

Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*)

Mamour TOURE^{1*}, Amadou FALL¹, Fawrou SEYE², Raymond Demba NDIONE¹,
Thierno Seydou BADIANE¹ et Mady NDIAYE¹

¹ Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Laboratoire Biologie de la Reproduction, BP 5005 Dakar Fann, Sénégal

² Université Gaston Berger de Saint Louis, UFR Sciences de la Santé

* Correspondance, courriel : touresnfst@yahoo.fr

Résumé

Cette étude porte sur le criquet sénégalais *Oedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) dont des larves sont capturées dans l'animalerie et dans le jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques et sur trois souches locales de champignon deutéromycète *Metarhizium anisopliae* (Metschikoff, Sorokin). Nous avons effectué six traitements avec ces trois souches. Une microseringue remplie de la formulation est piquée sous le pronotum pour infecter les larves. Elles sont placées dans des cages et sont nourries quotidiennement avec de l'herbe. Le constat des résultats se fait chaque jour pendant la matinée. Ces souches ont entraîné chacune une mortalité de 100 % des larves au bout de 14 jours environ. Les insectes morts ont changé complètement de couleur avec une cuticule très sèche due à l'effet du champignon. Le temps létal pour 50 % des insectes traités (LT50) est compris entre 9 et 11 jours. Les parties externes de l'insecte sont aussi atteintes. La sporulation observée sur les larves mortes joue un rôle important pour la rémanence du produit. Les coupes histologiques montrent que les organes internes sont attaqués différemment par le biopesticide.

Mots-clés : *criquet sénégalais, Metarhizium anisopliae, efficacité, souche.*

Abstract

Histopathology and effect of *Metarhizium anisopliae* on the larval stages of the senegalese grasshopper (*Oedaleus senegalensis*)

Survey is achieved on senegalese grasshopper *Oedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) of which larvas are captured in the reserve of animals and in the botanical garden of Sciences and Techniques Faculty and three local strains of *M. anisopliae*. We did six treatments with the strains. A microsyringe permits to infect the larvas near the thorax. These strains entailed a mortality of 100 % of the larvas on 14 days about. The lethal time for 50 % of insects treated (LT50) is between 9 days and 11 days. The dead insects changed color completely with a very dry cuticle due to effect of hyphomycete. The external parts of the insects are also reached. Sporulation observed on dead larvas has an important role in remanence (residual induction) of product. The histological cuts show that internal organs are attacked differently by the biologic pesticide.

Keywords : *senegalese grasshopper, Metarhizium anisopliae, efficiency, strain.*

1. Introduction

Depuis des millénaires l'homme est confronté aux pullulations des criquets pèlerin et sénégalais. Ces derniers compromettent l'équilibre alimentaire souvent fragile des populations surtout celles d'Afrique. Dans la lutte antiacridienne plusieurs méthodes sont utilisées. La lutte chimique est la plus employée et offre beaucoup plus de résultats. Durant la recrudescence acridienne de 2004-2005 qui a touché 16 pays la plupart en Afrique du nord-ouest et au Sahel, quelques 12,8 millions d'hectares infestés ont été traités à l'aide de pesticides chimiques [1]. Cependant cette méthode est entachée de conséquences très néfastes sur les écosystèmes naturels et par rétroaction sur l'homme lui-même. L'intérêt porté aux entomopathogènes dans la lutte biologique contre ces ravageurs de culture est vieux de plus d'un siècle [2]. Après la grande invasion de 1986 à 1989, des souches virulentes de *Metharizium anisopliae* ((Metschikoff) Sorokin) (Champignon Deutéromycète) sur les criquets ravageurs et moins offensives à l'environnement que les produits conventionnels ont donné de bons résultats [3]. Sous la formulation liquide les spores de *M. anisopliae* infectent principalement leur hôte par contact suite à une pénétration cuticulaire. [2], trouvent que ce produit assure une longue protection des zones traitées grâce à leur rémanence. Ainsi, une bonne maîtrise de la pathogénicité et des techniques d'application de *M. anisopliae* permet d'isoler des souches capables de surmonter les contraintes climatiques. Dans le présent travail, la sensibilité de larves de criquet sénégalais *Dedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) à l'entomopathogène a été étudiée. L'effet sur les différents organes a été évalué. Nous avons insisté sur l'histopathologie car beaucoup d'auteurs ne s'intéressent pas sur ce domaine qui s'avère pourtant aussi important. La sélection des organes cibles contribue à déterminer la meilleure souche.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

Le matériel biologique utilisé est constitué par du criquet sénégalais *O. senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) et d'un biopesticide *M. anisopliae* ((Metschikoff) Sorokin) qui est un champignon deutéromycète. Nous avons également utilisé des produits chimiques pour faire de l'histologie (boin alcoolique, carnoy II, alcool, paraffine), et des produits pour faire des coupes semi-fines (glutaralaldéhyde, épon, résine) sont également utilisés. Le matériel de laboratoire est constitué de : centrifugeuse, réfrigérateur, étuve, microtome manuel, microtome automatique Ultracut E. Un microscope Motic relié à l'ordinateur est aussi utilisé.

2-2. Méthode

2-2-1. Préparation du biopesticide

Les trois souches de *M. anisopliae* sont des souches locales isolées dans le pays et ont été obtenues grâce à la collaboration avec le laboratoire de zoologie agricole de la Direction de la protection des végétaux. Les spores sont ensuite cultivées dans de l'agar pour une multiplication massive. Pour voir l'aspect morphologique de ces souches, nous avons fait des coupes semi-fines de 0,75 μm d'épaisseur. L'observation est faite au microscope photonique Motic relié à l'ordinateur. Une culture de spore est réalisée dans de l'eau pour voir le taux de germination.

2-2-2. Capture des larves et traitement

Les larves du criquet sénégalais sont capturées dans l'animalerie et dans le jardin botanique grâce à un filet à insecte. Nous les identifions au laboratoire à l'aide d'une clef. Les larves au nombre de 240 de stade 3 et de stade 4 sélectionnées sont placées dans la chambre froide du réfrigérateur pendant 4 à 5 mn pour les immobiliser. Les spores sont formulées dans de l'eau distillée. L'inoculation de 5 µL du mélange soit une concentration de $5 \cdot 10^5$ spores viables est faite sous le pronotum. A la fin du traitement les larves sont placées dans des cages. Des insectes non traités ont servi de témoin. L'éclairage est d'environ 12 à 13 heures par jour comme dans les conditions naturelles. La température varie entre 22 et 26 ° et l'humidité se situe entre 60 et 95 %. Les individus sont nourris quotidiennement avec de l'herbe et de la poudre de pain. Le constat des résultats se fait chaque jour pendant la matinée.

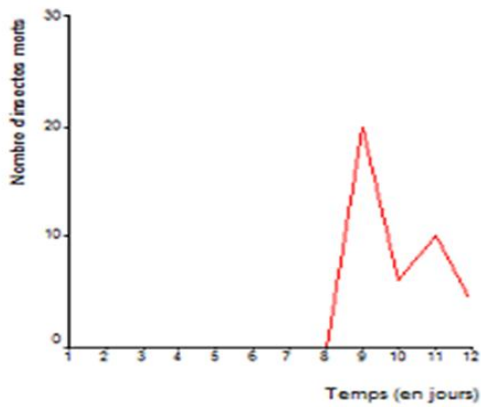
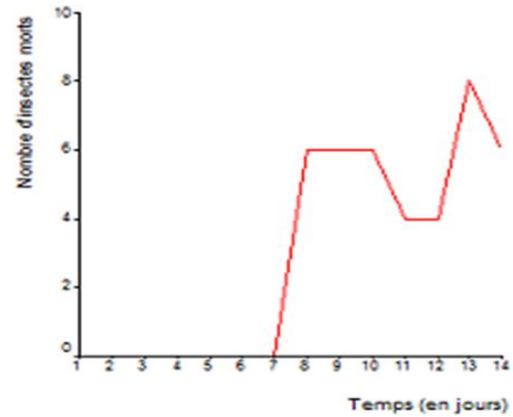
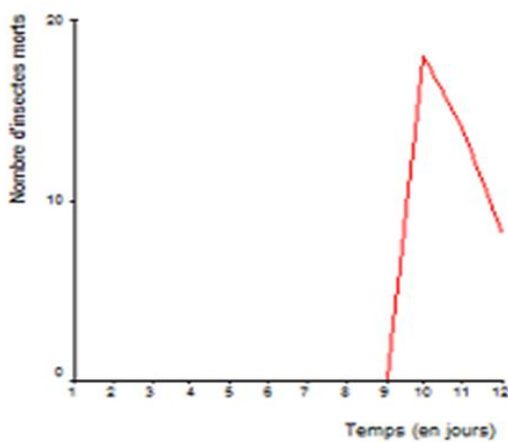
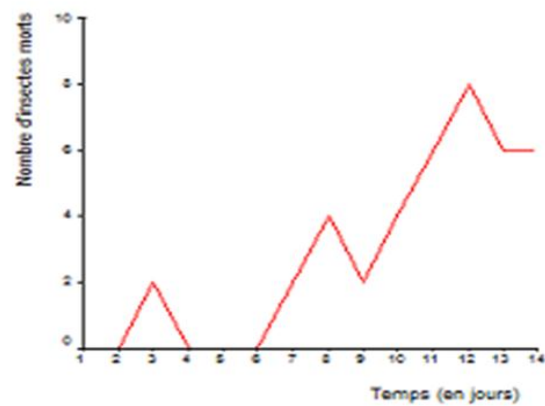
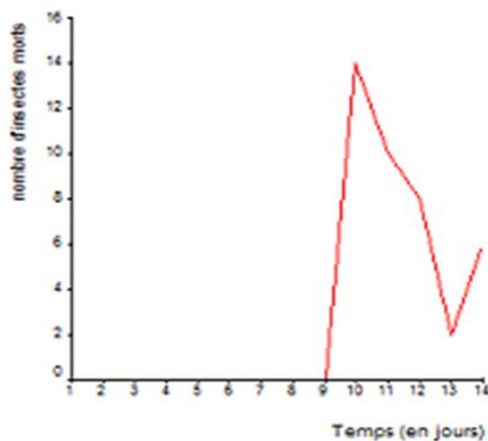
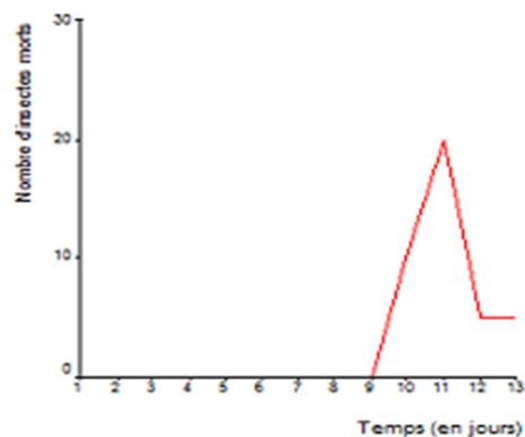
2-2-3. Étude histopathologique

Les insectes morts sont fixés dans une solution de boin alcoolique et de carnoy II. Le ramollissement de la cuticule est fait par une solution de Marc André, ensuite la déshydratation est réalisée à l'aide de bains d'alcool croissante. L'imprégnation est faite avec la butiparaffine et l'inclusion dans la paraffine. Les blocs ainsi obtenus sont taillés et coupés au microtome pour une épaisseur de 7 µm. Les lames sont colorées au Trichome de Masson puis sont observées au microscope photonique Motic relié à l'ordinateur et des photos sont prises avec l'ordinateur.

3. Résultats

3-1. Efficacité des souches

La mortalité des insectes avec la souche 1 commence à partir du 9^{ème} jour après le traitement. Pour cette manipulation les insectes sont complètement tués au 12^{ème} jour. Le nombre d'insectes morts est plus élevé au 9^{ème} jour (**Figure 1**). Pour le deuxième traitement le temps écoulé pour que l'ensemble des insectes soit tué est plus long que le premier traitement avec 14 jours. La mortalité des insectes est constante durant les trois premiers jours (**Figure 2**). Pour ces traitements les temps létaux pour 50 % des insectes (temps qui s'écoule pour que la moitié des insectes traités soient tués TL50) sont de 9 jours et de 10 jours respectivement pour le premier et le deuxième traitement. Avec la souche 2, les insectes commencent à mourir au 10^{ème} jour. Cette mortalité des larves se poursuit et prend fin au 12^{ème} jour. Le plus grand nombre d'insectes morts est enregistré au premier jour de mortalité, coïncidant avec le 10^{ème} jour après le traitement (**Figure 3**). Au deuxième traitement déjà au 3^{ème} jour on commence à avoir des insectes morts. La mortalité maximale est observée au 12^{ème} jour et se termine au 14^{ème} jour (**Figure 4**). Le TL50 des insectes est de 10 jours pour le premier traitement et 11 jours pour le deuxième. Les insectes commencent à mourir avec la souche 3 à partir du 10^{ème} jour et la mortalité se poursuit jusqu'au 14^{ème} jour (**Figure 5**). Le nombre d'insecte mort est plus élevé au 11^{ème} jour après le traitement et un jour après le début de mortalité (**Figure 6**). Le TL50 est de 10 jours pour le premier traitement et de 11 jours pour le deuxième traitement. Les témoins n'ont montré aucune mortalité durant tout le temps de l'expérience.

Figure 1 : Mortalité souche 1, 1^{er} traitementFigure 2 : Mortalité souche 1, 2^{me} traitementFigure 3 : Mortalité souche 2, 1^{er} traitementFigure 4 : Mortalité souche 2, 2^{me} traitementFigure 5 : Mortalité souche 3, 1^{er} traitementFigure 6 : Mortalité souche 3, 2^{me} traitement

3-2. Coupes histopathologiques

Les coupes montrent des spores avec un aspect et des formes différents. Les formes en bâtonnets sont plus nombreuses que les formes rondes. La taille des spores est aussi variable. (Figure 7). Les filaments sont allongés avec des sens d'orientation très divers dans le milieu de culture (Figure 8). Le filament mycélien passe sous le pronotum pour s'allonger ensuite sur le corps de l'insecte grâce aux phénomènes de thigmotropisme. Le pronotum est soulevé par la pression des filaments du champignon qui a gagné tout le

milieu intérieur de l'insecte. La cuticule de l'insecte est par ailleurs devenue très sèche (**Figure 9**). Les insectes sont neutralisés par le champignon avec des modifications importantes ; les antennes sont atteintes, les pattes perdent leur équilibre, l'organisme est sans motricité avant la mort (**Figure 10**). Les coupes histologiques montrent une destruction de la paroi du tube digestif et les filaments à l'intérieur de l'insecte, prennent une position longitudinale ou verticale (**Figure 13**). On voit aussi des tubes de Malpighi qui présentent des lésions et des ceaca gastriques qui sont détruits (**Figure 11**). Des granulomes (amas pseudotissulaires entourant le filament ou la spore) se forment à l'intérieur du muscle ou dans l'espace intermusculaire. Le système nerveux céphalique des insectes a été aussi affecté par le champignon. La diminution de taille est visible et très nette (**Figure 12**).

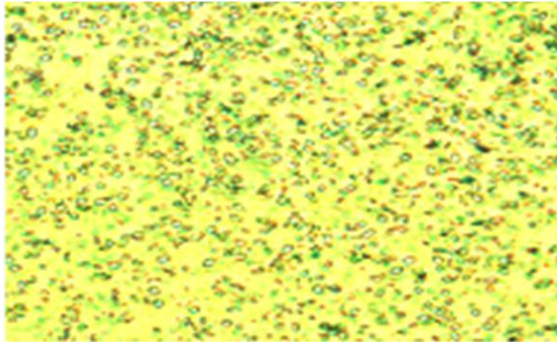


Figure 7 : Spores de champignon coupées × 400

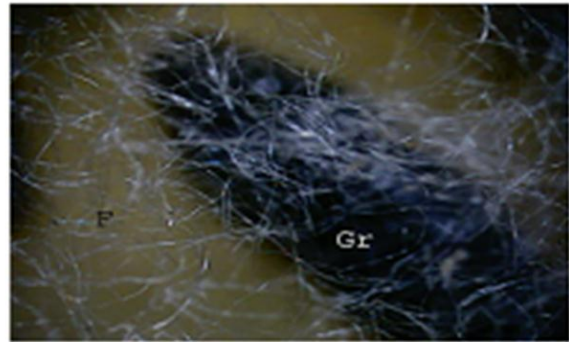


Figure 8 : *Metarhizium anisopliae* sur grain de riz
F : filament, Gr : grain de riz. × 40

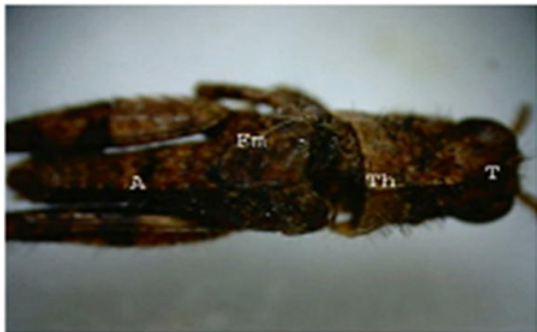


Figure 9 : *Oedaleus senegalensis* infecté

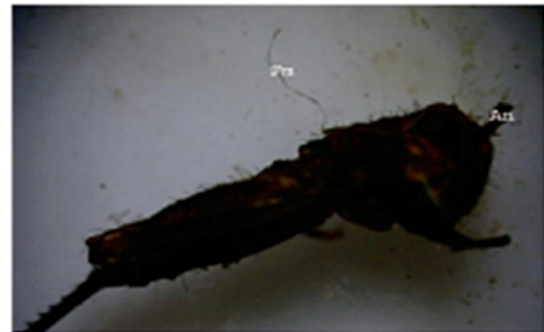


Figure 10 : *Oedaleus senegalensis* infecté avec cuticule décolorée

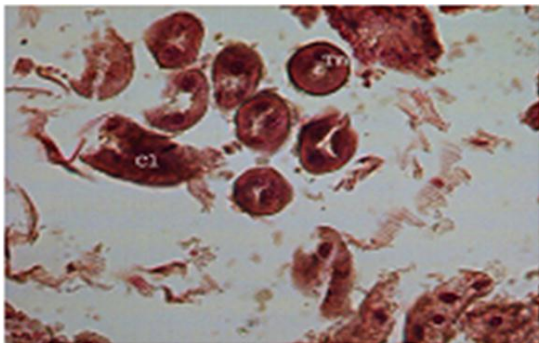


Figure 11 : Coupe de l'insecte, Tm : tube de malpighi

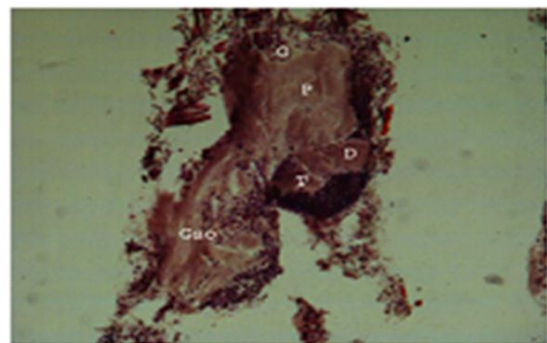


Figure 12 : Système nerveux céphalique de l'insecte. Gso : ganglion sous œsophagien, D : deutocérébron, P : protocérébron, T : tritocérébron, O : œil

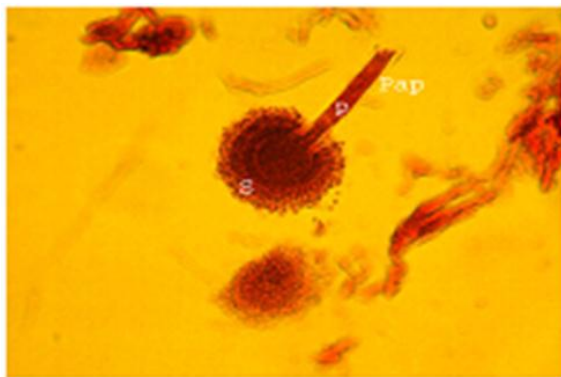


Figure 13 : Coupe *Metarhizium anisopliae*. Pap : paroi du pédicelle, P : pédicelle, S : spore

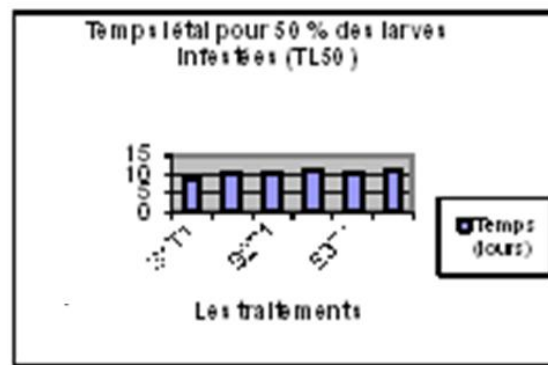


Figure 14 : Temps Létal pour 50 % des insectes

4. Discussion

Les températures du laboratoire révèlent un fort pouvoir d'infection et de germination du champignon montrant une sporulation et des filaments longs. Par ailleurs cette gamme de température confirme les travaux de [4] qui ont trouvé des optimums thermiques de 25 et 32 °C pour deux souches de *M. anisopliae*. [5] trouve les mêmes résultats que les notre avec des températures variant entre 25 et 32 °C. Cependant nos températures sont différentes avec la température optimale de 15 °C qu'a trouvé [6] pour la germination de *M. anisopliae*. Les travaux sur terrain de [7 - 10] révèlent des résultats similaires à ce que nous avons avec une température de 25 °C. Toujours en travaillant sur une gamme de température allant de 5 à 50 °C, [11] trouvent que les températures de 25 à 32 °C sont meilleures pour une bonne germination de l'hyphomycète *M. anisopliae*. De toutes ces observations on peut dire que la température est un facteur important dans la pathogénicité du champignon. L'humidité constitue aussi un facteur déterminant quant à l'attaque du champignon sur les larves. Les humidités enregistrées lors des manipulations ont une influence positive sur la mortalité des larves. Ainsi beaucoup d'auteurs ont travaillé sur l'humidité et le champignon. On peut citer [6, 10, 12 - 15]. Ces auteurs trouvent des humidités qui corroborent nos résultats. Par contre une grande différence est notée avec les travaux de [7, 16, 17] qui ont enregistré sur le terrain une humidité relative de 23 % alors qu'on a les mêmes résultats.

Le début de mortalité se situe entre 8 et 10 jours après le traitement sauf au deuxième traitement avec la souche 2 dont des insectes sont trouvés morts au 3^{ème} jour après le traitement. Vu la différence avec les autres traitements, nous pensons que cette mortalité n'est pas due à l'effet du champignon mais à d'autres facteurs tel que la fatigue, le stress. Nos résultats sont similaires avec ceux de [18 - 22] qui ont enregistré des insectes morts au 8^{ème} jour après avoir traité des adultes de *S. gregaria* avec du *M. anisopliae*. [23] en faisant une application à grande échelle dit qu'il est impossible de voir sur le terrain des insectes morts du champignon avant les 7 jours après traitement. La mortalité atteint son maximum au jour où le mycélium est au maximum de sa croissance. Pour évaluer l'efficacité des souches nous avons cherché le temps létal pour 50 % des insectes pour chaque traitement. Ce temps varie de 9 à 11 jours (**Figure 16**). Le test d'ANOVA appliqué aux TL50 des trois souches révèle que les différences observées ne sont pas significatives donc les souches ont les mêmes effets. (F observé = 5,79 est supérieur à F calculé = 0,6). [3] en travaillant sur des larves de stade 3 (L3) et des souches de *M. anisopliae* trouvent un TL 50 variant entre 4,3 et 10,7 jours (**Figure 14**). Prior (1997) rapporte que la dose utilisée par LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et les SAuteriaux) et appliquée sur des larves de *O. senegalensis* tue 50 % des insectes au bout de 5 à 5 jours. Bateman *et al.* trouvent une moyenne du TL50 des 26 souches testées de 4,4 jours

(donnée non publiée citée par [24]). Si beaucoup de travaux sont menés pour étudier la toxicité générale des biopesticides, on constate que l'on ne se préoccupe guère de la pathogénicité. Le changement de couleur intervient après que l'insecte soit neutralisé. Ceci s'explique par l'action combinée des réactions de l'insecte et des effets du champignon. [25] isolent la substance active de dégradation de la cuticule dans le *M. anisopliae*. Les antennes atteintes par l'infection entraînent une perte du sens de l'orientation et l'animal finira par mourir. Les pattes touchées par le champignon montrent des anomalies et peuvent disparaître entraînant une difficulté pour la prise de nourriture. La prise de l'organisme par *M. anisopliae* avant la mort de l'insecte se manifeste par des événements distincts comme dans le cas des insecticides chimiques. Sandoz *et al.* découvrent quatre phases chez *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche et Fairmaire 1850) traité avec la lindiane : une phase prodromique, une phase choréo-ataxique, une phase clonique et le dernier stade psérique ou paralytique (cité par [26]). Cependant, nos observations nous ont permis de constater une phase où l'insecte repose sur le dos et est incapable de se relever, les appendices et les segments abdominaux sont animés de mouvements convulsifs. Une deuxième phase où tous les muscles sont tétanisés et paralysés suivie de la mort de l'insecte.

Ces phases correspondent respectivement aux deux dernières phases de Sandoz *et al.* Les symptômes d'un criquet atteint par *Beauveria tenella* (Deher.) Siem) sont décrits par [27, 28]. La structure des apodèmes est intéressante, ils jouent un rôle important dans la défense de l'organisme par la formation de granulomes. L'intestin montre des troubles concernant le fonctionnement et des troubles conduisant à la formation de hernies épithéliales. Ces dernières sont l'indice d'un affaiblissement de la lame basale. Les troubles du fonctionnement sont sensibles à la diversité des traitements effectués. La destruction des tubes de Malpighi empêche l'élimination des déchets et par conséquent l'insecte meurt par accumulation de déchets. Le système nerveux atteint empêche la reproduction des insectes, donc le champignon peut retarder ou empêcher une génération tout entière de se construire. La sporulation est décrite par de nombreux auteurs : [7, 14, 28, 30, 31] mais celle observée à l'intérieur de l'insecte n'est mentionnée par aucun. Cette sporulation découle d'une prise de la biologie de l'insecte. La production des spores permet la protection de longue durée de la zone traitée. Ainsi, il n'est pas nécessaire de traiter à nouveau. D'autre part, la sporulation indique l'effet biologique du champignon et son absence indique sa disparition suite à sa dégradation.

Références

- [1] - N. GRAAFF, Une arme respectueuse de l'environnement permet de lutter contre les acridiens. <http://www.fao.org/newsroom/fr/news/2005/103849/index.html>, (2005)
- [2] - C. PRIOR, R. J. MILNER, G. L. BAKER, and G. H. S. HOOPER, Development of a mycoinsecticide for the Australian plague locust: New Strategies in Locust Control, Birkhäuser Verlag, Basel, (1997) 177 - 183
- [3] - G. ZIMMERMANN, B. ZELAZNY, R. KLEESPIES & M. WELLING, Biological control of african locust by entomopathogenic microorganisms. New Trends in Locust control, (1994) 127 - 138
- [4] - C. M. H. KANE & E. H. B. L. SAKHO, Effets de *Metarhizium flavoviride* (Deutéromycète, Hyphomycètes) sur *Schistocerca gregaria* (Forskäl, 1775) (Orthoptère Acrididea). Projet Lutte Biologique et intégrée contre les acridiens GTZ. Sst, (2000)
- [5] - A. OUEDRAOGO, Conditions d'infection des acridiens par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium*, et variabilité de la tolérance aux contraintes climatiques des isolats fongiques candidats à la lutte anti-acridienne. Mémoire thèse de doctorat es sciences, Université de Paris XI, Orsay (France), (1996)
- [6] - T. E. STATHERS, D. MOORE & C. PRIOR, The effect of Different Temperatures on the Viability of *Metarhizium flavoviride* Conidia Stored in Vegetable and Mineral Oils. *Journal of invertebrate pathology*, 62 (2) (1993) 111 - 115

- [7] - E. M. O. TALEB & A. DIALLO, Field Demonstration of the use of *Metarhizium anisopliae* for Desert Locust Control Using the Release-Spray-Method. [www.fao.org.](http://www.fao.org/) / NEWS / GLOBAL / LOCUSTS, (2001)
- [8] - R. B. LOPES, D. A. SOUZA, L. F. N. ROCHA, C. MONTALVA, C. LUZ, R. A. HUMBER, M. FARIA, *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17, (2017) 0114 - 0137
- [9] - D. G. P. OLIVEIRA, R. B. LOPES, J. M. REZENDE, I. J. DELALIBERA, Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 16, (2017) 0131 - 0150
- [10] - C. G. ATHANASSIOU, N. G. KAVALLIERATOS, RUMBOS C. I., D. C. KONTODIMAS, Influence of Temperature and Relative Humidity on the Insecticidal Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae) on Wheat. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17 (2017) 093 - 0114
- [11] - D. STEPHAN, M. WELLING & G. ZIMMERMAN, Locust control with *Metarhizium favouride*: new approaches in the development of a biopreparation based on blastospores. *New Strategies in Locust Control*, (1997) 151 - 158
- [12] - C. LOMER, Phase 3 final report- Lubillosa- Biological and Grasshopper Control Project. CABI, IITA, Cotonou, Benin, (1999) 73
- [13] - J. H. HAN, B. R. JIN, J. J. KIM, S. Y. LEE, Virulence of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the Microbial Control of *Spodoptera exigua*. *Mycobiology*, 42 (4) (2014) 385 - 390
- [14] - D. MENT, G. GINDIN, I. GLAZER, S. PERL, D. ELAD, M. SAMISH, The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydozoospores in tick eggs. *Fungal Biology*, 114 (1) (2010) 49 - 56
- [15] - M. LEKIMME, C. FOCANT, F. FARNIR, B. MIGNON, B. LOSSON, Pathogenicity and thermotolerance of entomopathogenic fungi for the control of the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Exp Appl Acarol.*, 46 (4) (2008) 95 - 104
- [16] - BROOKS A. J., M. A. DE MURO, E. BURREE, D. MOORE, M. A. TAYLOR, R. WALL, Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. *Pest Manag Sci.*, 60 (10) (2004) 029 - 043
- [17] - M. M. EL-SHAZLY, M. M. SOLIMAN, A ZAYED, Seasonal abundance, number of annual generations, and effect of an entomopathogenic fungus on *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae). *Environ Entomol.*, 41 (1) (2012) 11 - 29
- [18] - H. WILPS, O. NASSEH, S. KRALL & O. KABO, Lutte contre les *Shistocerca gregaria* Adultes au Moyen de Nouvelles Préparations et Méthodes. Form Protect Vegetaux UCTR/PV, (1992)
- [19] - R. PEVELING, S. ATTIGNON, J LANGEWALD & Z. OUAMBAMA, An assesment of the impact of biological and chemical grasshopper control agent on ground – welling arthropods in Niger, based on presence/absence sampling. *Crop Protection*, 18 (3) (1999) 323 - 339
- [20] - V. KRYUKOV, O. YAROSLAVTSEVA, M. TYURIN, Y. AKHANAIEV, E. ELISAPHENKO, T. C. WEN, O. TOMILOVA, Y. TOKAREV, V. GLUPOV, Ecological preferences of *Metarhizium* spp. from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17, (2017) 001 - 007
- [21] - K. V. Y. RYUKOV, O. N. YAROSLAVTSEVA, M. M. WHITTEN, M. V. TYURIN, K. J. FICKEN, C. GREIG, N. R. MELO, V. V. GLUPOV, I. M. DUBOVSKIY, T. M. BUTT, Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Insect Sci.*, Vol. 10, (2016)
- [22] - L. P. BARRETO, C. LUZ, G. M. MASCARIN, D. W. ROBERTS, W. ARRUDA, É. K. FERNANDES, Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and

- artificial medium. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 16, (2016) 094 - 103
- [23] - R. BATEMAN & T. MATTHEW, Pathogen application against locust and grasshoppers: insecticide or biological control. *Outlook on Agriculture*, 27 (1) (1998) 16 - 21
- [24] - R. G. KLEESPIES, A. M. HUGER & D. STEPHAN, Diagnosis and pathology of diseases from locusts and other orthopterans. GTZ (Eschborn, Germany) and BBA (Darmstadt, Germany), (2000) 43
- [25] - F. M. FREIMOSER, S. SCREEN, BAGGASAVITA, GANGAU & S. R. J.LEGER. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 49 (1) (2003) 239 - 247
- [26] - A. V. LATCHININSKY & M. H. L. LUONG. Le criquet marocain *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815), dans la partie orientale de son aire de distribution. *Presse de l'imprimerie DEHAN*, (1992) 95 - 114 p.
- [27] - A. A. NOURZHANOV & A. V. LATCHINININSKY, Les micro-organismes pathogènes des acridiens grégariaptés en Ouzbékistan.-IN : SHUMAKV E. M. (Ed. Sc.), (1987)
- [28] - C. HERNANDEZ-DOMINGUEZ, A. W. GUZMAN-FRANCO, M. G. CARRILLO-BENITEZ, R. ALATORRE-ROSAS, E. RODRIGUEZ-LEYVA, J. A. VILLANUEVA-JIMENEZ, Specific Diversity of *Metarhizium* Isolates Infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in Sugarcane Plantations. *Neotrop Entomol.*, 45 (1) (2016) 80 - 87
- [29] - R. M. OUEDRAOGO, M. CUSSON, M. S. GOEETTEL & J. BRODEUR, *Inhibition of fungal growth in thermoregulating locust, Locusta migratoria, infected by the fungus Metarhizium anisopliae var acridum.* *Journal of Invertebrate pathology*, 82 (2) (2003) 103 - 109
- [30] - B. G. EVANS, K. S. JORDAN, M. BROWNBIDGE, R. H. HALLETT, Effect of Temperature and Host Life Stage on Efficacy of Soil Entomopathogens Against the Swede Midge (Diptera : Cecidomyiidae). *J Econ Entomol.*, (2) (2015) 473 - 83
- [31] - Q. MA, K. JIN, G. PENG, Y. XIA, An ENA ATPase, MaENA1, of *Metarhizium acridum* influences the Na(+)-, thermo- and UV-tolerances of conidia and is involved in multiple mechanisms of stress tolerance. *Fungal Genet Biol.*, (83) (2015) 68 - 77