

Étude de la sensibilité de sexués de termites Macrotermitinae à une infestation par des nématodes entomopathogènes des genres *Heterorhabditis* et *Steinernema*

Study of the sensitivity of sexual termites Macrotermitinae to an infestation with entomopathogenic nematodes of genera Heterorhabditis and Steinernema

CORINNE ROULAND ⁽¹⁾, DALILA BEN MOUSSA ⁽¹⁾, GEORGES REVERSAT ⁽²⁾, CHRISTIAN LAUMOND ⁽³⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'écophysiologie des invertébrés, Université Paris-XII, Val-de-Marne, 94010 Créteil Cedex, France.

⁽²⁾ Laboratoire d'écologie des sols tropicaux, ORSTOM, 93143 Bondy Cedex, France.

⁽³⁾ Laboratoire de biologie des invertébrés, INRA, 06606 Antibes Cedex, France.

RÉSUMÉ

Des termites sexués de 2 espèces de termites champignonnistes, *Pseudacanthotermes spiniger* et *Ancistrotermes guineensis*, ravageurs de cultures tropicales, ont été utilisés pour tester l'efficacité de 3 souches de nématodes entomopathogènes des genres *Heterorhabditis* et *steinernema*. Un fort effet léthal a été obtenu sur les 2 espèces quelle que soit la souche de nématodes utilisée, les nématodes du genre *Steinernema* étant cependant les plus actifs. Pour la première fois chez un termite, une production de L3 a été observée. L'intérêt de ces résultats pour la lutte biologique contre les termites ravageurs de culture est discuté. ▲

Mots clés : insectes, *Pseudacanthotermes*, *Ancistrotermes*, lutte biologique, nématodes entomopathogènes.

ABSTRACT

Two species of fungus-growing sexual termites which destroy tropical crops were used to test the efficiency of 3 strains of entomopathogenic nematodes. The alates of the 2 species show a very high sensitivity to the different strains of nematodes tested. In particular the nematodes from the genus *Steinernema* leads to the death of all the individuals within 15 days. On the other hand, for the first time a production of L3 could be observed in a termite. The use of these new results in biological control is discussed. ▲

Key words: insecta, *Pseudacanthotermes*, *Ancistrotermes*, termite control, entomogenous nematodes.

Abridged version (see p. 1000)

En zones tropicales, les termites jouent un rôle très important, par leur abondance et leur diversité, dans la dynamique des sols et le recyclage de la matière organique. Si la majorité des 2 000 espèces recensées dans le monde ne cause pas de dommages aux cultures, 200 espèces environ ont été reconnues comme ravageuses

des cultures vivrières, maraîchères ou industrielles [1-6]. Le caractère hautement socialisé des termites rend leur élimination très délicate. En effet, la colonie est une entité qui vit et meurt. Les différents individus qui la constituent ne sont importants que dans la mesure où ils participent à la vie du groupe social en accomplissant des tâches particulières. Les luttes chimiques ou biologiques (champignons ou nématodes entomopathogènes), dirigées contre les

ment. Ainsi dans le cas d'épandages d'insecticides à action rapide et faible rémanence (seuls produits tolérés par les Nations unies), les ouvriers récoltants seront seuls tués et cette perte sera rapidement comblée au niveau de la colonie. De la même façon, l'utilisation des nématodes entomopathogènes des genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* contre les ouvriers de termites [7-10] a permis de détruire une partie de la population, mais la colonie n'est pas atteinte soit parce que les ouvriers contaminés sont reconus par les individus sains et isolés, soit parce qu'il n'y a pas de multiplication des nématodes dans le corps du termite.

C'est pourquoi nous avons envisagé d'utiliser les nématodes entomopathogènes dans une lutte dirigée contre les termites reproducteurs. En effet, après l'essaimage, les sexués se mettent en couple et creusent un copularium à l'intérieur duquel la femelle pondra ses premiers œufs. Si, au moment de l'essaimage, le sol contient en densité suffisante des larves L3 infestantes de *Steinernema* ou de *Heterorhabditis*, les sexués se contamineront en creusant et mourront. Cette lutte a donc pour but de limiter la fondation de nouvelles colonies de termites.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Deux espèces de termites champignonnistes (Termitidae, Macrotermitinae), ravageuses de cultures tropicales, ont été utilisées pour cette étude: *Pseudacanthotermes spiniger* et *Ancistrotermes guineensis*. Les ailés de *P. spiniger* proviennent des champs de canne à sucre de la Saris (Congo), ceux de *A. guineensis* de la Sonasut (Tchad).

Les infestations ont été effectuées avec 3 souches de nématodes produites sur des larves de *Galleria melonella* par le laboratoire de biologie des invertébrés (INRA, Antibes, France) [9], *Heterorhabditis bacteriophora* souche HP88 (USA), *Steinernema carpocapsae* souche Breton K27 (France) et *Steinernema kushidai* souche Hamakita E2 (Japon).

Infestation des termites

Quatre termites ailés (2 mâles et 2 femelles) sont placés dans des boîtes de Pétri rondes (diamètre: 6 cm) contenant 17 g de terre de Meaux imbibés de 2,4 g d'eau distillée. Quatre types de milieux sont réalisés: témoins (+0,5 ml d'eau distillée); HP88 (+ 0,5 ml d'une solution contenant environ 450 L3); K27 (+ 0,5 ml d'une solution contenant environ 580 L3); E2 (+ 0,5 ml de solution contenant environ 550 L3). Pour chaque catégorie, 10 boîtes sont réalisées, ce qui représente un total de 40 sexués testés pour chaque espèce.

Extraction des larves L3 infestantes

Chaque jour, les termites morts sont récoltés et déposés individuellement dans des tubes à hémolyse dont le fond est remplacé par un disque soudé de toile à tamis en acier inoxydable à maille de 100 µ. Chaque tube est ensuite suspendu dans un tube à essais contenant de l'eau distillée jusqu'à une hauteur de 1 cm en dessous du tamis. Les L3 de nématodes qui quittent le cadavre de l'insecte passent à

travers le tamis et tombent dans l'eau où elles sédimentent. Tous les 2 jours pendant 2 semaines, ces tamis contenant les cadavres sont transférés dans des tubes à essai propres selon le même dispositif, et les L3 contenues dans les culots des tubes précédents sont comptés après décantation et élimination du surnageant.

Résultats

Mortalité (Figs. 1 et 2)

Les ailés de *A. guineensis* élevés dans les boîtes contenant les nématodes entomopathogènes présentent un taux de mortalité largement supérieur à celui des témoins puisqu'à la fin de l'expérience plus de 60% des témoins sont encore vivants alors que tous les traités sont morts. On peut cependant noter des différences entre les 3 souches de nématodes testées. Pour E2, plus de 50% des insectes sont morts en 5 jours alors qu'il faut plus de 8 jours pour obtenir le même résultat pour K27 et HP88.

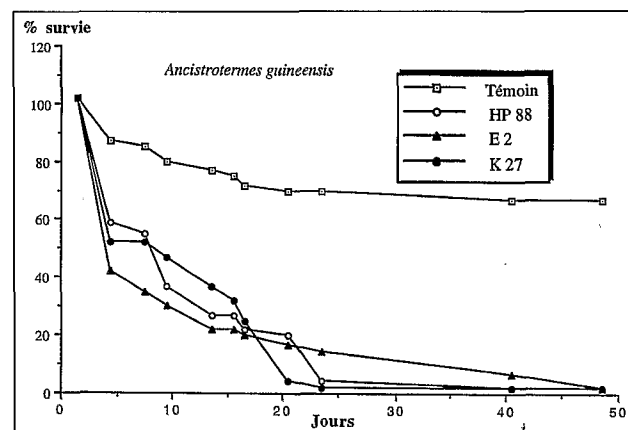


Figure 1. Courbe de survie de sexués de *A. guineensis* témoins ou infestés par une des souches de nématodes: *H. bacteriophora* (HP88), *S. carpocapsae* (K27), *S. kushidai* (E2).

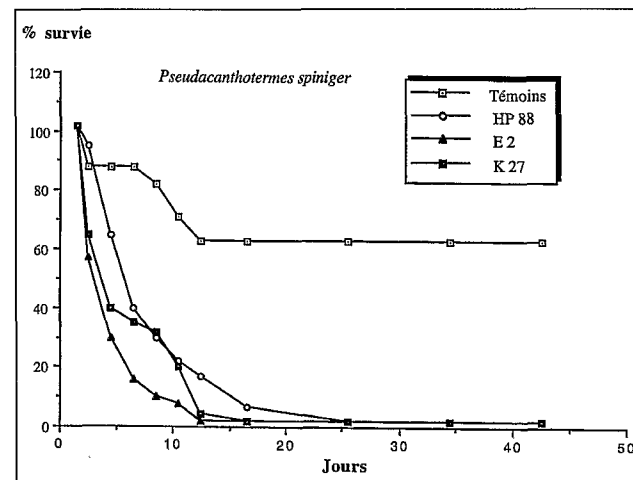


Figure 2. Courbe de survie de sexués de *P. spiniger* témoins ou infestés par une des souches de nématodes: *H. bacteriophora* (HP88), *S. carpocapsae* (K27), *S. kushidai* (E2).

Les ailés de *P. spiniger* présentent une très grande sensibilité aux différentes souches de nématodes testées. En particulier, les souches E2 et K27 entraînent la mort de tous les individus en 12 jours. HP88, bien qu'également efficace, n'induit la mort de tous les sexués qu'après 20 jours.

Production de L3 infestantes

À partir du 10^e jour après l'infestation, une production de L3 a pu être observée chez les ailés des 2 espèces infestés avec E2 ou K27 (Tableaux I et II). Par contre, aucune L3 n'a été produite dans les insectes traités par la souche HP88. Le nombre important de larves produites (de 340 à 2500 selon la souche de nématodes et l'espèce de termites), ainsi que la présence d'adultes de nématodes dans plusieurs cadavres de *A. guineensis* indiquent sans ambiguïté que les nématodes de ces 2 souches peuvent effectuer un cycle biologique complet dans un sexué de termite.

Discussion

L'originalité de cette étude réside, tout d'abord, dans le fait que, pour la première fois, des nématodes entomopathogènes ont été utilisés pour infester des termites reproducteurs. Ces essais se sont, de plus, révélés particulièrement intéressants puisque, quelle que soit l'espèce de termite considérée, un fort effet pathogène des 3 souches de nématodes a pu être mis en évidence. La seule souche du genre *Heterorhabditis* utilisée, *H. bacteriophora*, s'est révélée la moins efficace, ce qui est en accord avec les résultats de Mauldin et Beal [10] qui constatent que les nématodes du genre *Heterorhabditis* sont peu efficaces contre les ouvriers de termites des genres *Coptotermes* et *Nasutitermes*. Comme cela a été montré sur des ouvriers de *Nasutitermes costalis* [9] et de *Reticulitermes sp.* [11], les nématodes du genre *Steinernema* entraînent une forte mortalité des sexués de *P. spiniger* et de *A. guineensis*, *Steinernema kushidai* étant la plus efficace.

Tableau I
Nombre de L3 récoltées en 15 jours sur 5 sexués de *Pseudacanthotermes spiniger*

Nématodes	10 jours	12 jours	15 jours
<i>H. bacteriophora</i>	0	0	0
<i>S. carpocapsae</i>	356 ± 88	442 ± 92	753 ± 49
<i>S. kushidai</i>	0	183 ± 61	340 ± 48

Autre résultat nouveau de ce travail, une production de L3 a été obtenue lors de l'infestation des sexués des 2 espèces de termites par *Steinernema carpocapsae* ou *S. kushidai*. Les *Steinernema* et les *Heterorhabditis* au stade de L3 infestante pénètrent dans leur hôte généralement par la

Tableau II
Nombre de L3 récoltées en 15 jours sur 5 sexués de *Ancistrotermes guineensis*

Nématodes	10 jours	12 jours	15 jours
<i>H. bacteriophora</i>	0	0	0
<i>S. carpocapsae</i>	132 ± 87	197 ± 111	368 ± 42
<i>S. kushidai</i>	647 ± 204	1 015 ± 60	2 504 ± 1 300

cavité buccale. Après avoir transité dans l'intestin, ils passent dans la cavité générale où ils deviennent adultes. De ces adultes de première génération naissent, d'une part, des L3 infestantes qui sortent du cadavre de l'insecte, d'autre part, dans une plus faible proportion, des larves qui donnent une deuxième génération. Le fait d'obtenir des L3 sortant des cadavres montre que ces nématodes sont susceptibles de réaliser un cycle biologique complet à l'intérieur d'un termite, ce qui n'avait, jusqu'à présent, jamais été montré. L'utilisation pour nos infestations d'un termite ailé et non d'un termite ouvrier a permis, sans doute, d'obtenir ce résultat. En effet, les sexués de termites, qui, après l'accouplement, doivent survivre sans s'alimenter jusqu'à la formation du premier ouvrier (soit de 45 à 60 jours selon les espèces), sont particulièrement riches en substances de réserve (lipides, protéines), ce qui n'est pas le cas des ouvriers. La présence de nutriments, en particulier lipidiques, étant indispensable au développement des nématodes [12, 13], seuls les ailés seraient susceptibles de leur apporter une nourriture suffisante pour leur croissance. Dans la durée de notre expérimentation, aucune larve L3 n'a été produite par les ailés infestés par *H. bacteriophora*. Cependant, une coloration rouge, caractéristique du développement de *Xenorabdus spp.*, bactérie associée aux nématodes du genre *Heterorhabditis*, a été observée sur l'ensemble des cadavres. Ce développement bactérien suffit à entraîner la mort des animaux sans multiplication des nématodes [14].

Ces premiers travaux montrent que cette nouvelle technique de lutte contre les termites est particulièrement prometteuse. D'une part, les sexués se sont révélés extrêmement sensibles aux différentes souches de nématodes entomopathogènes testées; d'autre part, ils permettent la multiplication de ces parasites. Ainsi, un seul traitement avec des nématodes, effectué au moment des essaimage, permettrait de limiter sensiblement l'implantation de nouvelles colonies de termites, l'efficacité de ce traitement pouvant se poursuivre au cours des années successives grâce d'une part à la multiplication de ces animaux dans les termites, d'autre part à leur importante capacité de survie dans le sol. Cependant, compte tenu de la faible spécificité des espèces de nématodes entomopathogènes testés, une estimation de l'impact sur l'environnement d'un tel traitement (actuellement en cours) constitue le préalable à toute utilisation *in natura*. ▼

ABRIDGED VERSION

In tropical areas, termites, due to their abundance and their diversity, play a highly significant role in the soil dynamics and recycling of organic matter. While most of the 2,000 species listed in the world do not cause damage to crops, about 200 species have been listed as destroying food or industrial crops. The highly social aspect of termites makes their removal very difficult. The use of entomopathogenic nematodes of *Steinernema* and *Heterorhabditis* against the termite workers allowed part of the population to be destroyed but the whole colony is not affected either because the infected workers are recognized by the healthy individuals and then isolated, or because there is no reproduction of nematodes in the termite body. Therefore, we planned to use entomopathogenic nematodes in order to control the reproductive termites. After swarming, the sexual termites pair and excavate a gallery where the female will lay its first eggs. If, at the stage of swarming, the soil contains a sufficient number of infesting larvae L3 of *Steinernema* or *Heterorhabditis*, the sexual termites will be infected by excavating and they will die. Therefore, this control aims at limiting the creation of new colonies of termites.

Two species of fungus growing termites were used for this study: *Pseudacanthotermes spiniger* come from the sugar cane fields of Saris (Congo) and *Ancistrotermes guineensis* come from Sonasut (Tchad). Infestations were made with 3 strains of nematodes: *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 (USA), *Steinernema carpocapsae* strain Breton K27 (France) and *Steinernema kushidai* strain Hamakita E2 (Japan).

Four alate termites (2 males and 2 females) are placed in round Petri dishes (diameter: 6 cm) containing 17 g of Meaux soil impregnated with 2.4 of distilled water, 4 types of boxes are made: controls (+ 0.5 ml of distilled water); HP88 (+ 0.5 ml of a solution containing about 450 L3); K27 (+ 0.5 ml of a solution containing about 580 L3); E2 (+ 0.5 ml of a solution containing about 550 L3). For each category, 10 dishes are made and therefore 40 sexual termites of each species are used.

Each day, the dead termites are gathered and put individually in haemolysis tubes whose bottom is replaced by a welded cloth disc with a stainless steel 100 mesh sieve. The L3 nematodes which leave the dead insect's body go through the sieve and fall into water where they deposit. Every second day for 2 weeks, these sieves containing the dead bodies are transferred into clean test tubes following the same procedure, and the L3 contained in the bottoms of the previous tubes are counted after decantation and removal of the supernatant.

The alates of *A. guineensis* which were in the dishes containing the entomopathogenic nematodes showed a mortality rate higher than that of controls since at the end of the experiment, more than 60% of the controls were still living, while all those treated were dead. However, some differences between the 3 strains of nematodes tested could be observed. Concerning E2, more than 50% of the animals were dead within 5 days, while more than 8 days were necessary in order to obtain the same result for K27 and HP88.

RÉFÉRENCES

- Harris W.V. 1969. Termites of the Soudan. *Bull. Sudan Nat. Hist. Mus.* 4: 1-29.
- Sands W.A. 1973. Termites as pests of tropical food crops. *Pans* 19 (2): 166-77.

The alates of *P. spiniger* show a very high sensitivity to the different strains of nematodes tested. In particular, the strains E2 and K27 led to the death of all the individuals within 12 days. Although it is also effective, HP88 led to the death of all the sexual termites only after 20 days.

A production of L3 could be observed in the alates of 2 species infested with E2 or K27. On the contrary, no L3 was produced in the insects treated by the strain HP88. The considerable number of larvae produced (from 340 to 2,500 according to the strain of nematodes and the species of termites) as well as the adult nematodes found in several dead bodies of *A. guineensis* showed unambiguously that the nematodes of these 2 strains could make a complete biological cycle in a sexual termite.

This study is original in that for the first time, some entomopathogenic nematodes were used to infest reproductive termites. Moreover, these tests prove to be particularly interesting since, whatever the species of termite considered, a high pathogenic effect of the 3 strains of nematodes tested could be revealed. The only strain of *Heterorhabditis* used, *H. bacteriophora*, proves to be the least effective, which corroborates the results obtained by Mauldin and Beal (1989) who noted that the nematodes of *Heterorhabditis* are not very effective against the termite workers of *Coptotermes* and *Nasutitermes*. As was shown in workers of *Nasutitermes costalis* and *Reticulitermes sp.*, the nematodes of *Steinernema* lead to a high mortality of sexual termites of *P. spiniger* and *A. guineensis*, *Steinernema kushidai* being the most effective.

Another result of this study is that a production of L3 was obtained when the 2 species of termites were infested by *Steinernema carpocapsae* or *S. kushidai*. At the stage of infesting L3 *Steinernema* and *Heterorhabditis* enter their host generally through the buccal cavity. Having gone through the gut, they enter the abdomen and become adult. These first generation adults give on the one hand, some infesting L3 which leave the dead body of the insect and, on the other hand, to a lesser extent, some larvae which give a second generation. Obtaining L3 out of the dead bodies shows that these nematodes are likely to make a complete biological cycle within a termite, which had, up to now, never been shown. Using for our infestations an alate termite and not a worker termite allowed, undoubtedly, this result to be obtained. In fact, the sexual termites which, after pairing, must survive without feeding up to the formation of the first worker (from 45 to 60 days according to the species) are particularly rich in reserve substances (lipids, proteins), which is not the case for workers. Nutrients, particularly lipid ones, are necessary for the development of nematodes; only the alates would be likely to supply them with an adequate food for their growth.

These first studies show that this new method of termite control is particularly promising. On the one hand, the sexual termites prove to be highly sensitive to the different strains of entomopathogenic nematodes tested. On the other, they allow these parasites to multiply. Thus, a single treatment with nematodes, administered at the stage of swarming, would limit considerably the creation of new termite colonies. ▲

- Coaton W.G.H., Sheasby J.L. 1977. National survey of the Isoptera of Southern Africa. 13. The genus *Pseudacanthotermes* Sjöstedt (Termitidae: Macrotermiinae). *Cimbebasia* 3: 183-205.
- Wood T.G., Johnson R.A., Ohiagu C.E. 1980. Étude des dégâts causés par les termites et pertes des récoltes au Nigeria. Un examen des dégâts causés par les termites sur le maïs, l'estimation des dégâts, la chute de la production et l'abondance des termites (*Microtermes*) à Mokwa. *Trop. Pest. Management* 26 (3): 241-53.

5. Deuse J., Appert J. 1982. Les ravageurs des cultures vivrières et maraîchères sous les tropiques. *Techn. Agric. Product. Trop.* Paris : G.P. Maisonneuve, 420 p.
6. Renoux J., Rouland C., Mora P. 1990. Une modification du peuplement en termites par la transformation d'un écosystème naturel en un agrosystème. *REED-STRETIE info* 30 : 2-5.
7. Reese K.M. 1971. Navy fights formosan termite in Hawaii. *Chemical and Engineering News* 49 : 52.
8. Fuji J.K. 1975. *Effects of an entomogenous nematode, Neoaplectana carpocapsae Weiser on the Formosan subterranean termite, Coptotermes formosanus Shiraki, with ecological and biological studies on C. formosanus.* Thèse University of Hawaii, 179 p.
9. Laumond C., Mauleon H., Kermarrec A. 1979. Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoaplectana carpocapsae*. *Entomophaga* 24 : 13-27.
10. Mauldin J.K., Beal R.H. 1989. Entomogenous nematodes for control of subterranean termites, *Reticulitermes* spp. (Isoptera : Rhinotermitidae). *J. Econo. Entomol.* 82 : 1638-42.
11. Georgis R., Poinar G.O., Wilson A.P. 1982. Susceptibility of strawberry root weevil *Otiiorhynchus sulcatus* to neoaplectanid and heterorhabditid nematodes. *IRCS Med. Science* 10 : 442.
12. Woodring J.L., Kaya H.K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes, a hand-book of techniques. *South. Coop. Ser. Bull.* 331 : 30.
13. Bonifassi E., Neves J. 1990. La production de masse des nématodes entomopathogènes : Steinernematidae et Heterorhabditidae. *Rencontres Caraïbes en lutte biologique* 58 : 125-32.
14. Boemare N., Brehelin M. 1990. Taxonomie et propriétés générales des *Xenorhabdus*, bactéries associées aux nématodes entomophages Steinernematidae et Heterorhabditidae. *Rencontres Caraïbes en lutte biologique* 58 : 113-24.