

Effects of the herbicide dichlobenil on mitotic instability and haploidization of diploid strains of *Aspergillus nidulans*

A. CHIBANI

Institut de Biologie, Université de Mostaganem

Summary : The herbicide dichlobenil was compared with the standard haploidizing chemicals, benomyl and p-fluorophenylalanine, for its effects on mitotic stability and haploidization of diploid colonies of *A. nidulans*. Three different diploid strains were used so that the influence of a gene conferring resistance to dichlobenil (*dicA*) on mitotic stability could also be determined. Diploid colonies homozygous for the normal allele (*dicAS* // *dicAS*) and the mutant allele (*dicA^r* // *dicA^r*) or heterozygous at this locus (*dicA^r* // *dicAS*) were transferred to dishes of CM and CM supplemented with dichlobenil, benomyl or pfa and incubated at 37°C. The number of sectors scored after 4 and 8 days incubation was used as a measure for mitotic instability. This investigation has shown that dichlobenil causes an increase in the somatic instability of *A. nidulans* diploids, and is as effective as the haploidizing chemicals benomyl and p-fluorophenylalanine (pfa) in generating haploid sectors.

Key words : Dichlobenil, *Aspergillus nidulans*, Mitotic instability, Haploidization benomyl, p-fluorophenylalanine.

ملخص : تم في هذا البحث دراسة أثر مبيد الحشائش dichlobenil على الاستقرار الميتوزي والاستيحاء المجموعي لمسحمرات ثنائية الصيغة الصبغية للفطر *Aspergillus nidulans*، ومقارنة ذلك بالمركبات المستعملة في إحداث ظاهرة عدم الاستقرار الميتوزي والاستيحاء المجموعي. إستعمل لهذا الغرض ثلاثة سلالات ثنائية مختلفة في الطابع الوراثي بالنسبة للمروثة المسؤولة على مقاومة المبيدات الفطرية *dicA*، لدراسة أثر وجود هذه المورثة على الاستقرار الميتوزي. السلالة الأولى حساسة نقية (*dicAS* // *dicAS*) والثانية مقاومة نقية (*dicA^r* // *dicA^r*) أما الثالثة فكانت مقاومة هجينة (*dicA^r* // *dicAS*). تم إنماء هذه السلالات على أربعة أنواع من الأوساط المغذية : الوسط الكامل CM، الوسط CM + dichlobenil، الوسط CM + benomyl، والوسط CM + pfa. حضنت الأطباق على درجة حرارة 37°م و تم إحصاء عدد ونوع القطاعات المتكونة على المستعمرات (كدليل على عدم الاستقرار الميتوزي) بعد 4 و 8 أيام من التحضين. بينت النتائج أن المبيد dichlobenil يسبب زيادة معتبرة في عدد القطاعات (عدم الاستقرار الميتوزي) ويكون فعالا جدا في إحداث الاستيحاء المجموعي (تكوين قطاعات أحادية الصيغة الصبغية) مثله مثل المركبات المعروفة في هذا المجال benomyl و pfa.

الكلمات الدالة : ديكلوبنيل، *Aspergillus nidulans*، عدم الاستقرار الميتوزي، الإستيحاء المجموعي، بينوميل، بار ١ - فليوروفنيل الانين.

INTRODUCTION :

Dichlobenil (2, 6-dichlorobenzonitrile) is structurally similar to aromatic hydrocarbon fungicides. Leroux and Fritz (1984) classified dichlobenil with the aromatic hydrocarbon fungicides on the basis that fungi are cross-resistant to these chemicals. It is used as a selective herbicide for safe clean-up of annual and perennial weeds in agriculture and horticulture. This herbicide inhibits actively growing meristems (Koopman and Daams, 1960). Although it has not been used as a fungicide, its antifungal properties have been described by Leroux and Fritz (1984).

Several fungicides are known to interfere with the process of mitosis. For example, members of the benzimidazole group (e.g. benomyl, thiabendazole, thiophanate-methyl) interfere with nuclear and cellular division by inhibiting assembly of microtubules (Oakley and Oakley, 1989). Griseofulvin interferes with the mitotic spindle in *A. nidulans* (Crackower, 1972) and *Basidiobolus ranarum* (Gull and Trinci, 1973). Kappas and Georgopoulos (1974) concluded that the sites of action of griseofulvin and benomyl were different, since the ben¹ mutant of *A. nidulans* (Hastie and Georgopoulos, 1971), which was highly resistant to benomyl, was as sensitive to griseofulvin as the wild type. Studies with chloroneb have shown

that it might act directly or indirectly on DNA synthesis in *Rhizoctonia solani* (Hock and Sisler, 1969) and *Ustilago maydis* (Tillman and Sisler, 1973). These compounds also cause instability of diploid strains of *A. nidulans* by increasing the frequency of somatic segregation (Hastie, 1970 ; Kappas et al., 1974), which is further evidence that they interfere with nuclear function. The effects of actinomycin D and benomyl on diploids of *A. nidulans* were due to at least three different mechanisms : nondisjunction, mitotic crossing over, and chromosome breakage-deletion according to Kappas (1978).

In addition to their ability to induce somatic segregation, some fungicides may also have mutagenic effects. For example, benzimidazoles, captan, dactanil and dithane were found to cause point mutations in several microbial systems (Martinez-Rossi and Azevedo, 1987). Therefore, newly developed fungicides should be examined carefully for their ability to perform mutagenic activities ; if a particular fungicide appears to be mutagenic, it should not be used on food crops.

MATERIAL :

Strains :

The strains of *Aspergillus nidulans* used in these studies were subcultures of stocks from the Sheffield University collection (Chabani, 1990).

Media :

This was a modified form of Czapek-Dox (Pontecorvo et al., 1953), Complete medium (CM) were stored as 10X concentrates at 4°C over chloroform, diluted to working strength with distilled water and solidified with 2 % (w/v) Steetley agar, and sterilized by autoclaving at 15 psi. for 15 min.

METHODS :

The technique of Ingle and Hastie (1974) for studies of *Verticillium alboatrum* was modified for use with *Aspergillus nidulans* in order to obtain heterokaryon and diploid strains.

Homozygous fungicide sensitive ($dicA^S // dicA^S$), homozygous resistant ($dicA^r // dicA^r$) and heterozygous ($dicA^r // dicA^S$) diploids were synthesized. Individual germinated diploid conidia on small blocks of medium were transferred to the centres of dishes of CM or CM supplemented with 50 µg/ml dichlobenil or p-fluorophenylalanine, or 0.25 µg/ml benomyl. The numbers of sectors were counted after 4 and 8 days incubation at 37°C. The sectors from every colony were classified as haploid according to their conidial size (Roper, 1971).

RESULTS :

Microcolonies homozygous for the normal allele ($dicA^S // dicA^S$) and the mutant allele ($dicA^r // dicA^r$) or heterozygous at this locus ($dicA^S // dicA^r$)

were transferred to dishes of CM and CM supplemented with 50 µg/ml dichlobenil, 0.25 µg/ml benomyl or 50 µg/ml pfa, and incubated for 8 days at 37°C. In all experiments 30 colonies of each diploid were tested on each medium. The number of 'sectors' visible after 4 days and 8 days was used as a measure of the mitotic (somatic) instability of the diploid colonies under the various conditions of growth. The 'sectors' scored were clearly defined sectors which were clearly different from the main colony in conidial colour of hyphal pigmentation.

The effects of dichlobenil, benomyl and pfa on sectoring of $dicA^S // dicA^S$, $dicA^r // dicA^r$ and $dicA^S // dicA^r$ diploids are illustrated in Figure 1 and Table I.

These results show that all of the chemicals are effective in causing an increase in somatic instability. Compared with the control medium, CM, there are more sectors, and the sectors appear more quickly, on CM containing any one of the chemicals tested. The sectors on medium supplemented with pfa were often morphologically abnormal, with stunted conidiophores and poor pigmentation (it was often difficult to distinguish areas of the colonies bearing green conidiophores from those with yellow or white conidiophores). The sectors on medium supplemented with dichlobenil or benomyl were usually easy to identify, since the conidiophores were nearly always normal in structure and colour. Quantitative data comparing the effects of dichlobenil with the standard haploidizing chemicals benomyl and pfa are given in Table I.

In regard to the homozygous sensitive diploid ($dicAS // dicAS$), dichlobenil increased the number of sectors when compared with the same diploid colonies growing on CM. There was very little difference between the number of sectors induced by dichlobenil, benomyl and *pfa* (Table I), but those on CM containing benomyl or *pfa* (Table I), but those on CM containing benomyl or *pfa* were quicker to develop than those on CM containing dichlobenil.

In regard to the resistant diploids (homozygous, $dicAr // dicAr$, and heterozygous, $dicAr // dicAS$), dichlobenil was much more effective than either of the other chemicals in causing somatic instability. On CM supplemented with dichlobenil, there were more sectors and the sectors appeared more rapidly (Table I). Compared with *pfa*, dichlobenil induced approximately 2 or 3 times the number of haploid sectors (Figure 1).

The presence of the resistance gene $dicAr$, in heterozygous or homozygous condition, had little effect on the frequency of sectoring or haploidization on CM containing benomyl or *pfa*. However, it did influence the number of sectors and the rate at which they arose from the colonies on CM containing dichlobenil. For example, the $dicAS // dicAS$ diploid on dichlobenil-containing medium produced 7 sectors after 4 days (Table I) whereas the $dicAS // dicAr$ and $dicAr // dicAr$ colonies produced 83 and 82 sectors, respectively, after the same period of growth (Table I). The $dicAr$ allele also influenced the rate at which sectors emerged from colonies on CM. Comparing the number of sectors after 4 days, there was only 1 from the $dicAS // dicAS$ diploids, but 11 and 12, respectively, from the $dicAS // dicAr$ and $dicAr // dicAr$ diploids (Table I).

Table I : Effect of dichlobenil, benomyl and *pfa* on sectoring and haploidization of a diploid strains of *A. nidulans* homozygous sensitive ($dicAS // dicAS$), heterozygous resistant ($dicAr // dicAS$) and homozygous resistant ($dicAr // dicAr$) for the fungicide-resistance gene $dicA$.

Diploid	Media	Total Number of sectors after		Number of sectors per colony after 8 days	Number of haploid sectors per colony after 8 days
		4 days	8 days		
$dicAS // dicAS$	CM	1	29	0,96	0,4
	CM + Dichlo	7	74	2,5	1,9
	CM + Benomyl	25	77	2,6	1,1
	CM + <i>pfa</i>	40	88	2,9	1,4
$dicAr // dicAS$	CM	11	22	0,73	0,7
	CM + Dichlo	83	131	4,4	2,9
	CM + Benomyl	24	74	2,5	1,0
	CM + <i>pfa</i>	31	66	2,2	0,9
$dicAr // dicAr$	CM	12	23	0,76	0,4
	CM + Dichlo	82	107	3,6	2,5
	CM + Benomyl	20	75	2,5	1,3
	CM + <i>pfa</i>	28	93	3,1	1,6

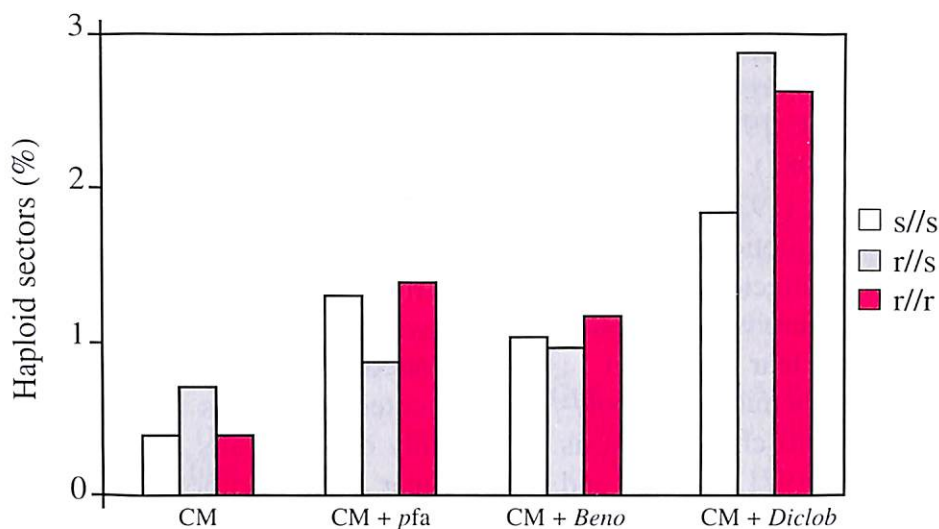


Figure 1 : Effect of dichlobenil, benomyl and pfa on haploidization of three different diploids of *A. nidulans*.

DISCUSSION :

This investigation has shown that dichlobenil causes an increase in the somatic instability of *A. nidulans* diploids, and is as effective as the haploidizing chemicals benomyl and *pfa* generating haploid sectors. Most of the sectors produced by dichlobenil and benomyl were morphologically normal and easy to detect, whereas those produced on *pfa*-supplemented medium were often morphologically abnormal and difficult to distinguish from the rest of the parent colony. On the basis of these tests, dichlobenil should be a good haploidizing agent for use in genetic studies of *A. nidulans* to assign new mutant genes to particular linkage groups.

Several aromatic hydrocarbon fungicides have been found to increase sec-

toring (somatic segregation) of diploid colonies of *A. nidulans* (Georgopoulos et al., 1976). This ability to interfere in some way with mitotic division is one of the criteria used to classify various herbicides and fungicides into the same 'family'. The data on mitotic segregation presented in this work, together with the cross-resistance of dichlobenil resistant mutants to aromatic hydrocarbon fungicides (Chabani and Grindle, 1990), indicate that dichlobenil should be classified with this group of fungicides. Using the same criteria, Georgopoulos et al. (1979) suggested that the dicarboximide fungicides, iprodione, procymidone, and vinclozin should be classified with aromatic hydrocarbons.

The 'induced sectoring test' used here for the recognition of chemicals that interfere with nuclear processes

has been used by many workers (Morpurgo, 1961 ; Georgopoulos et al., 1976 ; Bignami et al., 1977 ; Gualandi and Bellincampi, 1981). Furthermore, Georgopoulos et al., (1976) found that the frequency of mitotic segregation was completely unaffected by chemicals known to interfere with processes unrelated to nuclear division ; examples of such chemicals are polyoxin D, which inhibits chitin synthesis (Keller and Cabib, 1971 ; Misato and Kakiki 1977), tiarimol, which inhibits ergosterol biosynthesis (Ragsdale, 1975; Kato et al., 1975 and cycloheximide, which interferes with protein synthesis (Kerridge, 1958). In sharp contrast, compounds which are known to act within the cell nucleus increase the frequency of somatic segregation; examples of such chemicals are actinomycin D, which intercalates into DNA (Dekker, 1977), griseofulvin, which causes a breakdown of mitotic spindles (Gull and Trinci, 1973), and benomyl, which binds to the microtubules (Davidse, 1973).

Although the way in which aromatic hydrocarbon fungicides interfere with nuclear processes is not understood. Two suggestions have been made in this regard. Azevedo et al (1977) working with chloroneb, suggested that non-disjunction of chromosomes is the mechanism involved. This implies action on the mitotic spindle, Kappas (1978), on the other hand, suggested that diploid recombinants induced by chloroneb and dichloran are produced by a breakage deletion mechanism, indicating that the chromosome itself

is the site of action of these fungicides. Whatever is the mechanism involved, it seems likely from this study that the herbicide dichlobenil interferes with the same nuclear process(es) as aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides.

Several studies on the mode of action of dichlobenil in plants have indicated that this herbicide acts mainly on cell walls (Montezino and Delmer, 1980 ; Galbraith and Shields, 1982). However, Hassal (1982) observed that dichlobenil affects cell division and alters the appearance of nuclei and chromosomes (granular nuclei and blotchy chromosomes). It is conceivable that the primary effect of dichlobenil is to cause damage to the cell wall by preventing cell wall synthesis (Meyer and Herth, 1978 ; Galbraith and Shields, 1982), and that abnormal nuclear division is one of the consequences of abnormal functioning of the damaged cell wall. In view of the information on the action of dichlobenil, and knowledge that fungal mutants show cross-resistance to dichlobenil and dicarboximide fungicides, it is surprising that fungicide biochemists have not linked the action of these fungicides to cell wall synthesis.

In conclusion, we can say that the herbicide dichlobenil causes a substantial increase in mitotic instability (somatic segregation) and haploidization of *A. nidulans* diploids, and thereby resembles haploidizing agents such as *pfa*, benomyl, aromatic hydrocarbons and dicarboximides.

References :

- Azevedo, J. L. & Roper J. A. (1967).** Lethal mutations and ballanced lethal systems in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 49, 149-155.
- Bignami, M., Aulicino F., Carere A., & Morpurgo G. (1977).** Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*. Mut. Res. 46, 395.
- Chabani A. W. (1990).** Ph.D. thesis, University of Sheffiled U.K.
- Chabani A.W. and Grindle M. (1990).** Isolation characteization and genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* resistant to the herbicide dichlobenil. Mycological research 94 (4), 523-528.
- Crackower, S. H. B. (1972).** The effects of griseofulvin on mitosis in *Aspergillus nidulans*. Can. J. Microbiol. 18, 683-387.
- Davidse, L. C. (1973).** Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pesticide Biochemistry and Physiology 3, 317-325.
- Dekker, J. (1977).** In : Antifungal Compounds. pp. 365-398. Edited by M. R. Siegel & Sisler H. D. New York, Mercel Dekker.
- Galbraith, D. W. & Shields B. A. (1982).** The effects of inhibitors on tobacco protoplast development. Physiologia Plantarum 55, 25-30.
- Georgopoulos, S. G., Kappas A. & Hastie A. C. (1976).** Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with heredity processes. Phytopath. 66, 217.
- Georgopoulos, S. G., Sarris M. & Ziogas B. N. (1979).** Mitotic instability in *Aspergillus nidulans* caused by the fungicides iprodione, procymidone and vinclozolin. Pest. Sc. 10, 389-392.
- Gualandi, G. & Bellincampi D. (1981).** Induced gene mutation and mitotic non-disjunction in *A. nidulans*. toxicology Letters 9, 389-394.
- Gull, K & Trinci A. P.J. (1973).** Griseofulvin inhibits fungal mitosis. Nature 244, 292-294.
- Hassal, K.A. (1982).** The chemistry of pesticides, Their metabolism, Mode of action and uses in crop protection. The macmillan Press. Ltd.
- Hastie ,A.C. & Georgopoulos S.G. (1971).** Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. J. Gen Microbiol. 67, 371-373.
- Hock, W. K. & Sisler H. D. (1969).** Specificity and mechanism of antifungal action of chloroneb. Phytopathology 59, 627-632.
- Ingle, M. R. & Hastie A. C. (1974).** Environmental factors affecting the formation of diploids in *Verticillium alboatrum*. Trans. Brit. Mycol. Society 62, 313-321.
- Kappas, A. & Georgopoulos S. G. (1974).** Interference of griseofulvin with the segregation of chromosomes at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology 119, 334-335.
- Kappas, A. (1978).** On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. Mut. Res. 51, 189-197.

- Kappas, A., Georgopoulos S. G. & Hastie A. C. (1974).** On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. Mut. Res. 26, 17-27.
- Kato, T., Tanakas., UEDA M. & Kawase Y. (1975).** Inhibition of sterol biosynthesis in *Moniliana fructigena* by the fungicide, S-1358. Agricultural and Biological Chemistry 39, 169-174.
- Keller, F. A. & Cabib E. (1971).** Chitin and yeast budding, properties of chitin synthetase from *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Biol. Chem. 246, 160-166.
- Kerridge, D. (1958).** The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Gen. Microbiol. 19, 497.
- Koopman, H. & Daams J. (1960).** 2, 6-Dichlorobenzonitrile : a new herbicide. Nature 186, 89-90.
- Leroux, P. & Fritz R. (1984).** In : Mode of Antifungal Agents. pp. 207-237. Edited by A.P.J Trinci & J. F. Ryley. Cambridge.
- Martinez-Rossi, N. M. & Azevedo J. L. (1987).** Detection of point-mutation mutagens in *Aspergillus nidulans* : Comparison of methionine suppressors and arginine resistance induction by fungicides. Mutation Research 176, 29-35.
- Meyer, Y. & Herth W. (1978).** Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis, but not of nuclear division in protoplasts of *Nicotiana tabacum* L. cultivated in vitro. Planta 142, 253-262.
- Misato, T. & Kakiki K. (1977).** In : Antifungal Compounds. pp. 277-300. Edited by M. R. Siegel & Sisler H.D. New York, Mercel Dekker.
- Montezinos, D. & Delmer D. P. (1980).** Characterization of inhibitors of cellulose synthesis in cotton fibers. Planta 143, 305.
- Morpurgo, G. (1961).** Somatic segregation induced by *p*-fluorophenyl-alanine. *Aspergillus* Newsletter 2, 10.
- Oakley, E. & Oakley B. R. (1989).** Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. Nature 338, 662-664.
- Pontecorvo, G. et al; (1958).** Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 8, 198-210.
- Ragsdale, N. N. (1975).** Specific effects of triarimol on sterol biosynthesis in *Ustilago maydis*. Bioch. & Bioph. & Bioph. Acta 380, 81-96.
- Roper, J. A. (1971).** In Chemical Mutagens, vol.2, pp. 343-363. Edited by A. Hollander. New York and London : Plenum Press.
- Tillman, R. W. & Sisler H. D. (1973).** Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*. Phytopathology 63, 219-225.

Caractéristiques du régime alimentaire des insectes xylophages

A. Moumen

Institut National de la Recherche Agronomique d'Algerie - (INRAA)

Résumé : *Ce travail est une synthèse des résultats de travaux personnels réalisés sur Phoracantha semipunctata F. comparés à d'autres travaux réalisés sur la xylophagie des insectes. Il traite des différentes formes d'adaptation à ce type alimentaire résultant d'une longue évolution du couple plante-insecte. Les différentes études menées dans ce cadre montrent, clairement, que le tube digestif de ces insectes représente, tant sur le plan morphologique et anatomo-histologique que biométrique, la plus significative forme d'adaptation à la xylophagie. A l'ensemble de ces adaptations, s'ajoutent des spécificités enzymatiques et un ajustement des pièces buccales en rapport avec la nature chimique et physique d'un aliment sec et faible valeur nutritive qui est le bois.*

Mots-Clés : *Xylophagie, Adaptation, Tube digestif, Cellulases.*

Summary : *This note is a synthesis of the studies realised on the xylophagy of insects. It discusses the different forms of adaptation to this food type resulting from long evolution of the couple plant- insect. The study shows clearly that the digestive tube of these insects represents, as much on the morphological and anatomo- histological plan as on the bio- metrical one, the most significant form of adaptation to xylophagy. To all these adaptation, are added enzymatic specifities and an ajustement of buccal pieces in relation with the chemical and physical nature of a dry food of low nutritive value, which is wood.*

Key words : *Xylophagy, Adaptation, Digestive tube, Cellulases.*

INTRODUCTION :

La xylophagie représente un type alimentaire très complexe et continue de soulever des difficultés pour la détermination précise de tous les composés qui contribuent à la nutrition de ces insectes.

Ces difficultés sont d'autant plus grandes que chaque espèce d'insecte possède un habitat bien défini (EPPO/CABI, 1992) dont les principales particularités rappelées par Linstley (1959), se rapportent :

- à l'essence forestière attaquée.
- à l'état du bois.
- à l'emplacement de l'insecte dans le bois.

L'introduction de cette notion de spécificité vis-à-vis de la plante, traduit plusieurs formes d'adaptation (OEPP/EPPO, 1990) marquées entre autre, par un ajustement des pièces buccales à la nature physique du milieu nutritionnel. Toutefois, les plus importantes formes de cette adaptation se rapportent essentiellement aux :

- Caractéristiques du tube digestif ;
- Spécificités enzymatiques.

Ce travail est une contribution à l'approfondissement de nos connaissances sur les caractéristiques nutritionnelles et digestives des insectes xylophages. Il apporte en outre, quelques informations sur la spécificité de leur régime alimentaire en rapport avec l'importance et la particularité de l'équipement enzymatique entre les différentes espèces d'un même groupe d'une part et les diffé-

rents stades biologiques de la même espèce d'autre part.

MATERIEL ET METHODES :

Le matériel biologique utilisé est issu de nos élevages menés sur un milieu alimentaire semi-artificiel permettant la meilleure croissance et l'obtention des adultes. La mise au point de ce milieu nutritionnel, tant sur le plan de sa composition chimique que dans sa structure physique, a fait l'objet d'une étude menée selon les procédés spécifiques à ces insectes (Walbauer, 1968) et ciblant les aspects quantitatif et qualitatif de la nutrition chez les insectes xylophages.

Pour les études d'histologie, d'histochimie et d'ultra-structure du tube digestif des larves de *P. semipunctata* F., elles ont été réalisées selon les modes opératoires exposés dans les traités de Lison (1960), de Pearse (1960) de Martoja & Martoja, Pierson (1967) et de Gabe (1968).

Quant à l'étude des activités enzymatiques du tube digestif elle a été menée suivant le protocole habituel déjà décrit en détail par Courtois & Chararas (1980). Elle a concerné aussi bien le bol alimentaire des insectes que les déjections récoltées au fur et à mesure à la fin du transit intestinal.

L'extrait enzymatique est constitué, eu égard à la complexité du processus nutritif, de substrats naturels rencontrés chez les végétaux (oligosaccharides et polysaccharides) et de substrats chromogènes, synthétisés artificiellement (hétérosides).

Les activités osidasiques sont évaluées soit par la méthode de Somogyi (1945) et Nelson (1944), modifiée et adaptée par Courtois & Poisson (1980), soit par la méthode calorimétrique du glucose-oxydase (Trinder, 1969 in Courtois & Poisson 1980).

RESULTATS ET DISCUSSION :

Caractéristiques du tube digestif :

Le tube digestif représente, tant sur le plan anatomo-histologique et morphologique que biométrique, la plus significative forme d'adaptation à la xylophagie.

A ce titre, nous notons que le rapport important est pratiquement constant entre la longueur du tube digestif et la taille de ces insectes, met en évidence l'existence d'un long transit intestinal devant permettre une utilisation suffisante du milieu nutritionnel de faible valeur nutritive.

Dans ce cadre, nous rappelons les différentes valeurs des coefficients relevés chez certains insectes, à savoir :

- *Ergates faber* (cerambycidae) : 2,8 ; C. Chararas, 1981.
- Certains *scolytidae* : 2,4 ; C. Chararas, 1983.
- *Raghium inquisitor* (cerambycidae) : 2,3 ; M. RIBA - 1976.
- *Phoracantha semipunctata* (cerambycidae) : 2,2 ; A. Moumen, 1985.

Une étude plus approfondie du tube digestif de la larve de *P. semipunctata* F. par exemple, montre que le mésenteron, partie réellement digestive, représente la portion la plus importan-

te du segment intestinal : 48,5 % et permet ainsi une action optimale des osidases sur les particules du bois.

Le stomodeum quant à lui, ne représente morphologiquement qu'un simple et bref tube chez ces insectes dits «primitifs» : 7% du tube digestif des laves de *P. semipunctata* F.

Par contre, chez la plus part des autres insectes, l'intestin antérieur se différencie en plusieurs régions spécialisées au point de vu fonctionnel :

- Stockage des aliments : rôle du jabot,
- Hydrolyse du bol alimentaire : cas des abeilles,
- Broyage des aliments solides : rôle du gésier.

Par ailleurs, le proctodeum se distingue sur le plan anatomo-histologique par une importante assise musculaire au niveau de l'iléon-colon, suivi d'un rectum caractéristique des insectes xylophages par la présence de six faisceaux de muscles longitudinaux disposés en longs canaux autour de la panse rectale ou viennent s'insérer en alternance, les six tubes de Malpigh réalisant ainsi que le dispositif cryptosolénique.

Ce type de cryptonéphridisme dit «primitif» selon Poll (1936), se retrouve chez la plupart des insectes xylophages permettant ainsi :

- une bonne récupération de l'eau d'un aliment sec et maintenir ainsi, une teneur hydrique suffisante en milieu interne ;
- une élimination de déjections desséchées.

Spécificités enzymatiques :

A l'ensemble de ces adaptations résultant d'une longue évolution du couple biologique plante-insecte, s'ajoutent des spécificités enzymatiques en rapport avec la nature chimique du substrat.

Dans ce cadre et de façon générale, les insectes tirent leurs principales ressources énergétiques à la faveur de l'importante activité des α -Glucosidases (invertases-maltase, etc...) sur des glucides simples que sont le saccharose et le maltose.

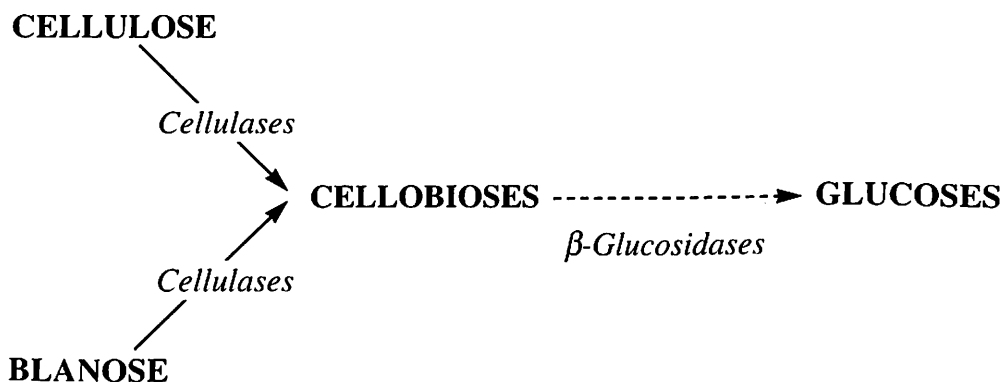
Ces derniers sont rapidement hydrolysés pour permettre à l'insecte de disposer d'une source d'énergie facilement assimilable grâce au glucose et au fructose ainsi formés.

Pour ces oligosaccharides, la poche gastrique constitue la portion dans laquelle s'effectuent les plus importantes hydrolyses enzymatiques, mettant ainsi à la disposition des insectes adultes une fraction importante de

glucides de réserve nécessaire aux vols prolongés.

A cette règle, les insectes xylophages se démarquent grâce à l'importante activité des β -Glucosidases (cellobiases) sur cellobioses et surtout la présence de Cellulase, leurs permettant d'utiliser des composés complexes que sont la cellulose et le blanoose. La compartimentation de ces activités osidasiques sur des glucides complexes que sont les polysaccharides, relevées chez les larves de *P. semipunctata F.* par exemple, renforce l'hypothèse avancée par certains auteurs quant à la nécessité de séparer le mésenteron en plusieurs segments fonctionnels.

C'est ainsi que les principales activités β -Glucosidasiques situées dans la 2ème partie de l'intestin moyen ne peuvent que faciliter de cette façon, une utilisation rationnelle et efficace du cellobiose qui apparaît lors de la transformation préalable de la cellulose par les cellulases selon le processus d'hydrolyse suivant :



Cette spécialisation très marquée de l'intestin moyen, en rapport avec le lieu d'habitat de l'insecte, est étroitement lié à :

- La proportion de la cellulose contenue dans le milieu nutritionnel de l'insecte variable selon les essences de 40 à 62 % du poids sec ;
- L'état physiologique de la plante hôte, qu'on peut classer en trois catégories :
 - Sujet sain et vigoureux
 - Sujet déficient
 - Sujet pourri et décomposé

Il y a lieu de noter à cet effet, que les recherches portant sur l'origine de ces cellulases ont permis de classer les insectes xylophages en trois groupes :

- **Ceux qui s'attaquent au bois vivant** : dans ce cas les cellulases sont secrétées par l'épithélium intestinal ex : *P. semipunctata* F.

- **Ceux s'attaquent au bois sec mais non pourri** : dans ce cas, l'insecte digère la cellulose à l'aide de cellulases propres (ex : *Hulotrupes*) ou à l'aide de leurs symbiotes (ex : les *Termites*).

- **Ceux qui s'attaquent au bois décomposé** : dans ce cas, les micro-organismes symbiotiques participent partiellement à l'attaque de la cellulose (ex : *Cétoines*).

CONCLUSION

Ces différentes formes d'adaptations, caractérisées par des préférences et des besoins bien déterminés,

sont précédées par une phase préliminaire portant sur le choix et l'identification de la plante-hôte. Ainsi les insectes xylophages, au même titre que les autres insectes, marquent souvent des préférences nettes pour une espèce végétale donnée.

Cette relation chimique est codifiée par des substances dites «secondaires» très caractéristiques des différentes espèces botaniques ; leur présence, leur concentration et même leur combinaison interviennent dans la sélection de la plante-hôte, l'appétence, la prise alimentaire ainsi que sa poursuite.

Dans ce cadre, il est à signaler qu'une ablation des palpes maxillaires de *P. semipunctata* F. a contribué à faire accepter à l'insecte des substances secondaires sans valeur alimentaire mais qui exercent sur les insectes normaux un net pouvoir de répulsion.

Références bibliographiques :

Chararas C. 1981. Etude du comportement nutritionnel et de la digestion chez certains Cerambycidae xylophages. Parties I et II. C.N. Rech. Sci., paris, pp. 207-264.

Chararas C. 1983. Régime alimentaire et activités osidasiques des insectes xylophages. Bull.Soc. Zoo. de Fr. 183, n°3 pp. 389-397.

Courtois J.E. & Chararas C. 1965. Les enzymes hydrolysant les glucides (hydrate de carbone) chez les insectes xylophages parasites des arbres forestiers. In Materiel and Organismen. Beitr. 1. pp. 127-150.

- Courtois J.E. & Poisson J. 1980.** Dosage du glucose dans les liquides biologiques. Méthode de Nelson et Somogyi adaptée. Sémin. Hop. Paris, suppl. Patho. et Biol. 8, pp. 792-825.
- EPPO/CABI. 1992.** Scolytidae (non Européen). In : Quarantine pests. CAB. International, Wallingford. Royaume Uni, 107 p.
- GABE M. 1968.** Techniques histologiques. éd. Masson et Cie, Paris VI, 282 p.
- Linsley E. 1959.** Ecology of Cerambycidae. Ann. Rev. Ent., 4, pp. 99-138.
- Lison L. 1960.** Histochimie animale : principes et méthodes. éd. Gauthier - Villard, V, I, 397 p.
- Martoja & Martoja - Pierson. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. éd. Masson & Cie, Paris VI, 178 p.
- Moumen A. 1985.** Contribution à l'étude de la nutrition et des osidases de *Phoracantha semipunctata* F. (Col. Cerambycidae - Xylophage). Thèse de Doct. Ing. Univ. P. et M. Curie, Paris VI, 70 p.
- Nelson N. 1944.** Aphotométrie adaptation of the Somogyi method for the determination of glucide. J. Biol. Chem., 153, pp. 375-380.
- OEPP/EPPO. 1990.** Exigences spécifiques de quarantaine. EPPO. Technical Documents, n°1008, 167 p.
- Pearse A. 1960.** Histochemistry theoretical and applied. Churchill edit. London, 998 p.
- Poll M. 1936.** Corrélations morphologiques entre le tube digestif et les tubes de Malpighi des Coléoptères. Ann. Soc. Ent. Bel., 71, pp. 74-124.
- Riba G. 1976.** Etude du tube digestif et de l'alimentation de quelques Cerambycidae. Thèse Doct. Ing. Univ. P. et M. Curie, Paris VI. 89 p.
- Somogyi M. 1945.** Determination of blood sugar. J. Biol. Chem., 160, pp. 69-73.
- Walbauer G. 1968.** The consumption and utilization of food by insects. Adv. Insect. Physiol., 5, pp. 229-288.