



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos

Aroa Domínguez Cuadrado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

***COMUNICACIÓN QUÍMICA INTRAESPECÍFICA
EN *Dociostaurus maroccanus****

Capítulo 8

1. INTRODUCCIÓN

D. maroccanus es una especie de ortóptero perteneciente a la Familia Acrididae (Orden Orthoptera), comúnmente conocida como langosta mediterránea o langosta marroquí, que se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país, afectando a las comunidades de Andalucía, Aragón, Castilla la Mancha, Castilla y León, Extremadura, Madrid y Murcia, además de estar presente en varios países de la cuenca mediterránea de Europa, Asia y África (Arias Giralda et al., 1993; Baldachino et al., 2012). Es una especie polífaga que se alimenta de cultivos de cereal, alfalfa, hortalizas y de prácticamente todos los cultivos presentes en las zonas de invasión, atacando hojas, tallos y granos de leguminosas (FAO, 2006; Antonatos et al., 2013). Esta plaga es univoltina y posee capacidad migratoria (Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2001), y al igual que ocurre en otras especies de acrididos, puede cambiar de fase solitaria a gregaria en función de las características ambientales (Latchinsky, 1998), originando enjambres que contienen miles de individuos capaces de volar varios kilómetros y provocando grandes daños en multitud de cultivos debido a su voracidad. Ello conlleva la necesidad de utilización de grandes cantidades de insecticida en las zonas afectadas para prevenir la propagación de la plaga a áreas no infestadas. Estos tratamientos, aunque eficaces, resultan muy agresivos para el medio y la fauna presente, además de suponer un gran coste económico. En nuestro país el coste medio de los tratamientos para el control de *D. maroccanus* en el período 2004-2007 ascendió a 1.860.000 €/año (CPAGE 2004-2008). Se han desarrollado métodos para el control de plagas de langostas más respetuosos con el medio ambiente, basados en sustancias insecticidas con baja toxicidad para otros organismos, tratamientos atemporales y restringidos al menor área posible, y que abarcan desde compuestos organoclorados a espinosinas (Baldacchino et al., 2004). Otras técnicas respetuosas con el medio ambiente, como el uso de entomopatógenos, p.e. hongos de los géneros *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* (Crespo & Santiago-Álvarez, 1997; Jiménez-Medina et al., 1997), no ha llegado aún a la fase de aplicación práctica.

Se sabe que las feromonas son compuestos intraespecíficos, respetuosos con el medio ambiente y que se utilizan en muy pequeñas cantidades por lo que el uso de las mismas en control de plagas es altamente deseable, como se ha demostrado desde su descubrimiento en 1959. Los procesos de comunicación química en acrididos son poco o en absoluto conocidos, habiéndose realizado la mayoría de los estudios sobre *Schistocerca gregaria*. Nuestro equipo descubrió recientemente un compuesto que podría ser un posible componente de la feromona sexual de esta especie: el fital (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-enal), el cual es producido en patas y alas de machos adultos sexualmente maduros (Fürstenau et al., 2013). Este compuesto demostró ser activo en antenas de ambos sexos, además de resultar atractivo en bioensayos de doble elección sobre individuos de la propia especie. En este capítulo, se presentan nuevos estudios llevados a cabo con este compuesto y sus correspondientes estereoisómeros, con el fin de avanzar en el conocimiento sobre las feromonas de esta especie de langosta y de desarrollar nuevas alternativas específicas para el control de esta plaga y respetuosas con el medio ambiente.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

El esteroisómero 7R,11R del fital, identificado en extractos de patas y alas así como en volátiles de machos maduros (Fürstenau et al., 2013), y el resto de los esteroisómeros 7S,11R-fital, 7R,11S-fital y 7S,11S-fital (Figura 8.1) fueron sintetizados previamente en el laboratorio por la Dra. Elena Ramos. El compuesto racémico se incluyó también en los ensayos debido a su fácil preparación y bajo coste. Para los ensayos se prepararon diluciones de todos los compuestos en hexano con un 10% de BHT.

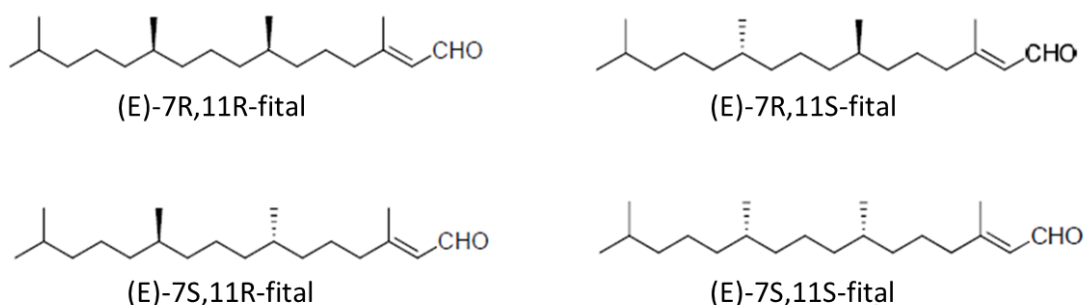


Figura 8. 1. Estructura química de los cuatro esteroisómeros del 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-enal o fital.

2.2. INSECTOS

Como se ha mencionado en el capítulo 3, no se ha podido desarrollar ningún método de cría de *D. maroccanus* debido al largo periodo embrionario que dura varios meses (Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2001), por lo que los insectos que se utilizaron para en los ensayos fueron capturados en el campo desde mayo hasta julio. Se recogieron ninfas y adultos de diversas edades procedentes de áreas infestadas de las comunidades de Aragón (Alhama de Aragón, Zaragoza), Extremadura (Mérida, Badajoz) y Castilla-León (Salamanca). Los insectos fueron enviados a Zaragoza donde fueron separados por sexo y edad por la Dra. M. del Milagro Coca (CITA). Los insectos sexados fueron enviados a Barcelona donde fueron mantenidos en jaulas de aluminio (50 x 50 x 50 cm), que poseían una apertura lateral para facilitar la introducción de los especímenes y una lámpara de luz blanca de 60 W para proporcionar una iluminación homogénea, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $50 \pm 10\%$ HR con un fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad en las instalaciones del IQAC destinadas para dicho fin. Todos los días, se humidificaron las jaulas y se suministró alimento fresco a los insectos, consistente en alfalfa, hojas de trigo, carrizo y otras poáceas, y se retiró el sobrante de días anteriores.

2.3. REALIZACIÓN DE EXTRACTOS

Se prepararon extractos de material biológico para determinar la presencia de fital en patas y heces de machos y hembras, ninfas y adultos de entre 0-40 días de edad, tanto vírgenes como copulados, así como en extractos de espuma y huevos.

Para ello, se aislaron los insectos según sexo y edad en recipientes de vidrio que se colocaron en una sala diferente de donde se almacenaba el resto de langostas durante 16 h. Transcurrido este periodo de tiempo, se recogieron 40 mg de heces con una espátula limpia y se les añadió 150 µl de hexano. Para los extractos de patas, se anestesiaron los insectos brevemente con CO₂ y se les extrajeron las patas traseras (N=30), las cuales fueron cortadas en pequeños fragmentos, y se les añadió 1000 µl de disolvente. Las muestras permanecieron sumergidas durante 60 min en hexano, momento en el cual se retiró cuidadosamente el disolvente que se depositó en un vial limpio. Todos los extractos se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis por GC-MS. Para la detección de fital, se inyectaron los extractos en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973, con el siguiente programa de temperatura: inyección a 50°C (1 min) e incremento de 3°C/min hasta los 300°C (5 min). La cantidad de fital se calculó por interpolación sobre una recta de calibración elaborada con distintas cantidades de R,R fital (1,2,5, 10 y 20 ng). La recta patrón resultante fue:

$$Y = 999287X - 3E^6; R^2 = 0,9846$$

donde “Y” el área del compuesto obtenido en el espectro de masas, y “X” es la cantidad de fital expresada en ng.

Se realizó el test estadístico de Kruskal-Wallis para conocer la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos, seguido de la prueba de U de Mann-Whitney para hallar diferencias dos a dos (P<0.05).

2.4. ENSAYOS DE ELECTROANTENOGRAFÍA

Se determinó la actividad de los estereoisómeros sintetizados del fital en EAG sobre antenas de machos y hembras sexualmente maduros. El equipo utilizado fue de Syntech (Alemania), descrito en el capítulo 2 (apartado 2.1). Para estos ensayos, a cada insecto se le cortó una antena por la base de la que se eliminó un par de antenómeros de la parte distal. La base de la antena se colocó sobre el electrodo de referencia y el otro extremo sobre el electrodo de medición, a los cuales se les había aplicado previamente una pequeña cantidad de gel conductor. Sobre cada antena se probaron 200 µg de cada uno de los cuatro estereoisómeros del fital y del compuesto racémico. Se consideraron un total de 12-16 antenas por sexo. Se hizo pasar un flujo de aire continuo y humidificado de 700 ml/min sobre la antena para evitar su desecación a través del principal brazo de un tubo de vidrio (7 cm de largo x 5 mm de diámetro), y los compuestos sometidos a estudio se aplicaron sobre la antena mediante insufladas de aire (200 ml/min) durante 0,2 segundos a través de una pipeta Pasteur que contenía un papel de filtro (2 x 1 cm) sobre el que se había depositado el fital que se quería probar. Cada 60 s, se realizaron insufladas o “puffs” sobre las antenas, y la secuencia seguida consistía en dos “puffs” de cada uno de los estereoisómeros en orden aleatorio, seguidos por otros dos de hexano (blanco).

Con los estereoisómeros que resultaron más activos se construyó una curva dosis-respuesta con dosis de 2, 20 y 200 µg sobre un total de 20 antenas de cada sexo. La secuencia de compuestos en este tipo de ensayos fue la siguiente: 2 µg racémico-2 µg R,R fital, 20 µg racémico-20 µg R,R

fital y 200 µg racémico-200 µg R,R-fital sobre cada antena, y como se ha indicado anteriormente, entre los dos “puffs” cargados con los compuestos objeto de estudio se realizaron otros dos de hexano. A la media de las dos despolarizaciones provocadas por el fital se le restó la media de las respuestas obtenidas con el blanco. El estudio estadístico de los datos se realizó con el software IBM SPSS Statistic, versión 23. Las respuestas (mV) obtenidas para cada uno de los esteroisómeros fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de U de Mann-Whitney para hallar diferencias significativas entre dosis ($P < 0.05$).

2.5. BIOENSAYOS

Sobre adultos maduros de ambos sexos se realizaron ensayos de comportamiento con los compuestos que resultaron más activos en EAG, concretamente con 20 y 100 µg de R,R-fital, 100 µg del compuesto racémico y 50 µl de extracto de patas de machos y de heces de hembras sexualmente maduros. Se utilizaron dos bioensayos distintos: un olfactómetro de doble elección y otro de cuatro vías.

El olfactómetro de doble elección aparece descrito en el apartado 3.1 del capítulo 3. Brevemente, estaba formado por una cámara principal de metacrilato (20 x 40 x 21 cm) con la base perforada para permitir la entrada de vapores, y una franja central no agujereada donde se liberaban los insectos. Bajo esta cámara se situaban otras dos más pequeñas (15 x 15,5 x 19 cm), separadas entre sí 8 cm, donde se colocaron dos discos de papel de filtro Whatman (25 mm de diámetro), uno sobre el que se depositaron los distintos tratamientos y otro con el control. Sobre cada una de estas dos cámaras, se hizo pasar por su parte inferior una corriente de aire de 600-650 ml/min, previa purificación a través de un filtro de carbón activo, produciendo dos corrientes independientes dentro del ensayo. Para evitar la acumulación y mezcla de vapores en el interior de la cámara principal, se colocó un extractor en la parte superior de ésta. Tras cada tanda de ensayos, se renovaron los papeles Whatman y se intercambiaron el control y el tratamiento para evitar una posible direccionalidad. El olfactómetro se rodeó con una caja de cartón para proveerlo de un entorno visual homogéneo y evitar interferencias externas (movimiento de personas, brillos, etc.).

El procedimiento empleado fue el mismo que el utilizado por Fürstenau et al. (2013) con ligeras modificaciones: los insectos, previamente aislados durante 16 h, se liberaron en el centro del olfactómetro en grupos de 10 tras ser anestesiados con CO₂ durante 10 s, y se observó su comportamiento a los 10, 20 y 30 min. Transcurridos estos tiempos, se contabilizó el número de insectos que habían elegido cada uno de los lados y aquellos que permanecieron en la franja central. Estos últimos fueron considerados como “ausencia de respuesta” y fueron excluidos del posterior análisis. Los ensayos se realizaron entre las 10:00 y las 18:00 h, a una temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y HR de $40 \pm 20\%$. Para cada tratamiento, se empleó un tamaño muestral inicial de 60 insectos de cada sexo de entre 10-40 días de edad, aumentando hasta 100-120 cuando los resultados estuvieron próximos a la significación.

Por otro lado, el olfactómetro de cuatro vías estaba formado por una cámara central de metacrilato de 40 x 40 x 8 cm, de la que partían cuatro brazos en cuyo extremo se colocó una

cámara de captura seguida por otra más pequeña donde se colocó el papel de filtro impregnado con los tratamientos y control (capítulo 3, apartado 3.1). A cada uno de los brazos se hacía llegar una corriente de aire de 300 ml/min, que había pasado anteriormente por un filtro de carbón activo para evitar contaminaciones. Sobre el centro de la cámara central se colocó una bomba aspiradora para evitar la acumulación de vapores en ella. En dos brazos opuestos del olfactómetro se colocó el tratamiento, mientras que en los otros dos se colocó el control. Cada 15 min y durante 1 h, se observó el comportamiento de grupos de 10-15 insectos, que habían sido aislados previamente durante 16 h, y se contabilizó el número de insectos que habían elegido cada uno de los brazos.

Para hallar diferencias entre los tratamientos y el control se aplicó el test de Chi-cuadrado.

3. RESULTADOS

3.1. EXTRACTOS

Se encontró fital en extractos de patas traseras de machos adultos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Fürsternau et al. (2013), aunque en cantidades superiores a la que se esperaba encontrar ($1100,9 \pm 411,5$ vs 208 ± 99 ng/pata). Además, se encontró fital en extractos de heces, no solo de machos sino también de hembras, tanto vírgenes como copuladas (Figura 8.2). En ninguno de los extractos de ninfas se detectó este compuesto (Tabla 8.1).

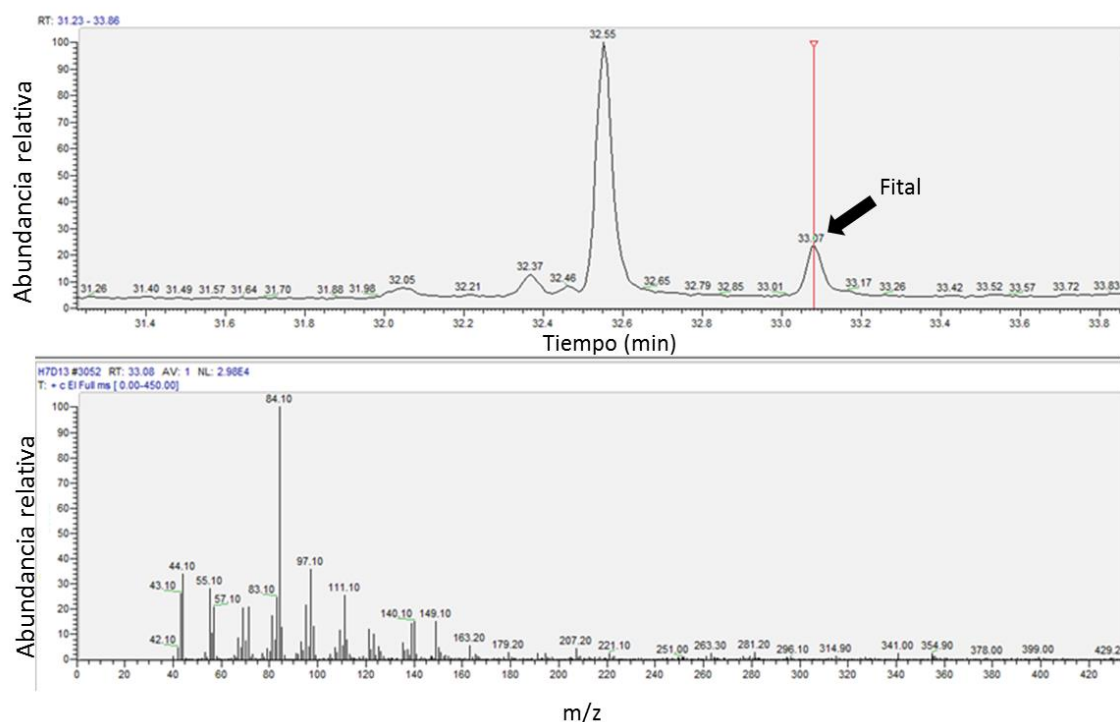


Figura 8.2. Cromatograma de un extracto de heces de hembras de *D. maroccanus* en el que se muestra el tiempo de retención del fital (33,07 min). En la parte inferior, espectro de masas correspondiente al fital del cromatograma anterior.

Tabla 8.1. Cantidad de fital (ng/mg de material biológico) detectado en extractos de huevos, espuma, heces y patas traseras de machos y hembras de *D. maroccanus*.

Tipo de muestra	ng fital/ mg
Huevos	0
Espuma	0
Heces de machos (14-16 días)	$16,04 \pm 0,31$
Heces de hembras (14-16 días)	$15,72 \pm 0,49$
Patas de machos	$1100,9 \pm 411,5$
Patas de hembras	0

Puesto que la presencia de fital en heces de hembras no ha sido descrita anteriormente, se aumentó el número de réplicas para descartar posibles errores en el procedimiento y se

amplió el estudio a diferentes edades, incluyendo extractos de hembras vírgenes de 6-8 días de edad, y vírgenes y copuladas de 14, 21 y 30 días de edad. Se observó un pequeño incremento en la cantidad de fital hasta los 21 días de edad, pero se produjo un ligero descenso una vez cumplido el mes de edad (Tabla 8.2). En todos los casos, no se observaron diferencias significativas entre edades ni entre los distintos estados fisiológicos del insecto (test de Kruskal Wallis, $\chi^2=12,664$, $P=0,081$). Tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de fital encontrada en heces de machos sexualmente maduros de 14 días de edad (16,04 ng/mg) de heces (test de Kruskal Wallis, $\chi^2 =14,216$, $P=0,076$).

Tabla 8.2. Cantidad de fital (ng/mg) en extractos de heces de hembras de distintas edades y estados fisiológicos de *D. maroccanus*.

Edad	Vírgenes	Copuladas
6-8 días	12,2 ± 0,6	13,3 ± 1,7
14 días	15,7 ± 0,5	13,1 ± 1,1
21 días	16,2 ± 0,8	16,2 ± 0,5
30 días	15,9 ± 0,9	15,7 ± 0,7

3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DISTINTOS ESTEROISÓMEROS DE FITAL SOBRE MACHOS Y HEMBRAS DE *D. maroccanus*

3.2.1. RESPUESTA EN EAG

Al evaluar la actividad intrínseca en EAG de 200 μg de cada uno de los esteroisómeros del fital y del compuesto racémico, se observó que solo eran capaces de responder a ellos el 25-65 % de las antenas ensayadas tanto de machos como de hembras. Únicamente resultaron moderadamente activos el compuesto racémico y el R,R-fital, ya que el resto provocó despolarizaciones notables en menos del 50% de las antenas ensayadas (Figura 8.3). Este es el caso, p.e., de la actividad del R,S-fital sobre hembras (0,13 mV) pero al que solamente respondieron el 25% de las antenas.

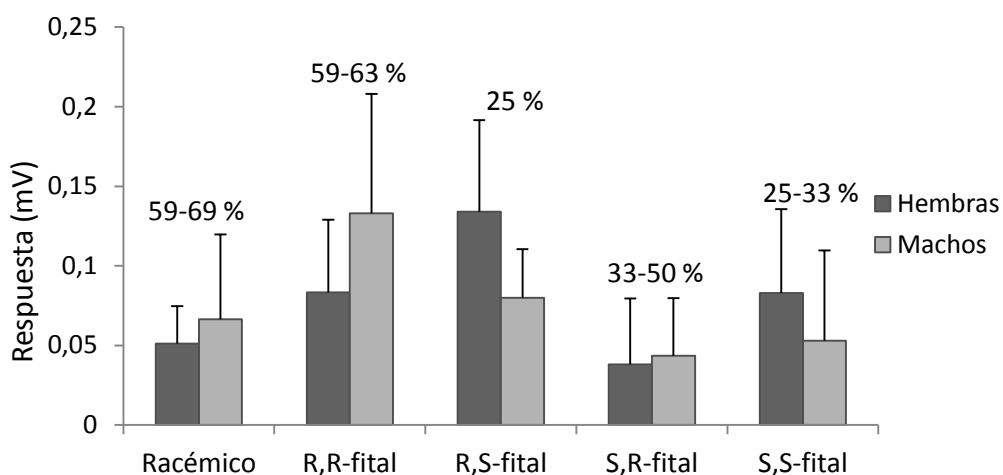


Figura 8.3. Respuesta (mV \pm DE) de antenas de hembras y machos de *D. maroccanus* frente a cada uno de los esteroisómeros del fital y al compuesto racémico. Sobre las barras, se indica el porcentaje de antenas que fueron capaces de responder a 200 μg de cada compuesto.

Con el compuesto racémico y el enantiómero R,R se elaboró una curva dosis-respuesta con 2, 20 y 200 μg (Figura 8.4). De nuevo, el porcentaje de antenas que respondió a cada una de las dosis de cada compuesto estuvo comprendido entre el 40-60 % en el caso de las hembras, y del 25-50% en los machos. En antenas de ambos sexos se observaron despolarizaciones con 20 y 200 μg de R,R-fital y 200 μg del compuesto racémico (Figura 8.4).

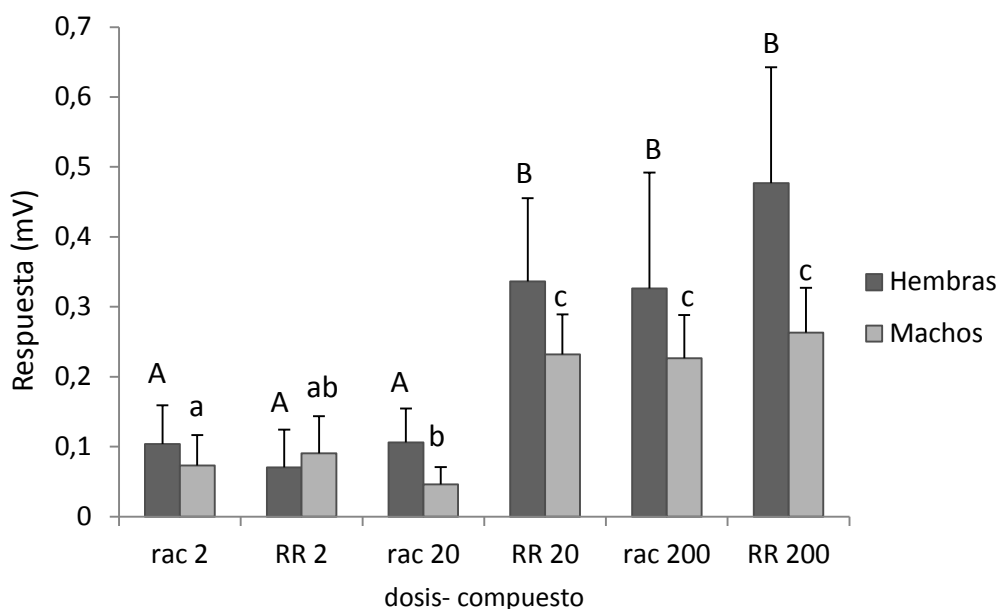


Figura 8.4. Respuesta ($\text{mV} \pm \text{DE}$) de antenas de hembras y machos de *D. maroccanus* frente a cada uno de los estereoisómeros del fital y al compuesto racémico. Distintas letras sobre las barras indican la presencia de diferencias significativas en la respuesta (test de U-mann Whitney, $P < 0.05$) (letras mayúsculas sobre hembras, letras minúsculas sobre machos).

3.2.2. BIOENSAYOS

Durante la campaña del 2014, se realizó la puesta a punto de los olfactómetros que se utilizarían en años posteriores. En el olfactómetro de 4 vías, se comprobó mediante pruebas preliminares realizadas con hembras copuladas a las que únicamente se les presentó 20 μg de R,R-fital en cada par alternativo de los brazos, que había cierta preferencia de los insectos por dos de ellos, por lo que se rechazó su uso para ensayos posteriores al no considerarse válido para este tipo de insectos. Sin embargo, en los ensayos de comportamiento llevados a cabo en el olfactómetro de doble elección, se observó que la proporción de insectos que habían elegido cada uno de los dos lados fue del 50%.

Durante la campaña de 2015, todos los bioensayos se llevaron a cabo en el olfactómetro de doble elección, donde se determinó la atracción de aquellos compuestos que resultaron más activos en EAG (20 μg y 100 μg de R,R-fital; 100 μg del compuesto racémico) sobre adultos de ambos sexos. Únicamente mostraron tener un efecto atrayente significativo 100 μg de R,R-fital a los 20 min del inicio del ensayo ($N=100$) sobre machos, y 100 μg del compuesto racémico sobre las hembras a todos los tiempos ensayados ($N=120$) (test de Chi-cuadrado, $P < 0.05$) (Figura 8.5). El porcentaje de movilidad en estos ensayos oscilaba entre el 65-80% en el caso de los machos, y el 42-48% en el caso de las hembras en los ensayos realizados con R,R-fital,

mientras que este porcentaje descendía hasta el 23-53% cuando se ensayaban los machos con el compuesto racémico, y hasta el 40-51% en las hembras.

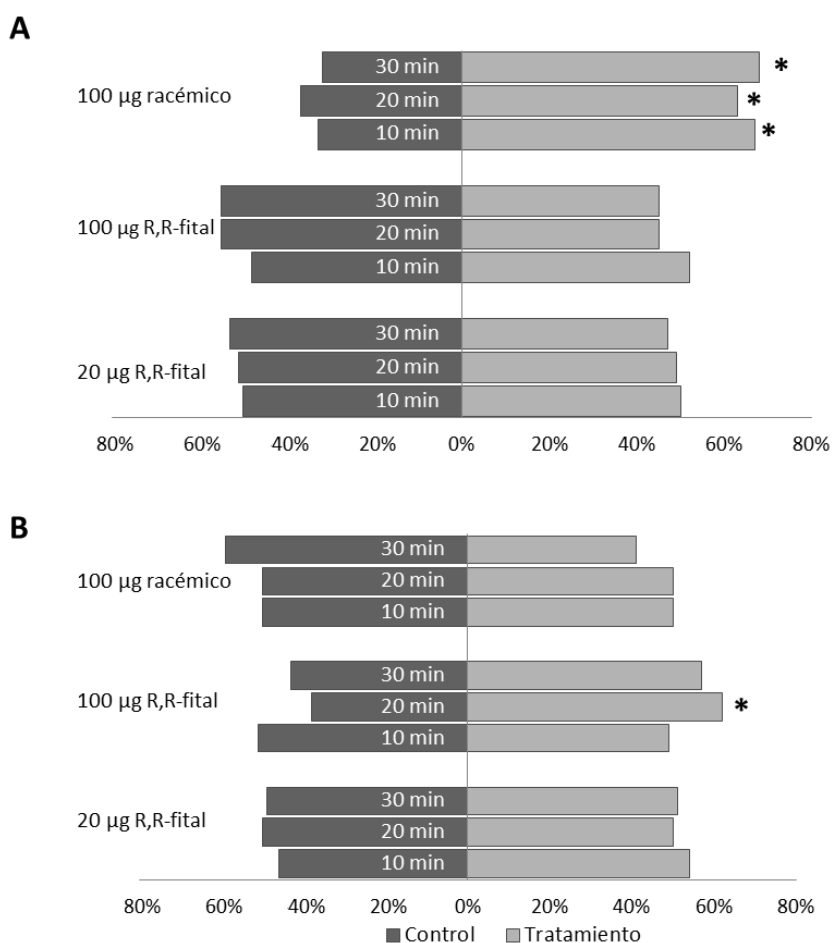


Figura 8.5. Porcentaje de atracción de grupos de 10 hembras (A) y machos (B) adultos de *D. maroccanus* por hexano (control), 20 y 100 µg de R,R-fital, y 100 µg del compuesto racémico (N=60-120) en bioensayo de doble elección. Barras con asterisco indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control (test de Chi-Cuadrado, $P < 0.05$).

En la campaña de 2016, no se consiguieron reproducir los resultados obtenidos durante el año anterior utilizando 100 µg de R,R-fital sobre machos y 100 µg del compuesto racémico sobre hembras. Si bien el porcentaje de movilidad fue mayor que el anterior, alcanzando un 60-76% de movilidad en machos y un 76-84% en los ensayos con hembras, no se observaron diferencias significativas entre el control y las dos formas de fital como tampoco con el extracto de patas de machos. Solo el extracto de heces de hembras tras 10 min de tratamiento resultó significativo (70% de insectos atraídos vs 30% del control) sobre los machos (N=30) (Chi-cuadrado, $P < 0.001$).

4. DISCUSIÓN

La langosta marroquí se encuentra ampliamente distribuida por toda la cuenca mediterránea, estando presente en países del norte de África, oeste de Asia y sur de Europa (Baldachino et al., 2004; Baldachino et al., 2012). El control se basa en el uso de tratamientos químicos, como el malatión ULV, fenitrotión o diflubenzurón, muy contaminantes y dañinos para el medio ambiente (del Moral, 1986; Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2000; del Moral et al., 2005), por lo que es necesario el desarrollo de nuevas técnicas más respetuosas. Se ha propuesto como alternativa el uso de entomopatógenos, como los hongos deuteromicetos *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* (Prior & Greathead, 1989; Crespo & Santiago-Álvarez, 1997; Jiménez-Medina et al., 1997), aunque su eficacia depende de una temperatura y humedad precisas (Crespo & Santiago-Álvarez, 1997). Por esta razón, el conocimiento de aspectos biológicos y fisiológicos de la especie es esencial para el desarrollo de nuevos métodos de control.

Se han llevado a cabo estudios sobre la comunicación química de acrididos y se han identificado compuestos volátiles posiblemente involucrados en el comportamiento y desarrollo de las langostas y que actúan como feromonas sexuales y de agregación en especies como *Schistocerca gregaria* (Oben-Ofori et al., 1993; Inayatullah et al., 1994; Oben-Ofori et al., 1993; Torto et al., 1994; Torto et al., 1996; Hassanali & Bashir, 1999; Ferenz & Seidelmann, 2003) y *Locusta migratoria* (Fuzeau-Braesch et al., 1988; Picibom et al., 2000; Jin et al., 2006). Sin embargo, los estudios destinados a conocer la comunicación química en *D. maroccanus* son casi desconocidos. En el año 2013, nuestro equipo descubrió un compuesto natural, el fital, producido en patas y alas de machos adultos sexualmente maduros con actividad electroantagráfica y atrayente de ambos sexos en bioensayos preliminares de doble elección (Fürsternau et al., 2013). Nuestros ensayos en EAG demuestran que únicamente el esteroisómero R,R del fital, isómero presente en la naturaleza (Fürsternau et al., 2013), y el compuesto racémico, formado por la mezcla de los cuatro esteroisómeros y que contiene el compuesto R,R en un 25%, resultaron parcialmente activos en antenas de machos y de hembras de esta especie, coincidiendo con los resultados obtenidos por Fürsternau et al. (2013). La capacidad para responder de ambos sexos no es de extrañar si tenemos en cuenta la morfología y estructura de las sensilas antenales, idéntica en machos y hembras, como se demostró en un estudio realizado con microscopía electrónica de barrido (Fürsternau, 2011). En este estudio se describieron 4 tipos de sensilas, de las cuales, las basicónicas y tricoideas presentaban perforaciones en su cutícula, las celocónicas surcos longitudinales en su pared no perforada, y las chaetica una base flexible y poro terminal. Estos tipos de sensilas descritos son similares a los que están presentes en otras especies de acrididos (Slifer et al., 1959; Altner et al., 1981; Hansson et al., 1996; Ochieng et al., 1998). Aunque no existen estudios funcionales sobre las sensilas de las antenas de *D. maroccanus*, los tipos de estímulos a los que responden pueden inferirse por comparación con otras especies, siendo presumiblemente receptores olfativos las sensilas de los tres primeros tipos. Así, por ejemplo, las sensilas celocónicas son idénticas a las descritas en *L. migratoria*, capaces de responder a estímulos de tipo olfativo, humedad y temperatura (Altner et al., 1981), o a las de *S. gregaria*, capaces de responder a la feromona de agregación emitida por los machos (Hansson et al., 1996), mientras que las

neuronas presentes en las sensilas basicónicas y tricoideas de esta especie también responden a la feromona de agregación y a compuestos presentes en las plantas (Hansson et al., 1996).

En los extractos realizados en esta tesis se ha corroborado la presencia de fital en patas de machos y su ausencia en ninfas, tal como se esperaba y coincidiendo con los resultados de Fürsternau y col. (2013). Sin embargo, se ha encontrado este compuesto en heces no sólo de machos, sino también de hembras sexualmente maduras, algo que anteriormente no había sido descrito. En el trabajo anterior se habían realizado ensayos con fital deuterado que confirmaban la hipótesis de que el fital procedía del fital ingerido en la dieta y transformado en el aldehído mediante un proceso oxidativo en el aparato digestivo (Fürsternau et al., 2013). Esta transformación ha sido descrita también en bacterias del género *Acinetobacter* sp. en condiciones aerobias (Rontani & Acquaviva, 1993), y más recientemente también en comunidades bacterianas presentes en el lecho marino no solo en condiciones aerobias, sino también anaerobias gracias a la acción de una alcohol-dehidrogenasa (Rontani et al., 1999). La presencia del fital en las heces de machos y hembras es coherente con esta hipótesis. El fital es un alcohol diterpénico acíclico que forma parte de la molécula de clorofila, de las vitaminas K y E y otros tocoferoles (de Moraes et al., 2014). Muchas especies de insectos toman esta sustancia en la dieta y la incorporan a su metabolismo. Se ha encontrado fital y/o derivados de éste en heces de larvas de *S. littoralis* con efecto deterrente en la oviposición (Anderson et al., 1993), de *Lema trilinea* y *Neolema sexpunctata* que lo utilizan como mecanismo de defensa (Morton & Vecil, 1998), formando parte de la feromona sexual emitida por machos de *Ephestia elutella* (Phelan et al., 1986) y de *Tirathaba mundella* (Sasaerila et al., 2003), y también en alas de *Pieris rapae* y *Pieris brassicae* (Yildizhan et al., 2009; Schulz et al., 2011). A diferencia de lo descrito anteriormente en machos adultos de *D. maroccanus*, donde la producción de esta molécula en las patas se incrementaba con la edad alcanzando su máximo de producción entre los 6-12 días de edad, desapareciendo prácticamente por completo a los 35-46 días (Fürsternau et al., 2013), en heces de hembras la cantidad detectada permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo, y es similar a la excretada por los machos.

Aunque no pudo ser reproducido en todas las campañas, se ha constatado en bioensayos de comportamiento que el R,R-fital y el compuesto racémico sintetizados en el laboratorio tienen cierta actividad atrayente de machos y hembras de la langosta marroquí, coincidiendo de nuevo con los resultados obtenidos por Fürsternau y col. (2013). El extracto de heces de hembras sexualmente maduras, en el que, como se ha dicho, también se detectó fital, también mostró cierto poder de atracción sobre los machos de esta especie. Se ha propuesto que esta sustancia forma parte de una posible feromona sexual (Fürsternau et al., 2013). Los resultados obtenidos en el bioensayo de doble elección son difíciles de interpretar si tenemos en cuenta que otros estímulos podrían estar presentes durante la realización de los experimentos, como la presencia de otros olores en el área de trabajo, o incluso adheridos a las paredes del olfactómetro empleado; o el efecto visual, acústico y táctil que podría suponer la presencia de otros individuos (Heifetz et al., 1996; Roessingha et al., 1998), por lo que la agrupación de los insectos en un área del olfactómetro podría no ser debida únicamente a la feromona. También se ha de tener especial cuidado con los resultados obtenidos con los extractos de heces, puesto que el tamaño muestral fue inferior al del resto de tratamientos debido a la baja

disponibilidad de insectos en el momento en que se realizaron, por lo que es necesario ampliar estos ensayos para corroborar la reproducibilidad, y por tanto, la significación de estos resultados. En este sentido, hay que reseñar que en estudios preliminares sobre extractos de heces no se han identificado otras sustancias ya conocidas y que forman parte del complejo feromonal de otras especies de acrididos como hexanal, nonanal, benzaldehído, ciclohexanol y 2,5-dimetilpirazina (Shi et al., 2000; 2011) (E. Faggi, comunicación personal).