

---

## Infectividad de *Paranosema locustae* (Microsporidia) en la "tucura quebrachera" *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Romaleidae) en laboratorio

---

LANGE, Carlos E., Christian BARDI y Santiago PLISCHUK

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), CIC - CCT CONICET La Plata - UNLP, Calle 2 N° 584, (1900) La Plata, Argentina; e-mail: carlosl@cepave.edu.ar

### Infectivity of *Paranosema locustae* (Microsporidia) to the 'quebrachera' grasshopper, *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Romaleidae), in the laboratory

■ **ABSTRACT.** Following the standard procedure of orally inoculating third-instar nymphs with  $10^5$  spores each, the infectivity of the microsporidium *Paranosema locustae* (Canning), a pathogen developed for the long-term control of grasshoppers, to *Tropidacris collaris* (Stoll), was determined. In recent years, *T. collaris* has demanded a heavier use of insecticides for its control. The proportion of insects that developed infection was low (38 %;  $n = 50$ ), the level of spore production was almost nil (only two trace infections), and typical signs or symptoms associated with heavy infections were not observed. Since a high production of infective transmissible units (spores) is normally needed for an infectious disease with predominant horizontal transmission to be able to persist in the population of the host, it is inferred that *P. locustae* would not be an efficacious alternative for the control of *T. collaris*.

**KEY WORDS.** Biocontrol agent. Locust. Microsporidium. *Nosema locustae*. Pathogen.

■ **RESUMEN.** Siguiendo el procedimiento estándar de inocular por vía oral ninfas de tercer estadio con  $10^5$  esporos cada una, se determinó la infectividad del microsporidio *Paranosema locustae* (Canning), un patógeno desarrollado para el control biológico a largo plazo de tucuras, respecto del Romaleidae *Tropidacris collaris* (Stoll), especie que en años recientes ha demandado una mayor aplicación de insecticidas para su control. La proporción de insectos que desarrolló infección fue baja (38 %;  $n = 50$ ), la producción de esporos en ellos fue casi nula (sólo dos infecciones traza) y no se observaron signos o síntomas típicos asociados a infecciones fuertes. Dado que una alta producción de unidades infectivas transmisibles (esporos) es normalmente necesaria para la persistencia de una enfermedad infecciosa (con transmisión horizontal predominante) en la población del huésped, se estima que *P. locustae* no sería una alternativa eficaz para el control de *T. collaris*.

**PALABRAS CLAVE.** Agente de biocontrol. Langosta. Microsporidio. *Nosema locustae*. Patógeno.

*Tropidacris collaris* (Stoll), la "tucura quebrachera", es un insecto muy grande cuyos ejemplares adultos machos figuran entre los de mayor tamaño (73-101 mm) que se conocen en las especies de tucuras (Acridoidea). A pesar de ser conocida comúnmente como "langosta quebrachera", se trata en realidad de una tucura típica, pues no alterna entre fases solitaria y gregaria con distinta coloración, morfometría, fisiología y comportamiento, como sí lo hacen las verdaderas langostas. En nuestro país, *T. collaris* tiene una amplia distribución geográfica y suele ser abundante en zonas localizadas del Norte (Carbonell *et al.*, 2006). Aunque es considerada una especie polífaga, los adultos prefieren el follaje de árboles y arbustos de hoja dura como los "quebrachos" (*Aspidosperma*, *Schinopsis*), los "algarrobos" (*Prosopis*) y el "mistol" (*Zizyphus mistol*) (Carbonell *et al.*, 1986). Sin embargo, las ninfas, de hábitos gregarios, consumen prácticamente todo material vegetal que encuentran a su paso. En años recientes, por factores aún no determinados, *T. collaris* parece haber incrementado sus poblaciones en algunas zonas, particularmente en el Norte de Córdoba y Este de Santiago del Estero, hecho que ha motivado un incremento en la aplicación de insecticidas para su control.

El microsporidio originalmente conocido como *Nosema locustae* y recientemente transferido al nuevo género *Paranosema*, es un patógeno esporogénico del tejido adiposo de un amplio espectro de especies de acridoideos, que fue desarrollado como agente de biocontrol de tucuras a largo plazo (Henry, 1990; Lange & Cigliano, 2005). *Paranosema locustae* se estableció como factor biótico adicional de control en comunidades de tucuras del Oeste de la región Pampeana, en el valle de Gualjaina (Chubut) y en Loncopué (Neuquén), como consecuencia de introducciones realizadas entre 1978-1982 y en 1996 (Lange & Cigliano, 2005; Lange & Azzaro, 2008). La alta susceptibilidad de muchas de las especies de tucuras de nuestro país (Lange & Cigliano, 2005) y los niveles relativamente elevados de esporulación mostrados por el patógeno en varias de ellas (Lange, 2003a),

son dos de los factores que permitieron su establecimiento. La presente contribución muestra los resultados de explorar mediante bioensayos, el eventual potencial de *P. locustae* para el control biológico a largo plazo de *T. collaris*.

Hasta el presente, los esfuerzos tendientes al desarrollo de una colonia de cría de *Tropidacris collaris* no han sido exitosos; los insectos empleados en este estudio provinieron de Tres Estacas, Oeste de Chaco, casi en el límite con Santiago del Estero. Fueron colectados en febrero de 2008, como ninfas de segundo, tercero y cuarto estadios. Una vez en el laboratorio, 200 de los ejemplares de la muestra fueron examinados por los métodos de homogenización individual en agua destilada y de disección/observación de órganos y tejidos, en preparaciones bajo microscopía de contraste de fases (X400, X1000) (Lange & Henry, 1996; Undeen & Vávra, 1997) para determinar la condición normal (sana) de los mismos. En las poblaciones de insectos terrestres, los microsporidios, cuando no se hallan en fase epizoótica, suelen ocurrir en prevalencia relativamente baja, del 1% al 10% (Brooks, 1979), de modo que el examen de 200 ejemplares provee una aceptable estimación acerca de la eventual presencia-ausencia de un microsporidio dado.

Los esporos de *Paranosema locustae*, las unidades infectivas transmisibles del patógeno, utilizados en los bioensayos fueron obtenidos de tucuras infectadas (*Dichroplus pratensis* Bruner), capturadas en la zona de establecimiento de *P. locustae* en la región Pampeana (Lange & Cigliano, 2005). A partir de este material, se prepararon suspensiones de esporos purificadas según el método de Lange & Henry (1996). La cantidad de esporos fue cuantificada con un hemocitómetro siguiendo el protocolo de Undeen & Vávra (1997), y se realizaron las diluciones en agua destilada necesarias para obtener la concentración de esporos deseada. *P. locustae* es fácilmente distinguible de los otros microsporidios conocidos asociados a tucuras en Argentina, como *Liebermannia patagonica*, *L. dichroplusae* (Sokolova *et al.*, 2007) y *Liebermannia* sp. en *Covasacris*

*pallidinota* (Bruner) (GenBank accession: EU709818), gracias a los caracteres diagnósticos que posee, que incluyen el tamaño de los esporos, condición diplocariótica, esporogonia disporoblástica y especificidad por el tejido adiposo (Lange, 2003b). Dado que los esporos de *P. locustae* mantienen su viabilidad por años bajo congelamiento (Lange, 1997), las suspensiones fueron conservadas a  $-32^{\circ}$  C hasta su utilización. Antes de realizar los bioensayos se corroboró la viabilidad de los esporos visualizando su refringencia, bajo microscopía de contraste de fases, característica indicadora de condición viable (Sokolova et al., 2008). Suspensiones de esporos del mismo origen y mantenidas bajo las mismas condiciones son utilizadas rutinariamente en nuestro laboratorio para producir infecciones (Lange, 2003a, 2005).

Salvo por unas adaptaciones menores, se utilizó la metodología y dosis estándares para este tipo de estudios, que consiste en inocular por vía oral las ninfas de tercer estadio con una cantidad de  $10^5$  esporos por ninfa (Henry, 1990; Lange, 2003a). Una de las adaptaciones instrumentadas fue el reemplazo del cebo utilizado como vehículo de administración de los esporos. Se dejaron de lado los discos de lechuga empleados normalmente, que no resultan atractivos para *T. collaris*, y se utilizaron en su lugar cebos de la "enredadera" *Ampelopsis* sp., que en experiencias preliminares resultó un alimento apetecido por las "quebracheras". Debido al gran tamaño de *T. collaris*, la otra adaptación implementada fue la utilización de frascos más grandes (de 35 ml) para el ayuno previo de 24 horas de las ninfas y el ofrecimiento individual del cebo con esporos a cada una de ellas. Se inocularon (ingirieron totalmente el correspondiente cebo) 50 ninfas y otras 50 recibieron los cebos pero sin esporos (testigos). Dado que cada ninfa fue tratada individualmente, aislada dentro de un frasco y con la misma dosis, cada inoculación constituyó una repetición, totalizando 50 réplicas de ninfas inoculadas y 50 réplicas de ninfas testigo. Una vez inoculados, los ejemplares fueron mantenidos bajo condiciones controladas ( $30^{\circ}$  C, 14 hs

luz – 10 hs oscuridad, 40 % HR) hasta su muerte o sacrificados los sobrevivientes 70 días después de inoculados. Los ejemplares muertos o sacrificados fueron examinados por disección y homogenización para determinar su condición (sano vs. infectado), y la intensidad de las infecciones fue estimada mediante microscopía de contraste de fases de acuerdo con las categorizaciones empleadas por Henry et al. (1973), Johnson (1989) y Shi et al. (2008).

Puesto que *Paranosema locustae* produce variados efectos subletales, causando infecciones de tendencia crónica y no aguda (Lange & Cigliano, 2005), el interés del estudio se centró en conocer la infectividad (capacidad de provocar infección, Onstad et al., 2006), no la mortalidad, en *T. collaris* y por ello se mantuvo la dosis estándar. Dosis mayores suelen aumentar la mortalidad, pero conspiran respecto de la persistencia del patógeno, ya que el huésped tiende a morir antes de llegar a formar esporos, bloqueando las posibilidades de transmisión. También, el criterio de estimar la infectividad y no la mortalidad condice con el concepto original seguido para el desarrollo de *P. locustae* como agente de control, es decir, aumentar los factores para la disminución y mantenimiento de las densidades de tucuras a largo plazo, a través de los años (Henry, 1990).

No se detectaron microsporidios en los 50 ejemplares testigo, ni en los 200 individuos parte de la muestra original. De las 50 ninfas inoculadas, sólo 19 (38 %) mostraron infección. En sólo dos de éstas (10,5 %), las infecciones alcanzaron un nivel tal que hubo producción de esporos. No obstante, la cantidad producida en ambos casos fue ínfima, constituyó infecciones traza según las categorizaciones utilizadas por Henry et al. (1973) y Johnson (1989) o de nivel 1 de Shi et al. (2008), en las que se visualizaron no más de un esporo por campo del microscopio (X400) o cada cinco cuadrantes menores del hemocitómetro (de acuerdo al protocolo de Undeen y Vávra, 1997) respectivamente. Así, a pesar del tiempo prolongado de mantenimiento de los insectos inoculados, la mayoría de las infecciones (17 casos; 89,5%) no

mostró formación de esporos, sino estados proliferantes del ciclo de desarrollo del patógeno (merontes) y formas previas a la esporulación (esporontes). Tampoco se observaron signos o síntomas que pueden resultar obvios en infecciones fuertes de *Paranosema locustae* (con gran producción de esporos), tales como distensión abdominal, hipertrofia y cambios de coloración del cuerpo graso, disrupción de membranas intersegmentales, letargia o disminución de consumo (Lange & Cigliano, 2005).

Los resultados obtenidos indican que *Paranosema locustae* no sería un agente eficaz para el control a largo plazo de *Tropidacris collaris*. Aunque *T. collaris* resultó susceptible a *P. locustae*, tanto la baja proporción de insectos infectados, como la casi nula producción de esporos en aquellos que desarrollaron infección, sugiere que, en el hipotético escenario de una aplicación a campo, el patógeno sería incapaz de reciclar en la población del huésped. El nivel de producción de unidades infectivas transmisibles de un agente etiológico dado, es uno de los principales factores que gobiernan la persistencia de la correspondiente enfermedad (Andreadis, 1987). Patógenos que, como *P. locustae*, exhiben transmisión horizontal predominante son dependientes, para su persistencia, de la carga de esporos producida por insecto (Dunn & Smith, 2001). Contrariamente a lo ocurrido con *T. collaris*, en especies de tucuras y langostas de franca susceptibilidad a *P. locustae*, los porcentajes de infección en inoculaciones del tipo de las aquí realizadas son muy elevados, con frecuencia del 100 %, y los niveles de esporulación también, del orden de  $10^8$  a  $10^{10}$  esporos por insecto (Lange, 2003a). Salvo en casos de aplicación de dosis extremadamente altas, que pueden causar septicemia, en los microsporidios (grupo para el cual no se ha demostrado la producción de toxinas) la capacidad de producir enfermedad (patogénesis; Onstad *et al.*, 2006) es directamente proporcional a la cantidad de esporos producidos (carga de esporas. Dunn & Smith, 2001), y por ello la falta de signos y síntomas en los individuos

infectados con *P. locustae* concuerda con la casi nula producción de esporos.

Considerando las especies de tucuras que se han hallado naturalmente infectadas con *Paranosema locustae* a nivel mundial, aquellas especies en las cuales se han inducido infecciones en laboratorio o a campo y las respectivas cargas de esporas registradas, se ha observado que las especies pertenecientes a la familia Acrididae, particularmente aquellas de las subfamilias Melanoplinae y Oedipodinae y en menor medida Gomphocerinae, suelen resultar las más susceptibles a *P. locustae* (Lange, 2005). En este sentido, no emerge aún una tendencia definida respecto de las especies de Romaleidae, aunque parecen, al menos en forma preliminar, menos susceptibles. Una sola especie de Romaleidae (*Brachystola magna* (Girard)) fue hallada naturalmente infectada en América del Norte (Lange, 2005), región donde *P. locustae* es autóctono, pero es necesario tener presente que dicha familia se encuentra escasamente representada en ese continente. En la zona de establecimiento de *P. locustae* en la región Pampeana, donde han sido citadas 12 especies de Romaleidae (Carbonell *et al.*, 2006), se encontraron dos especies afectadas: *Diponthus argentinus* Pictet & Saussure y *Zoniopoda tarsata* (Serville) (Lange, 2005) con producción de esporos leve (1 a 10 esporos por campo microscópico) o intermedia (10 a 100 esporos por campo) respectivamente, según la categorización de Henry *et al.* (1973) y Johnson (1989). Por el contrario, *Staleochlora viridicata* (Serville) resultó inmune a *P. locustae* en condiciones de laboratorio (Lange, 2003a).

Visto que *Paranosema locustae* puede ser descartado para el control de *Tropidacris collaris* y no se han descrito patógenos nativos asociados a este insecto, sería de interés realizar estudios prospectivos tendientes a detectar la eventual ocurrencia de agentes causantes de enfermedades aún no conocidos, así como determinar la infectividad de otros patógenos con potencial que podrían resultar de utilidad (Lange, 2004).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sebastián Pelliza por la captura de las "tucuras quebracheras" y a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la provincia de Buenos Aires por el apoyo económico brindado.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ANDREADIS, T. G. 1987. Transmission. *En*: Fuxa, J. R. & Y. Tanada (eds.), *Epizootiology of insect diseases*, John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 159-176.
- BROOKS, W. M. 1979. Induced epizootics: Protozoa. *En*: G. E. Allen, C. Ignoffo & R. Jaques (eds.), *Microbial Control of insects. Future Strategies in Pest Management Systems, Workshop Proceedings*, Gainesville, FL, pp. 37-41.
- CARBONELL, C., M. M. CIGLIANO & C. E. LANGE. 2006. *Acridomorph (Orthoptera) species of Argentina and Uruguay*. CD-ROM. Publications on Orthopteran Diversity, The Orthopterists Society at the Museo de La Plata, Argentina.
- DUNN, A. & J. E. SMITH. 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes infect.* 3: 381-388.
- HENRY, J. E. 1990. Control of insects by Protozoa. *En*: Baker, R. & P. E. Dunn (eds.), *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan Liss, Nueva York, pp. 161-176.
- HENRY, J. E., K. TIAHRT & E. A. OMA. 1973. Importance of timing, spore concentrations, and levels of spore carrier in applications of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) for control of grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 23-272.
- JOHNSON, D. L. 1989. The effects of timing and frequency of applications of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) on the infection rate and activity of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *J. Invertebr. Pathol.* 54: 353-362.
- LANGE, C. E. 1997. Viabilidad del acricidida *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) luego de almacenamiento prolongado. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 56: 63-65.
- LANGE, C. E. 2003a. Niveles de esporulación experimentales y naturales del agente de biocontrol *Nosema locustae* (Protozoa. Microspora) en especies de tucuras y langostas (Orthoptera: Acridoidea) de Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 62: 15-22.
- LANGE, C. E. 2003b. Long-term patterns of occurrence of *Nosema locustae* and *Perezia dichroplusae* (Microsporidia) in grasshoppers of the Pampas, Argentina. *Acta Protozool.* 42: 309-315.
- LANGE, C. E. 2004. Presencia de *Malameba locustae* (Protozoa: Rhizopoda) en acrididos de la provincia de Misiones, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 63: 55-57.
- LANGE, C. E. 2005. The host and geographical range of the grasshopper pathogen *Paranosema (Nosema) locustae* revisited. *J. Orthoptera Res.* 14: 137-141.
- LANGE, C. E. & F. G. AZZARO. En prensa. New case of long-term persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) of Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 357-359.
- LANGE, C. E. & M. M. CIGLIANO. 2005. Overview and perspectives on the introduction and establishment of the grasshopper biocontrol agent *Paranosema locustae* (Microsporidia) in the western Pampas of Argentina. *Vedalia* 12: 61-84.
- LANGE, C. E. & J. E. HENRY. 1996. Métodos de estudio y producción de protistas entomopatógenos. *En*: Lecuona, R. (ed.), *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*, Mariano Mas, Argentina, pp. 169-176.
- ONSTAD, D. W., J. R. FUXA, R. A. HUMBER, J. OESTERGAARD, D. I. SHAPIRO-ILAN, V. V. GOULLI, R. S. ANDERSON, T. G. ANDREADIS & L. A. LACEY. 2006. *An abridged glossary of terms used in invertebrate pathology*. Third Edition, Society for Invertebrate Pathology, www.sipweb.org/glossary.
- SHI, W-P., Y-Y. WANG, F. LV., Ch. GUO & X. CHENG. En prensa. Persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) among grasshopper populations in the Inner Mongolia rangeland, China. *BioControl*. doi: 10.1007/s10526-008-9153-1.
- SOKOLOVA, Y. Y., C. E. LANGE, J. R. FUXA. 2007. Establishment of *Liebermannia dichroplusae* n. comb. on the basis of molecular characterization of *Perezia dichroplusae* Lange, 1987 (Microsporidia). *J. Euk. Microbiol.* 54: 223-230.
- SOKOLOVA, Y. Y., C. E. LANGE, J. R. FUXA. 2008. Phylogenetic relationships of *Heterovesicula cowani*, a microsporidian pathogen of Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae), based on SSU rDNA-sequence analyses. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 112-116.
- UNDEEN, A. & J. VÁVRA. 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. *En*: L. Lacey (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*, Academic Press, San Diego, pp. 117-15.