

## Caracterización y actividad de un posible componente de la feromona sexual de la langosta mediterránea *Dociostaurus maroccanus*

**Benjamin Fürstenau** (Freie Universität Berlin, Institute for Biology, Department of Applied Zoology/ Animal Ecology, Berlin, Germany).

**Lourdes Muñoz** (SIMChem (Service of Synthesis of High Added Value Molecules), IQAC-CSIC, Barcelona).

**M<sup>a</sup> Milagro Coca-Abia** (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Departamento de Industria e Innovación (Gobierno de Aragón), Unidad de Sanidad Vegetal, Zaragoza).

**Gloria Rosell** (Departamento de Farmacología y Química Terapéutica, Unidad Asociada al CSIC, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona).

**Angel Guerrero\* y Carmen Quero\*** (Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC) (CSIC), Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular, Barcelona). \*Autores para correspondencia.

Es sobradamente conocido que las langostas pueden causar enormes pérdidas económicas en los cultivos de muchos países. En la Península Ibérica la langosta mediterránea o marroquí *Dociostaurus maroccanus* (Orthoptera: Acrididae) es la más abundante y su control representa un coste aproximado de unos 1.860.000 €/año. Con el objetivo de desarrollar estrategias para un control de la plaga respetuoso con el medio ambiente, hemos desarrollado estudios focalizados en la comunicación química y el comportamiento de ambos sexos. Estos estudios han cristalizado hasta el momento en la identificación del fital como posible componente de la feromona sexual de la langosta mediterránea. El compuesto ha sido identificado por comparación de sus características químicas con las de una muestra auténtica de síntesis. El fital es producido en alas y patas de machos sexualmente maduros y su estructura es única como componente feromonal de un insecto. Ambos isómeros del fital inducen respuestas electrofisiológicas en antenas de ambos sexos y en bioensayos de laboratorio son capaces de atraer tanto a hembras como a machos. El compuesto es específico de *D. maroccanus*, ya que no se ha detectado en otras langostas estrechamente relacionadas y que comparten el mismo hábitat como *Dociostaurus jagoi* y *Calliptamus wattenwylanus*. Unas primeras pruebas de campo han resultado prometedoras como para proseguir en esta línea de investigación de cara a un control efectivo de la plaga.

PALABRAS CLAVE: langostas, feromonas, elucidación estructural, *Dociostaurus maroccanus*, comportamiento, biosíntesis.

### INTRODUCCIÓN

Las langostas en fase gregaria son masas de insectos que causan considerables pérdidas económicas a la agricultura de muchos países (Bazazi y col., 2008; Latchininsky, 2010) (*Schistocerca gregaria* (Blaney y Simmons, 1990; Ferez y Seidelmann, 2003).

La langosta mediterránea (también llamada marroquí) *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae) (Foto 1), es una plaga polífaga que se encuentra distribuida por el sur de Europa, norte de África y Oriente Medio. También hay constancia de devastadores ataques de cultivos en Irán, Afganistán y países de la antigua URSS (El Ghadraoui y col., 2002; Latchininsky y Launois-Luong, 1992; Uvarov, 1977). Al ser una especie polífaga se alimenta de numerosas especies vegetales, y así sólo en Rusia se han llegado a contabilizar más de 150 especies pertenecientes a 33 familias, incluyendo aproximadamente 50 cultivos diferentes (Latchininsky, 1998). Las poblaciones de langosta mediterránea son altamente dependientes de las lluvias primaverales, y, al igual que otras especies de acrididos como *S. gregaria* o *Locusta migratoria*, si el ambiente y las condiciones climáticas son favorables, los estallidos ocurren con cambios de fase, provocando la formación de grupos de individuos y enormes enjambres que devoran todo a su paso (Latchininsky, 1998).

## Material biológico

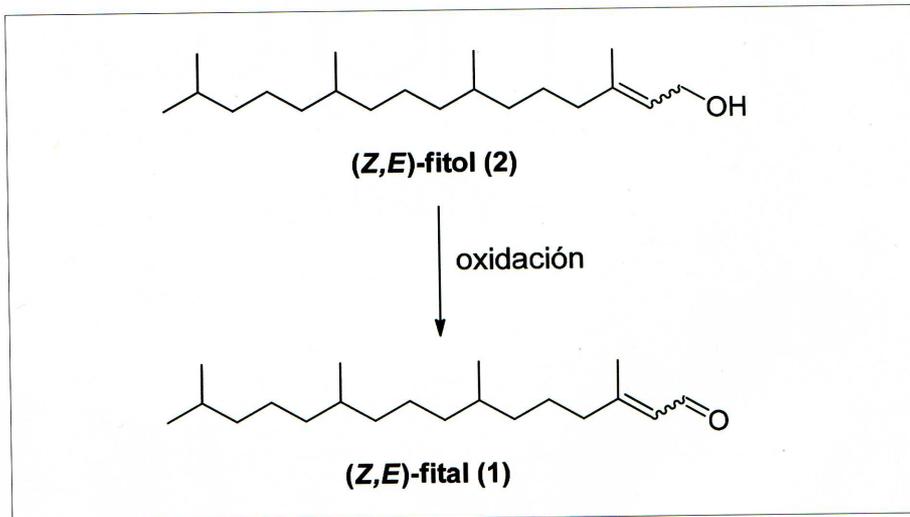
Las ninfas N4 y adultos jóvenes de *D. maroccanus* y adultos de *Docioptaurus jagoi* se recolectaron en una zona esteparia de Alhama de Aragón (Zaragoza). Los adultos de *Calliptamus wattenwylanus* se capturaron en Chiprana (Zaragoza). Los individuos se separaron por sexo y edad y se mantuvieron en jaulas independientes en una cámara climática bien ventilada a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $50 \pm 10\%$  HR con un fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad. Como alimento se suministró alfalfa fresca, hojas de trigo, carrizo y otras poáceas (*Sorghum alepense*) dos veces al día.

## Elucidación estructural del fital

Mediante aireación de machos adultos de *D. maroccanus* se obtuvieron seis compuestos volátiles que no estaban presentes en hembras conspecíficas ni en machos de otros acrididos estrechamente relacionados y que comparten hábitat con la langosta mediterránea, como *D. jagoi* y *C. wattenwylanus*. Por comparación de los espectros de masas (EM) y los tiempos de retención en cromatografía de gases (CG) con patrones auténticos, se identificaron el 1-tetradecanol, 1-hexadecanol, tetradecanal, hexadecanal y dos compuestos más que por sus EM resultaron ser isómeros. Por acoplamiento cromatografía de gases-electroantenografía se pudo determinar que estos compuestos provocaban una respuesta electrofisiológica en antenas de machos de *D. maroccanus*. Además, el análisis de extractos de patas y de alas de adultos de 6 días de edad reveló que ambos isómeros estaban presentes en cantidades significativamente altas (hasta 560 ng del isómero mayoritario en patas), particularmente en el fémur (80%), seguido de la tibia (12%) y tarso del tercer par de patas (8%). Los extractos de patas fueron sometidos a una micro purificación y los compuestos purificados fueron analizados por técnicas cromatográficas y espectroscópicas así como por reacciones microquímicas específicas (Fürstenau y col., 2013), y se llegó a la conclusión de que ambos compuestos eran isómeros geométricos del fital [3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enal, (1), Esquema 1]. Una muestra sintética de este compuesto fue preparada por oxidación del (Z,E)-fital comercial (2, Esquema 1), un compuesto natural que forma parte estructural de la clorofila de las plantas (Schulz y col., 2011).



Foto 1. Ejemplares de *Docioptaurus maroccanus*.



Esquema 1. Oxidación de fital racémico (2) a fital (1).

El fital sintético mostró idénticas propiedades cromatográficas y espectrales que el compuesto natural, y se comportó de manera idéntica que éste en las reacciones microquímicas que se habían utilizado para su caracterización. Para determinar si ambos isómeros del fital podrían provenir del fital, compuesto natural quiral de configuración 7*R*,11*R*, se prepararon muestras sintéticas de fital racémico y quiral (*R,R*) y se analizaron conjuntamente con el producto natural por cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC). La separación de los ocho posibles estereoisómeros del compuesto racémico resultó extremadamente difícil y sólo la utilización de una columna Lux Amylose 2 (15x0.46 cm; 5  $\mu\text{m}$ , 11*R*) (Fürstenau y col., 2013).

## Emisión y biosíntesis del fital

Por recogida de volátiles de ninfas y adultos machos de diferentes edades se observó que las ninfas no emitían fital, al contrario

que los adultos que empezaron a producirlo a edades comprendidas entre 1 y 5 días. La producción media por adulto se incrementaba significativamente hasta un máximo de aprox. 42 ng/h de (*Z*)-fital y 176 ng/h del (*E*)-fital 6-12 días después de la maduración (Figura 2). La emisión de ambos compuestos disminuyó posteriormente con la edad de los individuos hasta llegar a ser prácticamente nula cuando los machos poseían entre 35 y 46 días de vida. Nuestros resultados concuerdan con los descritos para la langosta del desierto *S. gregaria* en la que los compuestos específicos del macho con actividad feromonal son emitidos exclusivamente cuando los individuos llegan a ser sexualmente maduros (Seidelmann y col., 2003; Torto y col., 1994).

## Actividad del fital sobre el comportamiento de la langosta

En un olfactómetro de doble elección machos y hembras adultos se sometieron a vapores de fital racémico. Ambos sexos mostraron una clara preferencia por la sección del olfactómetro conteniendo los vapores del compuesto frente al control (Figura 3). La respuesta de las hembras fue superior a la de los machos pero no se encontraron diferencias significativas entre ambas. No se observó preferencia alguna cuando se ensayó el análogo hidrogenado del fital ( $H_2$ -fital) lo que indica una buena especificidad del compuesto natural sobre el comportamiento de los adultos (Figura 3) (Fürstenau y col., 2013). Las respuestas observadas podrían ser el resultado de una feromona sexual producida por los machos para atraer a las hembras pero que, al mismo tiempo, podría ser percibida por machos congéneres para localizar posibles parejas para el apareamiento, un fenómeno ya conocido en otros insectos (Wyatt, 2003).

## Discusión

Las emisiones de volátiles de langostas son complejas, y por ello los estudios dirigidos a su caracterización se han conducido en un número pequeño de especies, como *S. gregaria*, *Schistocerca americana*, *Locusta migratoria migratorioides* y *Locusta migratoria manilensis*. Se han identificado varias familias de productos activos en machos y hembras, pero muy pocos compuestos de cadena larga se han caracterizado como componentes de feromonas de langosta. Nosotros hemos descubierto que los machos de langosta mediterránea sexualmente maduros producen

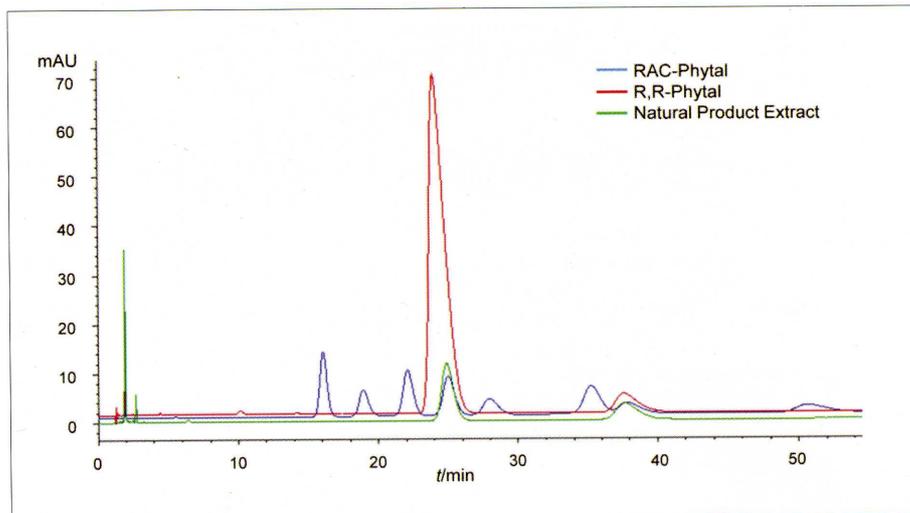


Figura 1. Cromatograma de HPLC quiral de un extracto purificado natural (verde), (*Z,E*)-fital racémico (1) (azul), y (*7R,11R*)-fital (rojo) sobre una columna Lux Amylose 2.

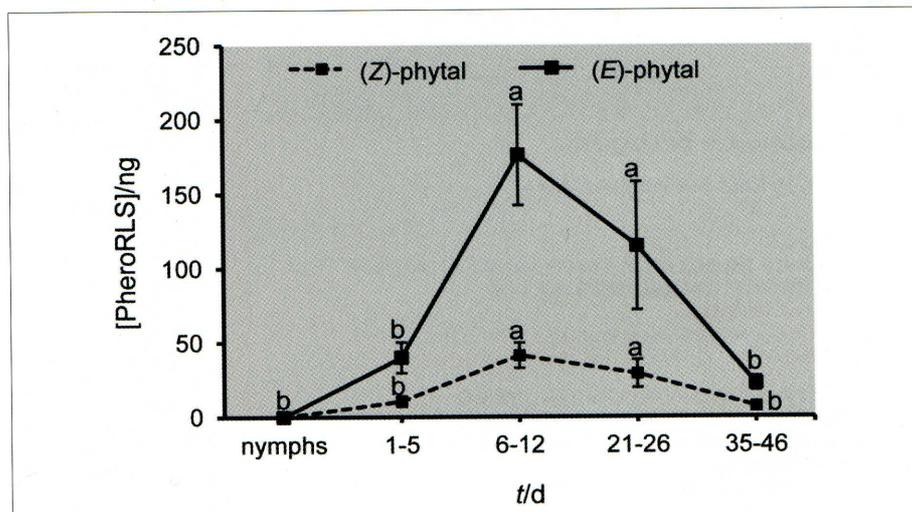


Figura 2. Emisión de ambos isómeros de fital por macho y hora en volátiles de 7 individuos recogidos 1-5, 6-12, 21-26 y 35-46 días después de la muda final (N=3 para cada periodo).

ambos isómeros del fital. Este compuesto se ha caracterizado finalmente como el estereoisómero *7R,11R*. Creemos que el fital es el primer aldehído de cadena larga identificado como componente de la feromona sexual de una langosta y, además, su estructura es única entre los diferentes tipos de feromonas conocidos (El-Sayed, 2011). El fital y otros terpenoides emparentados incluyendo el fital se han encontrado en alas de machos y hembras de las mariposas de la col *Pieris rapae* y *Pieris brassicae*, pero sólo el alcohol fue reconocido como componente afrodisíaco de la feromona de ambas especies (Yildizhan y col., 2009). El fital no es emitido por las hembras, ni por machos de otras especies de acrididos que comparten el mismo

hábitat como *D. jagoi* y *C. wattenwylanus*, lo que confiere a la langosta mediterránea una buena especificidad. En experimentos de comportamiento en laboratorio el fital sintético provoca actividad atrayente en adultos, tanto en machos como en hembras; sin embargo, el papel preciso que pueden jugar los diferentes estereoisómeros necesita ser determinado. En cuanto a su actividad en campo y determinar así las perspectivas que pudiera ofrecer la feromona para un control efectivo y no contaminante de la plaga, se ha llevado a cabo un primer ensayo en una estepa cerealista del término municipal de Alhama de Aragón (Zaragoza), en dos parcelas de unas 4.000 m<sup>2</sup> cada una con resultados prometedores.

## Conclusiones

Hasta el momento, el papel de las feromonas en diferentes procesos biológicos de langostas es controvertido. Por ejemplo, el fenilacetónitrilo, compuesto feromonal mayoritario de la langosta del desierto, provoca efectos que han sido atribuidos a comportamientos opuestos: como una feromona de agregación (Hassanali y col., 2005) o como una feromona repelente de machos (Seidelmann y col., 2005). Nuestros resultados indican que el fital forma parte del complejo feromonal de la langosta mediterránea y provoca atracción sobre ambos sexos. El fital también podría ser un buen indicador del grado de maduración de los machos adultos, y junto con otros estímulos como señales visuales, táctiles u hormonales podría estar también involucrado en la agregación, tal como se ha descrito en otras langostas (Anstey y col., 2009; Miller y col., 2008; Verlinden y col., 2009). Esta es una investigación que merece la pena abordar en un futuro. En la actualidad se llevan a cabo pruebas de campo con fital sintético absorbido en varios tipos de difusores y en diferentes tipos de trampas, para determinar un posible efecto atrayente en campo abierto y las perspectivas que puede ofrecer en un futuro su posible utilización para el control de la plaga.

**Agradecimientos:** Agradecemos la colaboración de los Dres. M<sup>a</sup> Pilar Bosch, Josep Coll, Jocelyn Millar (Universidad de California, Riverside, USA), y Wittko Francke (Universidad de Hamburgo, Alemania) por su participación de una forma u otra en la realización de este trabajo. También debemos agradecer a D. Enrique Martín-Bernal y D. José M<sup>a</sup> Sopeña (Diputación General de Aragón) por su dedicación y apoyo al proyecto, Isaac Tenas por su asistencia en la recolección y mantenimiento

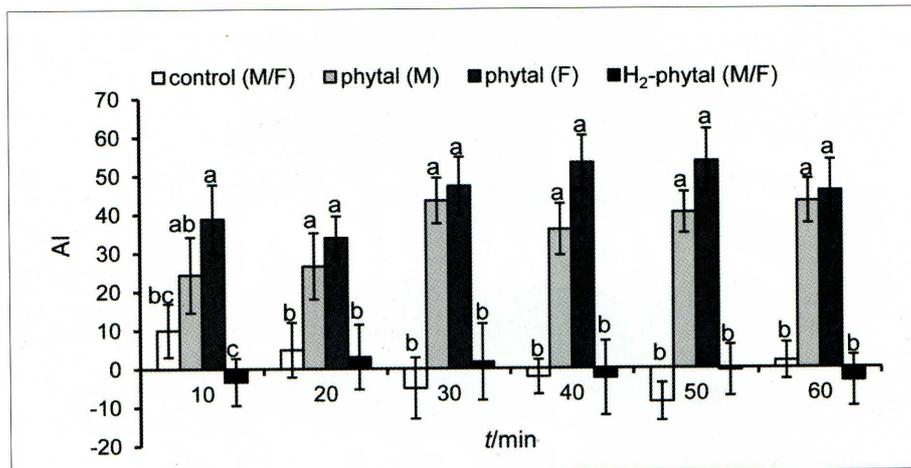


Figura 3. Índice de atracción de grupos de 10-15 machos (M) y hembras (F) adultos de *D. maroccanus* a aire (control), (Z,E)-fital (20 µg) y H<sub>2</sub>-fital (20 µg) cada 10 min desde 10 a 60 min (N=10 réplicas).

de insectos y al Grupo de Trabajo de la Langosta y Otros Ortópteros Asociados por su interés en este trabajo. Igualmente, agradecemos al Dr. Michael McCoy y Julissa Fernandez (Phenomenex, Torrance, CA, USA) por la resolución de los diferentes estereoisómeros del fital. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Diputación General de Aragón (Convenio de Colaboración DGA-CSIC, ref. 2007X0832, 2007-2009).

**Abstract:** It is well known that locusts can cause enormous economic losses in crops of many countries. The Mediterranean (or Moroccan) locust *Dociostaurus maroccanus* (Orthoptera: Acrididae) is one of the most abundant locusts of the Iberian Peninsula and its control provokes costs of ca. 1.860.000 € per year. With the aim at developing strategies for an environmentally-friendly control of this pest, we have implemented studies directed to investigate the chemical communication and behavior of both sexes. Until now, these studies

have resulted in the identification of phytal as a possible component of the sex pheromone of the locust. This compound has been identified by comparison of its chemical features in comparison to those of an authentic synthetic sample. Phytal is produced in wings and legs of sexually mature males and its structure is unique as a pheromone component of an insect. Both isomers of phytal elicit electroantennographic responses in antennae of both sexes and are able to attract males and females in laboratory bioassays. This compound is specific to *D. maroccanus* since it is undetected in other closely-related habitat-sharing species like *Dociostaurus jagoi* and *Calliptamus wattenwylanus*. Preliminary field tests have resulted promising so that it is worthwhile to pursue this line of research for an effective control of the locust.

**KEY WORDS:** locusts, pheromones, structural characterization, *Dociostaurus maroccanus*, behavior, biosynthesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anstey M. L., Rogers S. M., Ott S. R., Burrows M., Simpson S. J., 2009. Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science* 323, 627-630.
- Bashir M. O., Hassanali A., 2010. Novel cross-stage solitarising effect of gregarious-phase adult desert locust (*Schistocerca gregaria* (Forskål)) pheromone on hoppers. *Journal of Insect Physiology* 56, 640-645.
- Bazazi S., Buhl J., Hale J. J., Anstey M. L., Sword G. A., Simpson S. J., Couzin I. D., 2008. Collective motion and cannibalism in locust migratory bands. *Current Biology* 18, 735-739.
- Blaney W. M., Simmons M. S. J., 1990. The chemoreceptors. En: R. F. Chapman, A. Joern, Eds., *Biology of grasshoppers*. John Wiley & Sons., New York, pp. 1-37.
- Dillon R. J., Vennard C. T., Charnley A. K., 2000. Exploitation of gut bacteria in the locust. *Nature* 403, 851.
- El-Sayed A. M., The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. *Dociostaurus maroccanus* and the nature of its diet. *Journal of Orthoptera Research* 11, 11-18.
- Ferenz H. J., Seidelmann K., 2003. Pheromones in relation to aggregation and reproduction in desert locusts. *Physiological Entomology* 28, 11-18.

- Fürstenau B., Muñoz L., Coca-Abia M., Rosell G., Guerrero A., Quero C., 2013. Phytol: A candidate sex pheromone component of the Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus*. *Chembiochem* 14, 1450-59.
- Hassanali A., Njagi P. G. N., Bashir M. O., 2005. Chemical ecology of locusts and related acridids. *Annual Review of Entomology* 50, 223-245.
- Hassanali A., Torto B., 1999. Grasshoppers and locusts. En: J. Hardie, A. K. Minks, Eds., *Pheromones and Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 305-328.
- Jansen G. A., Wanders R. J., 2006. Alpha-oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research* 1763, 1403-1412.
- Latchininsky A. V., 1998. Moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815): a faunistic rarity or an important economic pest? *Journal of Insect Conservation* 2, 167-178.
- Latchininsky A. V., 2010. Locusts. En: M. D. Breed, J. Moore, Eds., *Encyclopedia of Animal Behavior*. Academic Press., Oxford, pp. 288-297.
- 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 relative à l'ex-URSS et aux pays proches. CIRAD-GERDAT-PRIFAS, Montpellier, France / VIZR; St Petersburg, Russia
- McCaffery A. R., Simpson S. J., Saiful I. M., Roessingh P., 1998. A gregarising factor present in the egg pod foam of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology* 201, 347-363.
- Schistocerca gregaria*. Isolation and NMR analysis of the primary maternal gregarizing agent. *Journal of Experimental Biology* 211, 370-376.
- Muñoz L., Guerrero A., 2012. Synthesis of a new deuterium-labeled phytol as a tool for biosynthetic studies. *Synthesis* 44, 862-864.
- Rontani J.-F., Bonin P. C., Volkman J. K., 1999. Biodegradation of free phytol by bacterial communities isolated from marine sediments under aerobic and denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5484-5492.
- Schulz S., Yildizhan S., Van Loon J. J. A., 2011. The biosynthesis of hexahydrofarnesylacetone in the butterfly *Pieris brassicae*. *Journal of Chemical Ecology* 37, 360-363.
- Seidelmann K., Warnstorff K., Ferez H.-J., 2005. Phenylacetone nitrile is a male specific repellent in gregarious desert locusts, *Schistocerca gregaria*. *Chemoecology* 15, 37-43.
- Seidelmann K., Weinert H., Ferez H.-J., 2003. Wings and legs are production sites for the desert locust courtship-inhibition pheromone, phenylacetone nitrile. *Journal of Insect Physiology* 49, 1125-1133.
- Showler A. T., 1995. Desert locust control, public health and environmental sustainability in North Africa. En: W. D. Swearingen, A. Bencherifa, Eds., *The North African environment at risk*. Westview Press, Boulder, CO, pp. 217-239.
- Torto B., Obeng-Ofori D., Njagi P. G. N., Hassanali A., Amiani H., 1994. Aggregation pheromone system of adult gregarious desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Journal of Chemical Ecology* 20, 1749-1762.
- Uvarov B. P., 1977. Grasshoppers and Locusts. A Handbook of General Acridology. Vol. II: Behaviour, Ecology, Biogeography Population Dynamics. Centre for Overseas Pest Research., London.
- Verlinden H., Badisco L., Marchal E., Van Wielendaele P., Van den Broeck J., 2009. Endocrinology of reproduction and phase transition in locusts. *General and comparative endocrinology* 162, 79-92.
- Wyatt T. D. (Ed.) 2003. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Cambridge University Press, N.Y.
- Yildizhan S., van Loon J., Sramkova A., Ayasse M., Arsene C., ten Broeke C., Schulz S., 2009. Aphrodisiac pheromones from the wings of the small cabbage white and large cabbage white butterflies, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. *Chembiochem* 10, 1666-1677.