/2-Dm could be also a good alternative in more temperate environments either as a stand-alone one or in mixed combinations of the two fungal strains, potentially providing more effective control over a broader range of temperatures.

Handling Editor: Helen Roy.

P. Valverde-García (✉) · C. Santiago-Alvarez ·  
I. Garrido-Jurado · E. Quesada-Moraga  
Department of Agricultural and Forestry Sciences,  
ETSIAM, University of Cordoba, Building C4, Campus of  
Rabanales, 14071 Cordoba, Spain  
e-mail: cr2vagap@uco.es

C. Santiago-Alvarez  
e-mail: cr1saalc@uco.es

I. Garrido-Jurado  
e-mail: g72gajui@uco.es

E. Quesada-Moraga  
e-mail: cr2qumoc@uco.es

M. B. Thomas  
Center for Infectious Disease Dynamics and Department  
of Entomology, 001 Chemical Ecology Lab, Penn State,  
University Park, PA 16802, USA  
e-mail: mbt13@psu.edu

**Keywords** *Metarhizium acridum* · *Beauveria bassiana* · Thermoregulation · Locust · Fever





## CAPÍTULO III

Este capítulo es una versión adaptada del artículo:

*Ecology Letters*, (2003) 6: 183–188

### LETTER

## Mixed infections and insect–pathogen interactions

Matthew B. Thomas<sup>1,2\*</sup>, Emma L. Watson<sup>2</sup> and Pablo Valverde-García<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Agricultural Sciences, Imperial College, Wye, Kent TN25 5AH, UK*

<sup>2</sup>*Centre for Population Biology, Imperial College, Silwood Park, Ascot, Berks SL5 7PY, UK*

<sup>3</sup>*Entomología Agrícola, Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apartado 3048, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14080 Córdoba, Spain*

\*Correspondence: E-mail: m.thomas@ic.ac.uk

### Abstract

Most studies of insect–pathogen interactions consider the direct interaction between one disease agent and one species of host. However, given that hosts are subject to challenge from many pathogen/parasite species, mixed infections are probably common. In this study, using the desert locust and two species of fungal entomopathogen, we show how mixed infection with a largely avirulent pathogen can alter the virulence and reproduction of a second, highly virulent pathogen. We find that two strains of the avirulent pathogen vary in their interaction with the virulent pathogen, depending on the order of infection and environmental conditions. We propose that avirulent pathogens, which have largely been overlooked to date, could play a significant role in host–pathogen dynamics, with implications for biological control and evolution of virulence.

### Keywords

Biocontrol, disease dynamics, fungal entomopathogens, insect–pathogen interactions, locusts and grasshoppers, mixed infection, super infection, virulence.

*Ecology Letters* (2003) 6: 183–188



## CAPÍTULO IV

Este capítulo es una versión adaptada del artículo:

Journal of Invertebrate Pathology 161 (2019) 61–69



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)



### Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, *Doclostaurus maroccanus*



Pablo Valverde-García<sup>a,\*</sup>, Cándido Santiago-Álvarez<sup>a</sup>, Matthew B. Thomas<sup>b</sup>,  
Elizabeth A.A. Maranhão<sup>c</sup>, Inmaculada Garrido-Jurado<sup>a</sup>, Enrique Quesada-Moraga<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Building C4, Campus of Rabanales, 14071 Cordoba, Spain

<sup>b</sup> Center for Infectious Disease Dynamics and Department of Entomology, 001 Chemical Ecology Lab, Penn State, University Park, PA 16802, USA

<sup>c</sup> Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA, Cx Postal 03, CEP 55602-420 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

*Metarhizium acridum*  
*Beauveria bassiana*  
Locust  
Mixed infections  
Feeding  
Reproduction  
Thermoregulation

#### ABSTRACT

The effects of single and mixed infections with *Beauveria bassiana* (EABb 90/2-Dm) and *Metarhizium acridum* (IMI 330189) strains on survival, feeding and reproduction of thermoregulating *Doclostaurus maroccanus* were evaluated. Adult locusts (2–3 days post fledging) were treated with low dosages of both fungal pathogens alone and in mixture (total dosage for single treatments and combinations =  $1 \times 10^2$  and  $1 \times 10^3$  spores per insect). *M. acridum* IMI 330189 was more virulent than *B. bassiana* EABb 90/2-Dm at both dosages. In the mixed infections, in which half of the infective units of the more virulent pathogen were replaced by the less virulent pathogen, the analysis of the cumulative insect mortality after 30 days suggested additive interaction in the lethal effects between the two strains. All fungal treatments, except EABb 90/2-Dm at  $1 \times 10^2$  spores per insect showed reduction in *per capita* feeding, as indicated by fecal production per insect per day when insects were maintained at  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  (32–51% of reduction compared with the control); but only IMI 330189 caused significant reduction in *per capita* feeding (50%) when those insects were allowed to thermoregulate. Both strains and their mixtures caused a significant reduction of locust fecundity, with a 21–53% reduction in the number of egg-pods per female, and 30–65% reduction in the number of fertile eggs per female. In both sublethal effects (feeding and fecundity) a potential antagonistic interaction between the fungal strains was detected. Locust fecundity (egg-pods per female) and *per capita* feeding were positively correlated ( $r = 0.783$ ). Implications of these findings on the potential use of both strains to control *D. maroccanus* populations are discussed.



## **CAPÍTULO V: Discusión General**



El control preventivo de *D. maroccanus* para impedir la transformación de la fase solitaria en la gregaria en sus zonas de reserva peninsulares, ecosistemas esteparios muy sensibles en los niveles ecológico y ambiental, ha evolucionado en los últimos 70 años desde el uso de insecticidas químicos de amplio espectro, hacia medidas más adaptadas a estos requisitos ecológicos. Entre ellas, destacan los hongos ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs), una de las herramientas de biocontrol más adaptadas y desarrolladas comercialmente para el control de langostas y saltamontes en el mundo (de Faria y Wraight, 2007; Lomer et al., 2001; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Vega y Kaya, 2012; Zhang et al., 2019). Los AMEs presentan ventajas tanto por su modo de acción por contacto, como por su presencia natural en las poblaciones de acrídidos, en particular, en las de *D. maroccanus*, de donde procede la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana*, que junto a la cepa IMI 330189 de *M. acridum*, han mostrado eficacia para el control de la langosta mediterránea o marroquí en condiciones de laboratorio y campo (Jiménez-Medina, 1999; Jiménez-Medina et al., 1998; Quesada-Moraga, 1998).

En animales ectotérmicos, como los acrídidos, se ha demostrado la existencia de termorregulación, mediante la exposición de sus cuerpos a la acción directa de la radiación solar, y además, las langostas experimentan el proceso fisiológico denominado fiebre comportamental, que origina una elevación adicional de su temperatura corporal para frenar el proceso infeccioso iniciado por el hongo (Blanford et al., 1998; Clancy et al., 2018; Elliot et al., 2002; Inglis et al., 1996; Ouedraogo et al., 2004; Sangbaramou et al., 2018). Este comportamiento hace necesario que las cepas fúngicas seleccionadas para el control de plagas de langosta deban unir a su virulencia, su competencia ambiental, para estar adaptadas no solo a las condiciones climáticas (temperatura, humedad, o radiación UV-B) prevalentes en el ecosistema donde se van a utilizar, sino también a las propias del insecto hospedante, como la termorregulación y la fiebre comportamental (Jackson y O'Callahan, 1997), y que pueden alterar la eficacia de los AMEs, aspecto crucial al que trata de responder esta Tesis Doctoral.

El **Capítulo II** pone de manifiesto que las cepas EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* e IMI 330189 de *M. acridum*, cuya virulencia en laboratorio frente a *D. maroccanus* es semejante, presentan requisitos térmicos diferentes en regímenes constantes y variables de temperatura *in vitro*, con adaptación a temperaturas en el rango de 10– 25 °C en la primera, y superiores a 27 °C en la segunda. Esta distinta adaptación a la temperatura permite explicar las diferencias en la actividad de ambas cepas al aplicarlas sobre el acrídido en condiciones reales de termorregulación *in vivo*, donde se detectan



reducciones severa y moderada de la virulencia (tiempo medio de supervivencia) de las cepas EABb 90/2-Dm y IMI 330189 de *M. acridum* respectivamente, que no ocurren en condiciones de ausencia de termorregulación. Además, los experimentos con gradientes térmicos revelan que la cepa IMI 330189 de *M. acridum* induce fiebre en *D. maroccanus*, aunque mantiene su virulencia, mientras que la cepa EABb 90/2-Dm no induce este fenómeno comportamental. Estos aspectos asociados a la termorregulación y a la fiebre comportamental, inéditos en la langosta mediterránea o marroquí, han sido descritos anteriormente en langostas y saltamontes (Blanford et al., 1998; Clancy et al., 2018; Elliot et al., 2002; Inglis et al., 1996; Ouedraogo et al., 2004; Sangbaramou et al., 2018).

Ante este escenario, se ha propuesto la posible co-formulación de cepas fúngicas con distintos requisitos térmicos para garantizar la infección, tanto en periodos de máxima exposición a la radiación solar (termorregulación) como durante la noche y las primeras horas de la mañana (Inglis et al., 1997; Lacey et al., 2015). En concreto, la co-formulación de las dos cepas seleccionadas en esta Tesis podría permitir un solape de actividad diaria frente al acrídido en sus áreas de reserva de la Península Ibérica en primavera-verano, la cepa de *M. acridum* desde, aproximadamente, las 12:00 a las 19:00 de un día, en condiciones de máxima insolación y temperatura, y la de *B. bassiana* desde las 19:00 hasta las 12:00 del día siguiente, con temperaturas más moderadas. La compatibilidad de ambas cepas en tratamientos conjuntos y su repercusión sobre el proceso infectivo en condiciones de termorregulación se han abordado en los Capítulos III y IV de la Tesis Doctoral.

El **Capítulo III** sienta las bases de la estrategia de co-formulación, y refleja que la eficacia de una cepa de un hongo entomopatógeno aplicada por inundación puede verse modificada por su interacción con otras cepas que infectan de forma natural al insecto diana. Así, bajo condiciones de temperatura constante de 30 °C, la cepa de mayor óptimo térmico, IMI 330189 de *M. acridum*, manifiesta su máxima virulencia frente a *S. gregaria*. La co-formulación con las cepas de *B. bassiana*, prácticamente avirulentas y de menores óptimos térmicos, no contribuye a mayores niveles de virulencia. Sin embargo, cuando el régimen térmico simuló condiciones de termorregulación (20 °C durante 10 h por la noche, seguidas por un incremento gradual de la temperatura hasta un máximo de 42 °C durante 4 horas al día), la infección mixta de *M. acridum* con una de las cepas de *B. bassiana* mejoró la virulencia de ambas cepas con una interacción sinérgica, que desapareció al reestablecer un régimen de temperatura constante. Este efecto sinérgico, podría atribuirse a la extensión del proceso infectivo del insecto por parte del hongo

---

entomopatógeno durante un mayor número de horas diario, cada cepa durante su intervalo óptimo; también, a un menoscabo recíproco del sistema defensivo del insecto por cada cepa (Gillespie et al., 1997; Hajek y Stleger, 1994; Hung et al., 1993; Vojvodic et al., 2012).

El **Capítulo IV** profundiza en la estrategia de co-formulación de las cepas seleccionadas, y su impacto no solo en la mortalidad del insecto, sino también en su alimentación y reproducción. De nuevo, y con independencia de la dosis, la cepa *M. acridum* IMI 330189 presenta una mayor virulencia en condiciones de temperatura constante, aunque la co-formulación con la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* tiene un efecto letal aditivo en condiciones de termorregulación. La interacción de tipo aditivo entre microorganismos entomopatógenos ha sido detectada en numerosos estudios recientes (de Azevedo et al., 2017; Dos Santos et al., 2006; Mantzoukas et al., 2013; Pauli et al., 2018; Tounou et al., 2008; Wakil et al., 2017; Wu et al., 2014). Este efecto aditivo es también reflejado por la ausencia de zonas de inhibición entre las cepas EABb 90/2-Dm y IMI 330189 en cultivos duales, tanto en el crecimiento fúngico de la mezcla como en cultivo dual de ambos hongos.

El régimen de temperatura, constante o termorregulación, tuvo influencia en los efectos subletales observados. La infección con las cepas EABb 90/2-Dm y IMI 330189, aplicadas tanto individualmente como en mezcla, se traduce en una reducción significativa del 32-51% del consumo *per capita* en régimen de temperatura constante, lo que, en condiciones de termorregulación, solo ocurrió con la cepa IMI 330189, que causó una reducción significativa en la alimentación *per capita* (50%). La infección también causó una reducción significativa de la fecundidad de *D. maroccanus* del 21-53%, efecto subletal que fue menos marcado en *S. gregaria* infectada con IMI 330189 (Blanford y Thomas, 2001), aunque la reducción de la fecundidad causada por *B. bassiana* y *M. acridum* ha sido descrita en otros acrididos y ortopteroides (El-Maghraby et al., 2009; Pelizza et al., 2013; Quesada-Moraga et al., 2004). La existencia de una reducción de la fecundidad con el factor de mortalidad incluido, apunta a la reducción de los recursos del hospedante para la maduración de los huevos como consecuencia de la infección fúngica (Kaur et al., 2011; Roy et al., 2006). De hecho, existió una alta correlación lineal entre fecundidad (número de ootecas por hembra) y alimentación *per capita* ( $r = 0.783$ ). Igualmente, se detectó una reducción significativa de la fertilidad de huevos debido a la infección por ambas cepas y por su mezcla, aspecto que no había sido evaluado previamente en otros estudios similares (Arthurs y Thomas, 2000; Blanford y Thomas,

2001; El-Maghraby et al., 2009; Pelizza et al., 2013). Cuando se comparó la reducción en la alimentación y en la fecundidad entre *M. acridum* IMI 330189 y la mezcla con similar dosis de esta cepa, se observó una potencial interacción antagonista en los efectos subletales entre EABb 90/2-Dm y IMI 330189, que podría indicar una interacción cooperativa entre los patógenos cuando los recursos del hospedante son compartidos, resultando en una infrautilización de éste (Schjorring y Koella, 2003; Vojvodic et al., 2012). No obstante, los efectos combinados de la reducción de fecundidad y fertilidad en los distintos tratamientos disminuyeron el potencial biótico de *D. maroccanus* entre un 30-65%.

Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la cepa IMI 330189 de *M. acridum* es más tolerante a las altas temperaturas y a la termorregulación comportamental que *B. bassiana* (EABb 90/2-Dm); la primera cepa expresa su virulencia incluso después de inducir fiebre comportamental. Bajo las condiciones de temperatura existentes en La Serena y otras áreas de reserva del territorio nacional -en La Serena las temperaturas máximas diarias exceden los 40 °C y las mínimas alcanzan valores por debajo de 20 °C (Klass et al., 2007)-*M. acridum* (IMI 330189) es posiblemente un mejor candidato para su uso en control biológico, aunque la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* ha mostrado mayor crecimiento fúngico que la cepa IMI 330189 de *M. acridum* a temperaturas más templadas. No obstante, estas dos cepas podrían ser combinadas en un producto bioinsecticida, que podría ser utilizado en un mayor rango de condiciones ambientales. Dosis reducidas de ambas cepas y su mezcla indujeron efectos subletales (en alimentación y reproducción) en *D. maroccanus* en condiciones de termorregulación, lo que debe unirse a la mortalidad directa para estimar el impacto global del tratamiento, y acerca su eficacia a la de los insecticidas químicos de síntesis. La cepa EABb 90/2-Dm regula de forma natural las poblaciones de *D. maroccanus* en el área de reserva de La Serena, y es una excelente candidata para el desarrollo de un micoinsecticida comercial para su control, por lo que hay que dirigir nuestro esfuerzo a evaluar su co-formulación con la cepa IMI 330189 de *M. acridum* en condiciones de campo.

---

**Referencias**

- Arthurs, S., Thomas, M.B., 2000. Effects of a mycoinsecticide on feeding and fecundity of the brown locust *Locustana pardalina*. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 321-329.
- Blanford, S., Thomas, M.B., 2001. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 1-8.
- Blanford, S., Thomas, M.B., Langewald, J., 1998. Behavioral fever in the Senegalese grasshopper, *Oedaleus senegalensis*, and its implications for biological control using pathogens. *Ecol. Entomol.* 23, 9-14.
- Clancy, L.M., Jones, R., Cooper, A.L., Griffith, G.W., Santer, R.D., 2018. Dose-dependent behavioural fever responses in desert locusts challenged with the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Sci. Rep.* 8, art. no. : 14222.
- de Azevedo, A.G.C., Steinwender, B.M., Eilenberg, J., Sigsgaard, L., 2017. Interactions among the predatory midge *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae), the fungal pathogen *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales), and maize-infesting aphids in greenhouse mesocosms. *Insects.* 8.
- de Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.* 43, 237-256.
- Dos Santos, H.J.G., Marques, E.J., Barros, R., Gondim, M.G.C., 2006. Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera : Eulophidae) with larvae of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera : Plutellidae). *Neotrop. Entomol.* 35, 241-245.
- El-Maghraby, M.M.A., Gomaa, E.A., Metaweh, H.H., Abdelatef, G.M., 2009. Susceptibility of *Schistocerca gregaria* (Forskål) and *Euprepocnemis plorans* (Charpentier) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metchnikoff) Soroken, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Nosema locustae* Canning. *Egypt. J. Biol. Pest Co.* 19, 55-61.
- Elliot, S.L., Blanford, S., Thomas, M.B., 2002. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 269, 1599-1607.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 611-643.
- Hajek, A.E., Stleger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 293-322.
- Hung, S.Y., Boucias, D.G., Vey, A.J., 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 179-187.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Cheng, K.J., Goettel, M.S., 1997. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. *Biol. Control.* 8, 143-152.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S., 1996. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biol. Control.* 7, 131-139.
- Jackson, T.A., O'Callahan, M., 1997. Environmental competence an essential characteristic of successful microbial control agents for soil dwelling pests, en: Allsopp, P. G., et al. (Eds.), *Soil invertebrates in 1997*. BSES, Brisbane, Australia, pp. 74-77.

- Jiménez-Medina, J., 1999. Evaluación de hongos aislados de acrididos en el "área de reserva" de La Serena para el control de las plagas de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815). Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Jiménez-Medina, J., Aldebis, H.K., Santiago-Álvarez, C., 1998. Valoración insecticida de diversos aislados de hongos hifomicetos para el control de la langosta mediterránea, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg). Bol. San. Veg. Plagas. 24, 867-872.
- Kaur, S., Harminder, P.K., Kaur, K., Kaur, A., 2011. Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). J. Biopest. 4, 161-168.
- Klass, J.I., Blanford, S., Thomas, M.B., 2007. Development of a model for evaluating the effects of environmental temperature and thermal behaviour on biological control of locusts and grasshoppers using pathogens. Agric. Forest Entomol. 9, 189-199.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. J. Invertebr. Pathol. 132, 1-41.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Annu. Rev. Entomol. 46, 667-702.
- Mantzoukas, S., Milonas, P., Kontodimas, D., Angelopoulos, K., 2013. Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Microbiol. 63, 1083-1091.
- Ouedraogo, R.M., Goettel, M.S., Brodeur, J., 2004. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. Oecologia. 138, 312-319.
- Pauli, G., Mascarin, G.M., Eilenberg, J., Delalibera, I., 2018. Within-host competition between two entomopathogenic fungi and a granulovirus in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insects. 9, 64.
- Pelizza, S.A., Mariottini, Y., Russo, M.L., Cabello, M.N., Lange, C.E., 2013. Survival and fecundity of *Dichroplus maculipennis* and *Ronderosia bergi* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplineae) following infection by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) under laboratory conditions. Biocontrol Sci. Technol. 23, 701-710.
- Quesada-Moraga, E., 1998. Biología y ecología de la reproducción y desarrollo embrionario de la langosta mediterránea *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) y su posible interferencia como estrategia de lucha. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2008. Hongos entomopatógenos, en: Jacas, J., Urbaneja, A. (Eds.), Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma, Spain, pp. 98-120.
- Quesada-Moraga, E., Santos-Quiros, R., Valverde-García, P., Santiago-Álvarez, C., 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea : Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87, 51-58.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annu. Rev. Entomol. 51, 331-357.
- Sangbaramou, R., Camara, I., Huang, X.Z., Shen, J., Tan, S.Q., Shi, W.P., 2018. Behavioral thermoregulation in *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae) in response to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Plos One. 13, 19.

- 
- Schjorring, S., Koella, J.C., 2003. Sub-lethal effects of pathogens can lead to the evolution of lower virulence in multiple infections. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 270, 189-193.
- Tounou, A.K., Kooyman, C., Douro-Kplndou, O.K., Poehling, H.M., 2008. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 203-210.
- Vega, F.E., Kaya, H.K., 2012. *Insect Pathology*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Vojvodic, S., Boomsma, J.J., Eilenberg, J., Jensen, A.B., 2012. Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. *Front. Zool.* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-5>.
- Wakil, W., Yasin, M., Shapiro-Ilan, D., 2017. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Sci. Rep.* 7, art. number: 5971.
- Wu, S.H., Youngman, R.R., Kok, L.T., Laub, C.A., Pfeiffer, D.G., 2014. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. *Biol. Control.* 76, 65-73.
- Zhang, L., Lecoq, M., Latchininsky, A., Hunter, D., 2019. Locust and grasshopper management. *Annu. Rev. Entomol.* 64, 15-34.



## **CAPÍTULO VI: Conclusiones**





---

Las conclusiones 1 y 2 están obtenidas del Capítulo II "**Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust *Docioestaurus maroccanus* control**", artículo publicado en la revista Biocontrol (IP=1.924, 20/96, Q1 en Entomology). La conclusión 3 está obtenida del Capítulo III "**Mixed infections and insect-pathogen interactions**", artículo publicado en la revista Ecology Letters (IP=9,137, 4/160 en Ecology). Las conclusiones 4 y 5 están obtenidas del Capítulo IV "**Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, *Docioestaurus maroccanus***", artículo publicado en la revista Journal of Invertebrate Pathology (IP=2,511, 18/167, Q1 en Zoology).

1. Los requisitos térmicos de la cepa IMI 330189 de *M. acridum* están mejor adaptados a la fracción horaria de mayor temperatura/insolación en un régimen de termorregulación, mientras que la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* se comporta mejor en el periodo de menor temperatura/insolación, lo que promulga su posible empleo conjunto.
2. La cepa IMI 330189 de *M. acridum* indujo fiebre comportamental en *Docioestaurus maroccanus*, pero mantuvo su virulencia en condiciones de termorregulación, mientras que la cepa EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* no indujo esta respuesta comportamental de manera significativa.
3. Los resultados de las infecciones mixtas con la cepa IMI 330189 de *M. acridum* y dos cepas autóctonas de *B. bassiana*, aisladas de ortópteros del área de reserva de La Serena (Badajoz), en el hospedante modelo *S. gregaria*, ponen de manifiesto que la eficacia insecticida de un patógeno virulento puede verse modificada por la interacción con otros patógenos, incluso aunque estos sean avirulentos, con una respuesta aditiva, sinérgica o antagonista dependiendo de las condiciones ambientales, especialmente temperatura ambiental y termorregulación, y del orden de infección. Estas interacciones podrían contribuir a una variabilidad inesperada en la eficacia de un agente de control, dependiendo de la naturaleza de la comunidad microbiana autóctona de la zona.
4. Las infecciones individuales y mixtas con dosis reducidas de las cepas IMI 330189 de *M. acridum* IMI 330189 y EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* provocaron efectos

subletales en *D. maroccanus*, con una reducción de la alimentación *per capita*, así como de fecundidad y potencial biótico, que estuvieron condicionados por la termorregulación, efectos que deben sumarse a la mortalidad directa para estimar el efecto global del tratamiento y su comparación con el de los insecticidas químicos de síntesis.

5. La interacción aditiva en *D. maroccanus* entre las cepas IMI 330189 de *M. acridum* y EABb 90/2-Dm de *B. bassiana* resalta el potencial para su combinación como co-formulación en un producto bioinsecticida, que podría ser utilizado en un mayor rango de condiciones ambientales, si bien, esta compatibilidad debería ser evaluada en las condiciones de las áreas de reserva de *D. maroccanus* en España.

## **CAPÍTULO VII: Anexo**



---

## Curriculum Vitae del Doctorando

Pablo Valverde Garcia, Ingeniero Agrónomo, desarrolla su labor profesional como Investigador Científico en la empresa Corteva Agriscience (División agrícola de Dow-Dupont). En los últimos 10 años de su carrera, ha sido miembro del grupo de Estadística de dicha compañía, con residencia en Indianápolis (USA). En esta labor, Pablo es responsable del diseño experimental y análisis estadístico de numerosos experimentos, en campo y laboratorio, que dicha compañía realiza en países de todo el mundo. Estos experimentos son necesarios para la evaluación de la eficacia, impacto medioambiental y el registro de diversos productos para la protección de cultivos frente a plagas, enfermedades y malas hierbas.

Durante la realización del periodo de Investigación, en el cual se desarrollaron los experimentos que se incluyen en esta Tesis Doctoral, Pablo Valverde fue Ingeniero Agrónomo contratado por la Unidad de Entomología Agrícola de la Universidad de Córdoba en el proyecto *“Protecting biodiversity through the development of environmental sustainable locust and grasshopper control ESLOCO”* en colaboración con CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International) y NERC (Centre for Population Biology) Imperial College, UK. Fruto de esta colaboración, Pablo Valverde disfrutó de una estancia de 3 meses en NERC, Ascot-UK, que dio como fruto el artículo científico incluido en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral.

A lo largo de todos estos años, y debido a su experiencia en la Estadística Aplicada, Pablo ha tenido la oportunidad de colaborar regularmente con el Grupo de Investigación PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” que dirige el Profesor Enrique Quesada Moraga. Como fruto de esta colaboración, Pablo ha sido coautor en varios artículos científicos del grupo y también del capítulo del libro que ha sido utilizado como base en algunas secciones de la Introducción de esta Tesis Doctoral:

Santiago-Álvarez, C., **Valverde-García, P.**, Quesada-Moraga, E., 2008. El control biológico de langostas y saltamontes, en: Jacas, J., Urbaneja, A. (Eds.), Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma, España, pp. 165-178;

A continuación se enumeran diversas contribuciones científicas (SCI) realizadas durante su experiencia profesional y colaboración con la Unidad de Entomología Agrícola (incluyendo los artículos de esta Tesis):

- Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., Thomas, M.B., Maranhao, E.A.A., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., **2019**. Sublethal effects of mixed fungal infections on the Moroccan locust, *Dociostaurus maroccanus*. *J. Invertebr. Pathol.* 161, 61-69.
- Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., Thomas, M.B., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., **2018**. Comparative effects of temperature and thermoregulation on candidate strains of entomopathogenic fungi for Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* control. *BioControl.* 63, 819-831.
- Valverde-Garcia, P., Springer, T., Kramer, V., Foudoulakis, M., Wheeler, J.R., **2018**. An avian reproduction study historical control database: A tool for data interpretation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 92, 295-302.
- Knorr, E., Fishilevich, E., Tenbusch, L., Frey, M.L.F., Rangasamy, M., Billion, A., Worden, S.E., Gandra, P., Arora, K., Lo, W., Schulenberg, G., Valverde-Garcia, P., Vilcinskas, A., Narva, K.E., **2018**. Gene silencing in *Tribolium castaneum* as a tool for the targeted identification of candidate RNAi targets in crop pests. *Sci. Rep.* 8.
- Ouse, D.G., Gifford, J.M., Schleier, J., Simpson, D.D., Tank, H.H., Jennings, C.J., Annangudi, S.P., Valverde-Garcia, P., Masters, R.A., **2018**. A new approach to quantify herbicide volatility. *Weed Technol.* 32, 691-697.
- Yousef, M., Alba-Ramirez, C., Jurado, I.G., Mateu, J., Diaz, S.R., Valverde-Garcia, P., Quesada-Moraga, E., **2018**. *Metarhizium brunneum* (Ascomycota; Hypocreales) treatments targeting olive fly in the soil for sustainable crop production. *Front. Plant Sci.* 9.
- Fleming, C.R., Gartner, V., Valverde-Garcia, P., Geurs, P., Tiu, C., **2017**. Comprehensive analysis of the value of single versus multiple year (Season) crop residue data for establishment of maximum residue levels (MRLs). *J. Agric. Food Chem.* 65, 1784-1791.
- Fernández-Bravo, M., Flores-Leon, A., Calero-Lopez, S., Gutierrez-Sanchez, F., Valverde-Garcia, P., Quesada-Moraga, E., **2017**. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp strains. *J. Invertebr. Pathol.* 148, 142-151.
- Marques, L.H., Santos, A.C., Castro, B.A., Moscardini, V.F., Rossetto, J., Silva, O.A.N., Zobiole, L.H.S., Valverde-Garcia, P., Babcock, J.M., Storer, N.P., Rule, D.M., Fernandes, O.A., **2017**. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. *Crop Prot.* 96, 109-115.
- Fernández-Bravo, M., Garrido-Jurado, I., Valverde-Garcia, P., Enkerli, J., Quesada-Moraga, E., **2016**. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. *J. Invertebr. Pathol.* 141, 6-17.
- Marques, L.H., Castro, B.A., Rossetto, J., Silva, O., Moscardini, V.F., Zobiole, L.H.S., Santos, A.C., Valverde-Garcia, P., Babcock, J.M., Rule, D.M., Fernandes, O.A., **2016**. Efficacy of soybean's event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac to manage key

- tropical lepidopteran pests under field conditions in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 109, 1922-1928.
- Kemmitt, G., Valverde-Garcia, P., Hufnagl, A., Bacci, L., Zotz, A., **2015**. The impact of three commonly used fungicides on *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) in European vineyards. *J. Econ. Entomol.* 108, 611-620.
- Quesada-Moraga, E., Valverde-Garcia, P., Garrido-Jurado, I., **2012**. The effect of temperature and soil moisture on the development of the preimaginal Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 41, 966-970.
- Garrido-Jurado, I., Valverde-Garcia, P., Quesada-Moraga, E., **2011**. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Biol. Control.* 59, 366-372.
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E.A.A., Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., **2006**. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biol. Control.* 36, 274-287.
- Quesada-Moraga, E., Garcia-Tovar, E., Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., **2004**. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiol Res.* 159, 59-71.
- Quesada-Moraga, E., Santos-Quiros, R., Valverde-Garcia, P., Santiago-Álvarez, C., **2004**. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea : Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 87, 51-58.
- Thomas, M.B., Watson, E.L., Valverde-Garcia, P., **2003**. Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecol. Lett.* 6, 183-188.