

Cellules oléagineuses idioblastiques : une nouvelle source de produits botaniques actifs dans le contrôle des insectes

C. R. Rodriguez-Saona, J. G. Millar, J. T. Trumble

Des plantes appartenant à de nombreuses familles possèdent des cellules sécrétant des huiles. Baas et Gregory (1985) ont passé en revue la distribution des cellules oléagineuses chez les dicotylédones. Ce type de cellules se distingue dans un même tissu des autres cellules par leurs formes, leurs contenus et leurs structures (Esau, 1967) ; on les appelle « idioblastes » ou cellules idioblastiques. Les idioblastes sont habituellement plus grosses que les cellules environnantes du même tissu, et la paroi d'une cellule oléagineuse mature est constituée de trois couches : une couche cellulosique extérieure, une couche de subérine intermédiaire et une couche cellulosique intérieure (Fahn, 1979).

Les cellules oléagineuses retiennent l'attention des botanistes depuis plus d'un siècle (Baas et Gregory, 1985), principalement à cause de la structure inhabituelle de leur paroi cellulaire. Toutefois, les propriétés chimiques des substances qu'elles renferment sont peu connues et, dans bien des cas, ces substances n'ont même pas été caractérisées. Platt et Thomson (1992) ont avancé que la principale raison de cette absence d'information biochimique sur les idioblastes est que ces cellules ne constituent qu'une faible proportion du volume total du tissu. Ils ont également fait remarquer que toute analyse, qu'elle soit quantitative ou qualitative, exige que les cellules soient isolées en assez grande quantité, de façon à donner des préparations raisonnablement pures. Dans la plupart des cas où les matières lipophiles sécrétées par les cellules oléagineuses ont été caractérisées, seules les grandes classes chimiques ont été déterminées : terpènes, matières grasses et aglycones flavonoïdes (Baas et Gregory, 1985). Nous croyons qu'une identification plus précise des constituants des idioblastes pourrait s'avérer importante pour comprendre le rôle écologique des huiles sécrétées, lesquelles pourraient trouver des applications dans le cadre de programmes de lutte intégrée

si leur activité biologique était significative. Par exemple, Mariani *et al.* (1989) ont trouvé des traces de lactones sesquiterpéniques insecticides dans les cellules oléagineuses de *Liriodendron tulipifera* L. Il s'agit là d'une des premières indications du rôle potentiel de ces cellules dans la défense contre les insectes phytophages.

Les fonctions écologiques ou physiologiques des idioblastes font l'objet d'un débat depuis plus de 50 ans (Platt et Thomson, 1992 ; Lersten et Curtis, 1993). La plupart des recherches précédentes ont porté sur l'activité antifongique potentielle de l'huile. Kobiler *et al.* (1993) ont montré que les cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocatier sont toxiques pour le champignon *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Ils ont avancé que deux composés, le diène (12Z, 15Z)-1-acétoxy-2-hydroxy-4-oxo-henécosa-12,15-diène (persine) et le monoène 1-acétoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadec-16-ène, étaient responsables des effets toxiques. *Colletotrichum gloeosporioides* attaque le fruit en train de mûrir et cause l'antracnose de l'avocat, mais il est quiescent dans le fruit non mûr. La résistance du fruit vert à ce pathogène a été corrélée à la concentration de persine dans le péricarpe du fruit ; les concentrations diminuent durant le mûrissement du fruit, ce qui permet l'activation de l'infection latente et l'expression des symptômes (Prusky et Keen, 1993). Toutefois, les hyphes du champignon semblent incapables de pénétrer les parois épaisses des cellules idioblastiques (Kobiler *et al.*, 1993), ce qui indique que les huiles que ces cellules renferment ont une autre fonction.

Fahn (1988) a émis l'hypothèse que des substances sécrétées par des tissus de plantes peuvent éloigner les phytophages. Il a également suggéré que les idioblastes sont les précurseurs d'autres structures sécrétrices plus complexes telles que les trichomes glandulaires qui sont connus depuis longtemps pour leurs effets sur les insectes phytophages (Levin, 1973). Récemment, Lersten et Curtis (1998) ont avancé que les cellules idioblastiques des plantes pourraient surtout avoir une fonction défensive, notamment à cause de leur nombre dans les jeunes feuilles où les défenses de la plante sont fréquemment à leur maximum. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée expérimentalement.

Dans le présent chapitre, nous traitons des propriétés chimiques et du rôle défensif potentiel des cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocatier *Persea americana* Mill, Lauraceae. Au début, on s'est intéressé à l'avocatier parce que, en dépit du fait que les humains consomment l'avocat depuis longtemps et que son huile soit utilisée dans certains produits cosmétiques, on a signalé des incidents d'intoxication naturelle chez des animaux ayant ingéré des tissus de l'avocatier (McKenzie et Brown, 1991 ; Craigmill *et al.*, 1992 ; Bürger *et al.*, 1994). La toxicité des feuilles et des fruits de l'avocatier pour les animaux a également été démontrée dans des études en laboratoire (Appleman, 1944 ; Werman *et al.*, 1989 ; Oelrichs *et al.*, 1995). Ces études indiquent une cardiotoxicité et une action toxique sur la glande mammaire. Toutefois, peu de composés responsables de ces effets toxiques ont été identifiés. Nous avons choisi les cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocatier parce que ces tissus en renferment une quantité

relativement importante (Cummings et Schroeder, 1942) et qu'il existe une méthode d'extraction rapide pour isoler les cellules oléagineuses des tissus de l'avocatier (Platt et Thompson, 1992).

1. Cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocatier

L'avocatier renferme des idioblastes dans les feuilles, les racines, les pédicelles, les pédoncules et les fruits (Armstrong, 1964). Ces cellules oléagineuses sont présentes dans les fruits mûrs ainsi que dans les très jeunes fruits deux à trois jours après la pollinisation. Ces observations ont été confirmées par Platt-Aloia *et al.* (1983), qui ont découvert des cellules oléagineuses matures dans des avocats de moins de 1 cm. Armstrong (1964) a comparé la morphologie des idioblastes de trois espèces du genre *Persea* : *P. americana*, *P. indica* L et *P. borbonia* (L.) Spreng. Ces espèces, ainsi que des espèces appartenant à d'autres genres de la famille des Lauracées, présentaient beaucoup de similitudes. Platt-Aloia *et al.* (1983) ont signalé que les cellules oléagineuses du mésocarpe de l'avocat avaient une ultrastructure semblable à celle des cellules oléagineuses des feuilles de *Laurus* décrites auparavant par Maron et Fahn (1979).

Les idioblastes de l'avocat sont disséminées parmi les cellules parenchymateuses et distribuées uniformément dans le mésocarpe du fruit ; en volume, elles constituent environ 2 % de la partie comestible du fruit (Cummings et Schroeder, 1942). Une cellule idioblastique mesure en moyenne 80 μm de diamètre et est plus grosse que les cellules parenchymateuses qui l'entourent, lesquelles mesurent environ 60 μm de diamètre (Cummings et Schroeder, 1942). Comme chez d'autres cellules oléagineuses (Fahn, 1979), la paroi des cellules oléagineuses de l'avocat présente une structure complexe constituée d'une couche cellulosique interne, d'une couche de subérine intermédiaire et d'une couche cellulosique externe (Platt-Aloia, 1980), alors que la paroi des cellules parenchymateuses ne présente pas de couches distinctes. En outre, les idioblastes de l'avocat se colorent différemment des cellules parenchymateuses, ce qui indique que leur composition n'est pas la même (Platt et Thomson, 1992). Platt-Aloia *et al.* (1983) ont suggéré que le rôle de la paroi spécialisée qui entoure les idioblastes pourrait être d'isoler les cellules oléagineuses et son contenu des cellules parenchymateuses avoisinantes, prévenant ainsi l'auto-intoxication de la plante par les huiles produites et stockées à l'intérieur des cellules oléagineuses. L'huile dans les cellules oléagineuses matures est localisée dans une grosse vacuole unique (*oil sac*) (Cummings et Schroeder, 1942). Mazliak (1971) a noté que les lipides des cellules parenchymateuses sont principalement des triglycérides, alors que Platt et Thomson (1992) ont signalé que les cellules oléagineuses renferment, entre autres constituants, des alcaloïdes, des hydroperoxydes sesquiterpéniques et probablement d'autres terpènes.

Dans le présent chapitre, nous décrirons l'extraction des cellules oléagineuses des tissus de l'avocat, ainsi que l'isolement et l'identification des composés actifs des cellules oléagineuses de l'avocat, puis nous examinerons les effets de l'huile des idioblastes de l'avocat et de chacun des composés actifs sur un insecte herbivore.

2. *Extraction des cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocat et de l'huile qu'elles renferment*

L'extraction des cellules oléagineuses des tissus de l'avocat se fait en deux étapes : rupture des cellules avoisinantes par digestion enzymatique, puis isolement et purification des cellules oléagineuses intactes.

Deux méthodes ont été utilisées pour rompre les parois cellulaires des cellules parenchymateuses voisines. Elles exigent la digestion des parois cellulaires des cellules voisines des idioblastes tout en gardant ces dernières intactes. On peut soit traiter les tissus d'avocat avec des enzymes exogènes, une méthode utilisée par Platt et Thomson (1992) et Kobilier *et al.* (1993), puis modifiée par Leikin-Frenkerlt et Prusky (1998), ou les laisser s'autodigérer grâce aux enzymes présentes dans le fruit mûr (Platt et Thomson, 1992 ; Rodriguez-Saona et Trumble, 1996). La première méthode a été utilisée pour extraire les cellules à huile de fruits immatures et de fruits pleinement développés, mais non mûrs (Platt et Thomson, 1992) ; elle consiste à traiter les tissus avec un mélange d'enzymes pectolytiques dans un milieu de digestion.

En revanche, dans la deuxième méthode, on utilise des fruits mûrs mous qui ont dépassé la période climatérique (Platt et Thomson, 1992). Durant le mûrissement du fruit, l'activité des enzymes hydrolytiques de la paroi (cellulase et polygalacturonase) augmente de façon importante (Awad et Young, 1979) et brise la paroi des cellules parenchymateuses ; les parois subérisées des idioblastes résistent toutefois à l'activité de ces enzymes et restent intactes (Platt et Thomson, 1992). Ainsi, il suffit de mélanger le mésocarpe de l'avocat mûr avec de l'eau du robinet (Rodriguez-Saona et Trumble, 1996).

Platt et Thomson (1992) ont utilisé les deux techniques pour isoler les cellules oléagineuses des tissus de l'avocat, mais l'efficacité de l'extraction (c'est-à-dire la quantité de cellules extraite par gramme de tissu) et le degré de pureté obtenue par les deux techniques n'ont pas été comparées. Toutefois, on peut prévoir que la première méthode donne une préparation plus pure, mais cette méthode est généralement plus longue et donc plus fastidieuse. En outre, le fait d'ajouter des enzymes exogènes et du milieu de digestion, au lieu de mélanger simplement le fruit mûr avec de l'eau, en augmente le coût. Platt et Thomson (1992) n'indiquent aucune différence qualitative entre les huiles extraites par les deux méthodes.

Après avoir digéré le tissu entourant les cellules oléagineuses par l'une ou l'autre technique, on sépare les idioblastes des débris en les lavant, puis en les filtrant à travers une série de tamis. On lave ensuite les cellules à l'eau du robinet.

jusqu'à ce qu'elles soient couleur paille (brun pâle) (Rodriguez-Saona et Trumble, 1996). On centrifuge le résidu, puis on compte le nombre de cellules dans un hémocytomètre (Kobiler *et al.*, 1993 ; Leikin-Frenkel et Prusky, 1998).

On peut extraire les lipides des cellules oléagineuses isolées avec un mélange de chloroforme et de méthanol (chloroforme/méthanol/cellules : 1/2/1,8) (Platt et Thomson, 1992 ; Rodriguez-Saona et Trumble, 1996). On obtient trois couches de solvant, les deux couches supérieures renfermant les composés les plus polaires et la couche inférieure les lipides dissous dans le chloroforme.

3. Isolement des fractions ayant une activité biologique

Nous avons utilisé la chromatographie rapide sur colonne de gel de silice pour séparer les différents constituants lipidiques de l'huile des idioblastes de l'avocat (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997). Nous avons réuni les fractions recueillies de façon à obtenir 8 fractions (figure 1). Deux fractions (fractions 1 et 3) incorporées à des régimes artificiels administrés à des larves ont produit un taux élevé de mortalité chez les larves (> 50 %) et ont réduit le poids des larves de façon significative (tableau 1). La croissance des larves soumises aux régimes renfermant les fractions 1 et 3 a été inhibée à plus de 92 % comparativement aux larves témoins. En revanche, les régimes renfermant les fractions 4 et 5 se sont traduits par une augmentation significative du poids des larves comparativement au régime témoin (tableau 1).

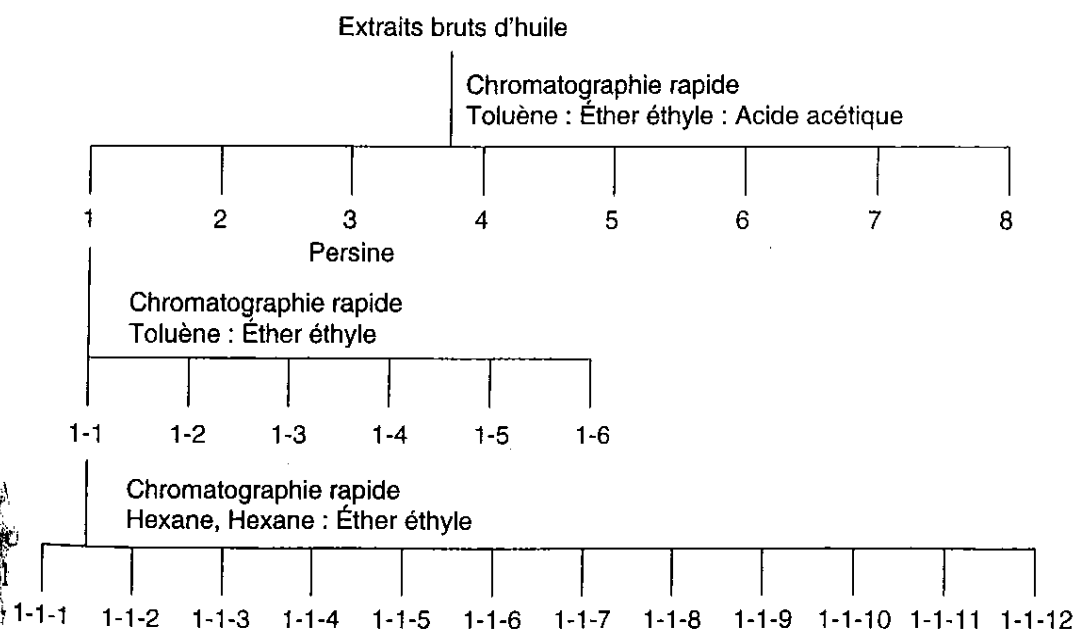


Figure 1 ■ Fractionnement de l'huile brute des cellules idioblastiques d'avocat (d'après Rodriguez Saona *et al.*, 1998)

Tableau 1 ■ Pourcentage de mortalité et poids des larves de *Spodoptera exigua* soumises à un régime témoin ou à un régime renfermant des fractions de l'huile de cellules idioblastiques d'avocat, obtenues par fractionnement de l'huile brute par chromatographie rapide sur colonne [modifié d'après Rodriguez-Saona *et al.* (1997, 1998)]. Les fractions ont été utilisées dans les essais biologiques à des concentrations équivalentes à 20 mg d'huile brute par mL de régime artificiel

Fraction n°	Mortalité ^a (%)	Poids de la larve de 7 jours ^b (mg ± erreur type)
1	50,0	4,4 ± 1,6 c
2	0,0	94,3 ± 6,7 ab
3	54,2	4,7 ± 1,9 c
4	4,2	98,4 ± 7,6 b
5	0,0	107,3 ± 7,5 b
6	4,2	90,4 ± 6,0 ab
7	8,3	79,9 ± 9,4 ab
8	20,8	59,7 ± 5,9 a
Témoin	4,2	64,6 ± 7,4 a
1-1-1	4,2	59,5 ± 5,0 bcd
1-1-2	4,2	68,5 ± 2,1 bcd
1-1-3	8,3	90,5 ± 9,2 de
1-1-4	20,8	43,4 ± 6,7 ab
1-1-5	8,3	51,5 ± 5,0 abc
1-1-6	4,2	62,7 ± 7,4 bcd
1-1-7	0,0	64,4 ± 5,5 bcd
1-1-8	12,5	22,6 ± 4,9 a
1-1-9	0,0	76,5 ± 7,3 cd
1-1-10	0,0	75,9 ± 8,5 cd
1-1-11	0,0	72,6 ± 6,6 bcd
1-1-12	25,0	47,2 ± 4,9 abc
Témoin	0,0	111,2 ± 8,1 e
3-1	0,0	56,3 ± 4,7 b
3-2	4,2	53,4 ± 3,9 ab
3-3	8,3	10,7 ± 1,5 c
3-4	4,2	38,2 ± 4,2 a
3-5	0,0	46,4 ± 3,8 ab
Témoin	4,2	50,7 ± 3,9 ab

a. $n = 24$.

b. Différentes lettres indiquent des différences statistiques entre les traitements (test de Tukey, $P < 0,05$).

La fraction active présentant la polarité la plus faible (fraction 1 ; figure 1) a été purifiée par chromatographie rapide sur colonne (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998). Des sous-fractions ont été réunies pour donner 6 fractions (1-1 à 1-6 ; figure 1). La fraction la moins polaire de cette deuxième chromatographie rapide (fraction 1-1) a entraîné la mortalité de toutes les larves. Un fractionnement plus poussé de la fraction 1-1 a donné douze fractions (figure 1), dont les sous-fractions 1-1-4, 1-1-8 et 1-1-12 renferment la plus grande masse, soit respective-

ment 6 %, 7 % et 68 % et sont également les plus actives dans les bioessais (tableau 1) (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998). Toutes ces sous-fractions réduisent significativement le poids des larves comparativement aux larves témoins dans les essais biologiques d'alimentation, mais le taux de mortalité des larves est inférieur à 30 % (tableau 1).

4. Identification des composés actifs

4.1. Furanes et trioléine de l'avocat

Les principaux constituants des sous-fractions actives 1-1-4, 1-1-8 et 1-1-12 ont été identifiés par association de la spectrométrie de masse (SM) et de la spectrométrie par RMN (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998). La sous-fraction la moins polaire (1-1-4) est constituée de deux composés majeurs et de trois composés mineurs. Les deux composés majeurs sont le 2-(pentadécyl)furane (figure 2 : 1), lequel avait déjà été provisoirement identifié par spectrophotométrie de masse (Weyers-tahl *et al.*, 1993), et le 2-(1-*E*-pentadécényl)furane (2, figure 2). Les trois composés mineurs sont le 2-(1*Z*-pentadécényl)furane (2, figure 2), le 2-(heptadécényl)furane (4, figure 2) et le 2-(1*E*-heptadécényl)furane (5, figure 2) (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998).

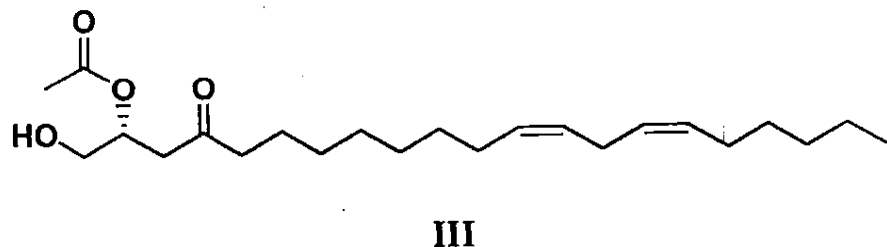
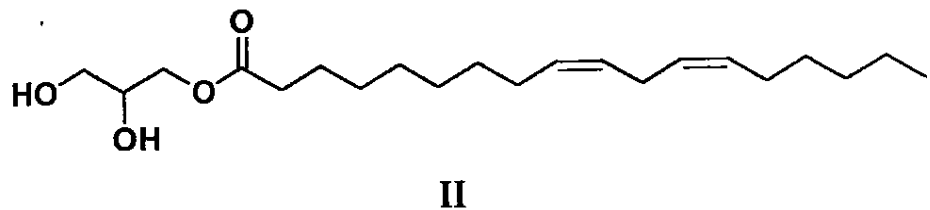
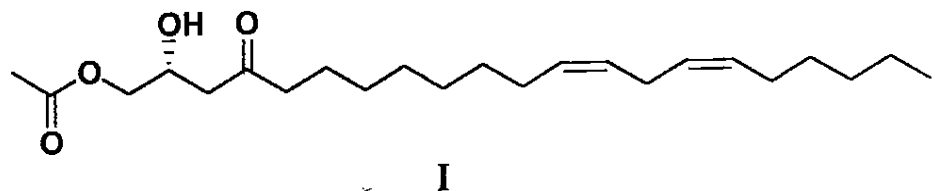


Figure 2 ■ Structure des composés identifiés dans les sous-fractions actives 1-1-4, 1-1-8 et 1-1-12, obtenues après trois fractionnements par chromatographie rapide sur colonne de l'huile brute des cellules idioblastiques d'avocat (d'après Rodriguez-Saona *et al.*, 1998)

La deuxième sous-fraction active (1-1-8) est constituée d'un composé majeur et d'un composé mineur (ratio ~5:1). Le composé majeur est le 2-(8Z, 11Z-heptadécadiényl)furane [6, figure 2 ; Murakoshi *et al.*, (1976)], et le composé mineur a été provisoirement identifié comme étant le 2-(1E, 8Z, 11Z-heptadécatriényl)furane (figure 2 : 7) (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998).

Le groupe d'alkylfuranés présents dans les sous-fractions 1-1-4 et 1-1-8 appartient à une classe de furanes identifiés uniquement chez des plantes du genre *Persea*, à une exception près, retrouvée chez la plante aquatique *Elodea canadensis* Michaux (Previtera *et al.*, 1985). Trois autres furanes, non encore identifiés appartenant à cette classe (3, 5 et 7 : figure 2), constituent des composés mineurs dans ces sous-fractions.

Kashman *et al.* (1969 a, b) ont été les premiers à signaler cette nouvelle classe de composés phytochimiques après avoir isolé le 2-(tridéca-12-ynyl)furane et le 2-(tridéca-12-ényl)furane à partir de fruits et de graines de *P. americana*. Magalhães Alves *et al.* (1970) ont par la suite identifié plusieurs autres 2-alkylfuranés à chaînes latérales mono- et di-insaturées en C₁₃ à partir d'extraits au méthanol de graines d'avocat (*Persea gratissima* Gärtner, (syn. *P. americana*)) provenant du Brésil. Plusieurs autres furanes de l'avocatier ont été identifiés par la suite (Néeman *et al.*, 1970 ; Murakoshi *et al.*, 1976 ; Weyerstahl *et al.*, 1993 ; Fraga et Terro, 1996).

L'activité biologique des furanes de l'avocat a été peu étudiée jusqu'à maintenant (Rodriguez-Saona et Trumble, 2000a). Neeman *et al.* (1970) ont déterminé l'activité d'un groupe de huit nouveaux composés aliphatiques à longue chaîne de l'avocat et de certains analogues contre 13 espèces de bactéries et une espèce de levure ; ils ont signalé que le 2-(tridéca-12-ényl)furane inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn et de *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Murakoshi *et al.* (1976) ont mesuré l'activité du 2-(8Z, 11Z-heptadécadiényl)furane (figure 2 ; 6) produit par déshydratation de la persine de feuilles d'avocatier par catalyse acide (*cf.* la section 5.2) contre la larve du ver à soie, *Bombyx mori* L. et n'ont trouvé aucune activité à des concentrations dans le régime pouvant atteindre 300 µg·g⁻¹. En outre, Rosenblat *et al.* (1995a,b) ont déterminé que la fraction lipidique contenant des furanes extraites de l'huile de graine d'avocatier est le facteur actif intervenant dans l'inhibition de la lysyl-oxydase dans des études chez des rats. Ils ont affirmé que ces furanes pourraient être utiles comme agents antifibrotiques dans le traitement des maladies causées par un dépôt excessif de collagène.

Récemment, Rodriguez-Saona *et al.* (1999a) ont montré que la longueur de la chaîne latérale semble avoir un effet sur la toxicité des alkylfuranés. Le 2-(tétradécyl)furane de synthèse, renfermant une chaîne latérale plus courte à nombre pair de carbones, est moins toxique que les 2-(pentadécyl)furane et 2-(heptadécyl)furane naturels. Rodriguez-Saona *et al.* (1999a) ont émis l'hypothèse que les tissus de l'avocatier pourraient produire ces furanes (à chaîne latérale à nombre impair de carbones) qui assurent une protection optimale contre les herbivores. Les voies biosynthétiques pourraient également imposer des limites au nombre et

au type de structures produites. Par exemple, Magalhaes et Alves (1970) ont indiqué que les furanes de l'avocatier sont produits à partir d'acides gras à longue chaîne et que, par ailleurs, l'avocatier produit presque exclusivement des acides gras à 16 et 18 carbones (Mazliak, 1971 ; Biale et Young, 1971). En outre, la présence du noyau aromatique du furane semble plus importante que la longueur de la chaîne latérale en ce qui concerne la toxicité des 2-alkylfuranes pour les insectes, étant donné que les 2-alkyltétrahydrofuranes analogues sont significativement moins toxiques pour les larves d'insecte que les furanes de l'avocat correspondant (Rodriguez-Saona *et al.*, 2000).

La troisième sous-fraction (1-1-12) renferme de la trioléine (8, figure 2). La trioléine est un constituant général du mésocarpe de l'avocat et constitue 15,8 % des triglycérides totaux de ce tissu douze jours après la floraison (Gaydou *et al.*, 1987). À notre connaissance, ni la trioléine ni aucun autre triglycéride n'ont été signalés comme ayant des effets néfastes chez les insectes. Nous avons observé que la trioléine a un effet insecticide à des concentrations relativement élevées ($> 7\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans le régime (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998) ; des résultats préliminaires indiquent un effet synergique potentiel entre la trioléine et les furanes de l'avocat (Rodriguez-Saona, résultats non publiés).

4.2. Persine

La deuxième fraction active la plus importante (fraction 3 ; figure 1 ; tableau 1) est constituée principalement d'un seul composé (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997). La fraction a été séparée par HPLC et une sous-fraction (3-3 ; tableau 1) présente une activité élevée. Le composé actif de cette sous-fraction est la persine (12Z, 15Z-1-acétoxy-2-hydroxy-4-oxo-hénécosa-12,15-diène) (I, figure 3), qui a été isolée précédemment des feuilles (Chang *et al.*, 1975) et du fruit (Prusky *et al.*, 1982) de l'avocatier.

La persine présente apparemment une activité biologique à large spectre. D'abord isolée des feuilles de l'avocatier, elle inhibe la croissance des larves du ver à soie *B. mori* (Chang *et al.*, 1975 ; Murakoshi *et al.*, 1976). Toutefois, la persine est mieux connue pour son activité antifongique (Prusky *et al.*, 1982 ; Kobiler *et al.*, 1993 ; Prusky et Keen, 1993 ; Leikin-Frenkel et Prusky, 1998). Prusky *et al.* (1982) ont isolé la persine de l'écorce d'avocat vert et ont observé qu'elle inhibe *in vitro* la croissance végétative de *C. gloeosporioides*, un pathogène fongique de l'avocatier. Plus récemment, Kobiler *et al.* (1993) ont signalé la présence de persine dans des cellules oléagineuses spécialisées du mésocarpe de l'avocat et ont suggéré que la localisation de la persine à l'intérieur des cellules oléagineuses du mésocarpe ne lui permet pas d'offrir une résistance à l'attaque du champignon. En revanche, la persine n'est pas confinée aux idioblastes dans l'écorce (péricarpe) et peut inhiber l'envahissement des hyphes du champignon et conférer une résistance à la maladie.

La persine a également une activité biologique notable chez les mammifères. Seawright *et al.* (1995) ont signalé l'utilisation expérimentale de la persine dans

le traitement du cancer chez les mammifères, et constaté que la persine inhibe ou empêche la lactation. En particulier, la persine a une structure très apparentée à celle de la monolinoléine (II, figure 3), même en ce qui concerne la position et la stéréochimie des deux doubles liaisons de la chaîne. Seawright *et al.* (1995) ont émis l'hypothèse que l'action physiologique de la persine chez les mammifères pourrait être due à une interférence, peut-être irréversible, de la biosynthèse des glycérides. Oelrichs *et al.* (1995) ont signalé que la persine cause la nécrose de l'épithélium de la glande mammaire et du myocarde chez la souris.

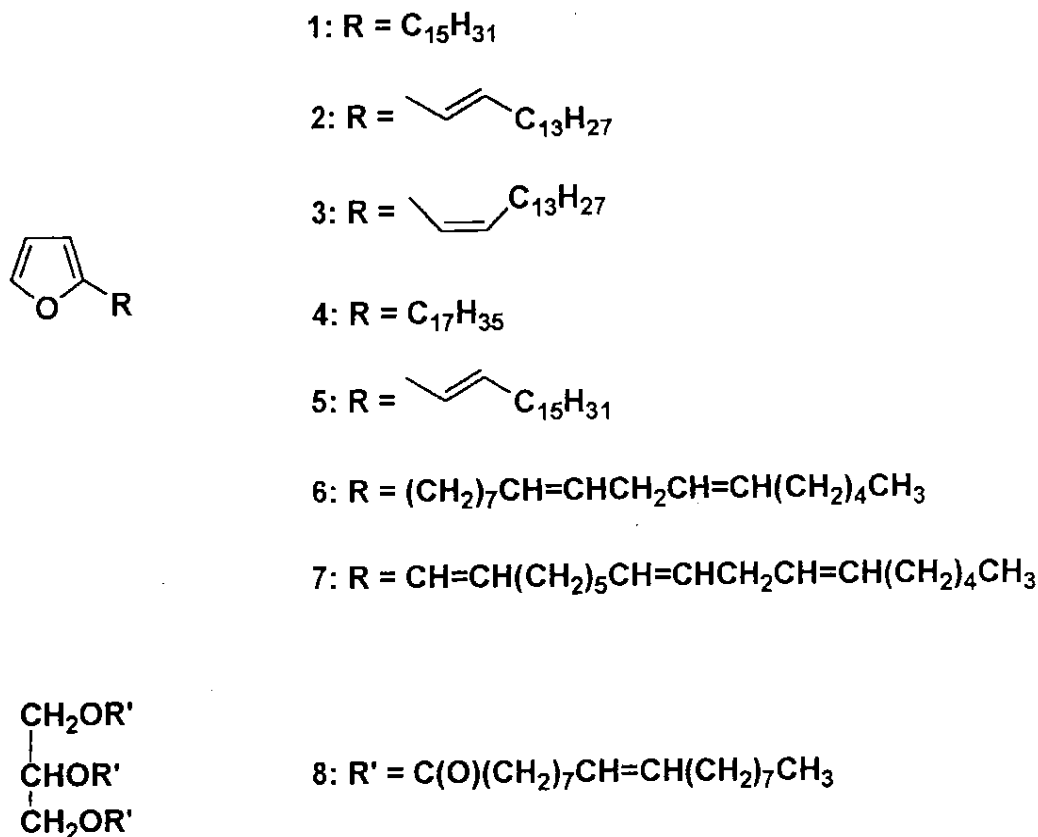


Figure 3 ■ Structure du (12Z, 15Z)-1-acétoxy-2-hydroxy-4-oxo-henéicos-12-15-diène (persine, I), d'un composé présent dans la fraction 3 active obtenu par fractionnement de l'huile brute des cellules idioblastiques d'avocat par chromatographie rapide sur colonne et HPLC ; de la monolinoléine (II) ; et de l'isopersine (III) présente dans la fraction 4 (modifié d'après Rodriguez-Saona *et al.*, 1997, 1999)

Un nouveau composé, nommé isopersine (figure 3 ; III) à cause de sa structure similaire à celle de la persine, a été identifié dans la fraction 4 de l'huile brute (Rodriguez-Saona *et al.*, 1999b). Au début, cette fraction semblait accroître le poids des larves comparativement aux témoins (tableau 1), mais des expériences ultérieures n'ont pas permis de reproduire ces résultats initiaux (Rodriguez-Saona *et al.*, 1999b). L'isopersine, comme la persine, est un analogue structural de la monolinoléine, mais elle ne semble pas avoir les mêmes effets inhibiteurs. L'étude de l'activité biologique de cette substance est difficile, car l'isopersine s'isomérisse rapidement en persine. En outre, les deux composés sont labiles en

milieu acide et se transforment rapidement en alkylfuranes (cf. la section précédente) en présence de traces d'acide. En fait, il a fallu obtenir les spectres RMN de l'isopersine dans un solvant neutre (deutérobenzène), car les traces de DCl dans le CDCl_3 provoquent la transformation de l'isopersine en 2-alkylfurane correspondant en moins de quelques minutes (Rodriguez-Saona *et al.*, 1999b).

5. Essais biologiques en laboratoire

5.1. Essais biologiques à l'aide d'huile extraite des idioblastes

Nous avons déterminé l'effet de l'huile extraite des cellules idioblastiques d'avocat mûr sur la mortalité des larves de *Spodoptera exigua* (Hübner) dans le cadre d'un bioessai alimentaire. Cette espèce est un bon modèle pour évaluer des métabolites végétaux secondaires pouvant être utilisés pour la lutte antiparasitaire. *Spodoptera exigua* a été largement utilisé pour vérifier des caractères de résistance végétale (Diawara *et al.*, 1993 ; Eigenbrode et Trumble, 1994) et pour cribler des insecticides (Moar et Trumble, 1987 ; Brewer *et al.*, 1990). De plus, il s'agit d'une noctuelle polyphage, ravageur de cultures agricoles de première importance (Metcalf *et al.*, 1962 ; Alvaro-Rodriguez, 1987) qui a acquis une résistance à de nombreux insecticides classiques (Brewer et Trumble, 1989). L'insecte se nourrit de plus d'une cinquantaine de plantes hôtes appartenant à plus de dix familles (Wilson, 1932 ; Smits *et al.*, 1987) disposant de moyens chimiques de défense variables. Toutefois, on n'a jamais signalé que l'avocatier faisait partie de l'alimentation de cet insecte.

L'huile des cellules idioblastiques s'est révélée toxique pour les petites et grosses larves de *S. exigua* (Rodriguez-Saona et Trumble, 1996). La CL_{50} pour les premiers stades larvaires est de 1 600 μg d'huile par g de régime. La CL_{50} pour les stades larvaires plus âgés est de 5 100 μg d'huile par g de régime. La croissance des larves est également affectée. Après 5 jours de régime, le poids des larves de troisième stade ayant reçu 3 000 μg d'huile par g de régime est beaucoup plus faible que celui des larves soumises au régime témoin. La durée du développement à partir du premier stade larvaire jusqu'à l'émergence adulte n'est pas significativement différente chez les insectes survivants ayant reçu 500, 1 000 ou 2 000 μg d'huile par g de régime comparativement aux insectes témoins (Rodriguez-Saona et Trumble, 1996).

Dans des essais biologiques où l'insecte peut choisir le régime, l'huile des idioblastes d'avocat à des concentrations sublétales éloigne les larves (Rodriguez-Saona et Trumble, 1996). La position des larves a été observée entre un régime renfermant l'huile et un régime témoin. Les résultats indiquent que les larves de *S. exigua* refusent les régimes renfermant l'huile de cellules idioblastiques d'avocat, même à la plus faible concentration utilisée (500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). En outre, les larves consomment une quantité significativement plus élevée de régime témoin que de régime traité, et ce à toutes les concentrations (Rodriguez-

Saona et Trumble, 1996). *Spodoptera exigua* détecte et évite les régimes renfermant de l'huile des idioblastes d'avocat, ce qui indique que l'huile dans un régime peut dissuader les herbivores généralistes non adaptés de le consommer.

Contrairement à *S. exigua*, un insecte généraliste non adapté, deux herbivores généralistes adaptés à la consommation d'avocat, *Sabulodes aegrotata* (Guenée) et *Pseudoplusia includens* (Walker), sont moins affectés par l'huile extraite des idioblastes (Rodriguez-Saona et Trumble, 2000b). Ainsi il nous apparaît qu'une adaptation après ingestion est probablement le mécanisme qui permet à ces espèces de consommer des régimes renfermant de l'huile provenant des idioblastes d'avocat, étant donné l'absence d'effet de l'huile sur le gain de poids (Rodriguez-Saona et Trumble, 2000b). Les résultats indiquent que les cellules oléagineuses peuvent jouer un rôle défensif chez la plante et protéger cette dernière contre les phytophages généralistes non adaptés.

5.2. Bioessais visant à déterminer l'activité des composés actifs

Nous avons déterminé les effets des furanes de l'avocat sur la mortalité et l'inhibition de la croissance des larves de *S. exigua*. Bien que les furanes de l'avocat que nous avons testés aient une structure similaire, nos études montrent que leur toxicité et leur degré d'inhibition de la croissance des larves varient. Nos résultats (cf. Rodriguez-Saona *et al.*, 1998) ont montré que l'un des deux principaux composés identifiés dans la sous-fraction 1-1-4, le 2-(1E-pentadécényl)furane (2 ; figure 2) avait peu d'effet sur la survie et la croissance de *S. exigua* comparativement à l'analogue saturé, le 2-(pentadécyl)furane (1 ; figure 2). De même, le furane insaturé présent dans la sous-fraction 1-1-8, le 2-(8Z, 11Z-heptadécadiényl)furane (6 ; figure 2) était beaucoup moins toxique que le 2-(heptadécyl)furane (4 ; figure 2). Par conséquent, nous avons concentré notre attention sur les deux composés saturés.

Nous avons réalisé des essais biologiques pour déterminer la CL_{50} du 2-(pentadécyl)furane et du 2-(heptadécyl)furane pour les premiers et derniers stades larvaires de *S. exigua* (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999). Puis, nous avons déterminé l'effet de ces deux composés sur le développement et la croissance des larves. Le 2-(pentadécyl)furane et le 2-(heptadécyl)furane présentaient la même toxicité pour les premiers et derniers stades larvaires de *S. exigua* (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999). Dans des bioessais utilisant des larves néonates, la CL_{50} du 2-(pentadécyl)furane est de $2,2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime artificiel. La CL_{50} du 2-(heptadécyl)furane était de $1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime. Dans des bioessais utilisant des larves du troisième stade, la CL_{50} du 2-(pentadécyl)furane est de $3,0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime et celle du 2-(heptadécyl)furane est de $3,4 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime.

La croissance des larves des derniers stades est significativement réduite, même lorsque les furanes d'avocat sont présents à des concentrations sublétales dans les régimes artificiels (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999). La croissance des larves de *S. exigua* soumises à des régimes renfermant des furanes d'avocat

est réduite de plus de 70 % comparativement aux larves témoins, même à des concentrations qui ne tuent que 0-20 % des larves ($2,0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$). Une mortalité élevée (> 75 %) et une inhibition significative (> 90 %) de la croissance des larves ont été obtenues à des concentrations de $4,0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ et plus.

Plus la concentration de 2-(pentadécyl)furane ou de 2-(heptadécyl)furane augmente dans le régime, plus le poids des pupes est significativement réduit (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999). Comparativement aux insectes témoins, le 2-(pentadécyl)furane et le 2-(heptadécyl)furane réduisent significativement le poids des pupes à des concentrations de $3,0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime et plus. En outre, la durée du développement de la larve néonate à la pupa est significativement prolongée à mesure que la concentration de 2-(pentadécyl)furane ou de 2-(heptadécyl)furane augmente dans le régime.

Chaque composé actif de l'huile d'avocat à des concentrations sublétales dans le régime dissuade également *S. exigua* néonate de s'alimenter. Le 2-(pentadécyl)furane et le 2-(heptadécyl)furane à la plus faible concentration utilisée (CL_{10}) dans le régime dissuade les larves de s'alimenter. Une augmentation de la concentration de ces composés dans le régime se traduit par un degré plus élevé d'évitement chez les larves (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999).

De même, une proportion significativement plus élevée de larves des derniers stades préfèrent le régime témoin aux régimes renfermant l'un ou l'autre furane à des concentrations avoisinant la CL_{25} et plus (Rodriguez-Saona et Trumble, 1999). En outre, les larves consomment davantage le régime témoin que le régime renfermant du 2-(pentadécyl)furane ou du 2-(heptadécyl)furane à toutes les concentrations.

Nous avons également déterminé les effets de la persine sur la croissance et la mortalité des larves de *S. exigua* (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997). Dans des bioessais où l'insecte n'avait pas le choix du régime, la persine inhibe la croissance des larves de *S. exigua*, avec une CE_{50} (concentration requise pour inhiber la croissance de 50 % des individus par rapport aux témoins) de $185,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. À des concentrations supérieures à $500 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, la croissance de la larve est inhibée de plus de 80 % comparativement aux témoins, et la mortalité est élevée (> 40 %). La CL_{50} de la persine est de $936 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997).

Dans les essais où les insectes ont le choix du régime, toutes les observations ont montré que davantage de larves consommaient le régime témoin plutôt que le régime renfermant de la persine à des concentrations de 400 ou de $600 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997). À des concentrations de $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de régime ou moins, sept observations sur huit n'ont montré aucune préférence significative pour le régime témoin ou le régime renfermant de la persine. La persine inhibe la croissance de la larve de *S. exigua* à des concentrations de $200 \mu\text{g}$ et plus de persine par g de régime, mais ses effets dissuasifs dans le régime ne se font sentir qu'à des concentrations d'au moins $400 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Une seule autre étude a révélé que la persine a des effets nocifs chez des insectes. À une concentration de $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, la persine inhibe la croissance du qua-

trième stade larvaire de *B. mori* d'environ 40 % en 6 jours (Murakoshi *et al.*, 1976). Nous avons observé une activité similaire à $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chez les premiers stades larvaires de *S. exigua* dont la croissance est inhibée d'environ 50 % en 7 jours (Rodriguez-Saona *et al.*, 1997). Nous avons prévu des différences entre ces deux espèces parce que *B. mori* est un insecte spécialiste qui depuis longtemps se nourrit exclusivement de mûrier et qui a été protégé contre la plupart des substances chimiques naturelles et synthétiques. En revanche, *S. exigua* est un herbivore généraliste qui est constamment exposé à une variété de métabolites secondaires végétaux et qui est fréquemment la cible d'applications de pesticides (Brewer *et al.*, 1990). Il semblerait que les enzymes métaboliques qui procurent aux larves de *S. exigua* une résistance notable aux pesticides ou à des métabolites secondaires végétaux comme les furanocoumarines à structure linéaire (Brewer *et al.*, 1995) soient inefficaces contre la persine ou les furanes d'avocat.

S. exigua et *B. mori* se sont montrés aussi sensibles l'un que l'autre à la persine, mais les deux insectes sont affectés par des concentrations beaucoup plus faibles que celles qu'on retrouve dans le péricarpe et le mésocarpe de l'avocat. Kobiler *et al.* (1993) ont signalé des concentrations dans le péricarpe d'avocat à différents âges (depuis 75 jours après la nouaison jusqu'à la pleine maturité, près de 170 jours plus tard) variant de 760 à $2\,280 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de poids du fruit. Les concentrations dans le mésocarpe varient de $1\,500$ à $5\,800 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. *Spodoptera exigua* n'est pas signalé comme un insecte nuisible de l'avocatier (McKenzie, 1935), ce qui pourrait s'expliquer, du moins en partie, par la présence de persine dans la plupart des tissus de la plante.

6. Conclusions et implications pour la lutte intégrée

Les métabolites secondaires des végétaux attirent l'attention des entomologistes depuis plusieurs années à cause de leur importance dans les processus écologiques et de leur coévolution avec les phytophages. En effet, les composés d'origine végétale sont utilisés pour lutter contre les insectes depuis des milliers d'années parce qu'ils sont accessibles et efficaces. Les insecticides naturels sont en vogue actuellement. On croit, à tort ou à raison, qu'ils sont moins toxiques pour les humains que la plupart des insecticides synthétiques parce qu'ils sont présents dans la nature. Cette croyance est discutable, mais elle a permis de renouveler l'intérêt pour l'utilisation en agriculture de composés végétaux possédant de nouvelles propriétés chimiques. Les recherches présentées dans le présent chapitre portent sur l'isolement et l'identification de plusieurs composés chimiques végétaux, leur importance éventuelle dans la préférence alimentaire d'insectes immatures et leur rôle écologique potentiel dans la défense contre des herbivores non adaptés. Nos travaux exposent les premières données expérimentales indiquant que les cellules à huile ont un rôle défensif contre les herbivores généralistes. Le fait que les cellules oléagineuses de l'avocat soient situées dans des tissus internes indique que ces cellules sont efficaces avant tout contre les

insectes broyeurs ; toutefois, aucune étude n'a porté sur l'effet des cellules oléagineuses sur les insectes qui s'alimentent différemment, comme les insectes suceurs par exemple.

Quelques groupes seulement de composés contenant un cycle furane ont fait l'objet d'une étude de leur activité insecticide. Il s'agit, parmi les plus connus, des triterpénoïdes du margousier (neem) tirés d'*Azadirachta indica* A. Juss, des limonoïdes des agrumes, des furanocoumarines et des benzofuranes. Les furanes de l'avocat identifiés dans le cadre de nos études, ou des composés analogues apparentés, pourraient être utilisés pour lutter contre les insectes, et ils sont d'ailleurs faciles à synthétiser (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998). Toutefois, beaucoup de travail reste à faire pour déterminer si ces composés peuvent être utilisés comme composés de départ pour l'obtention d'une nouvelle catégorie d'insecticides. En particulier, on dispose de peu de données sur leur toxicité pour les espèces non visées (notamment les mammifères), sur leur stabilité chimique, leur photostabilité et leur phytotoxicité. Le fait qu'il s'agit de composés à la structure simple, qui peuvent être synthétisés en une seule étape à partir de précurseurs facilement accessibles, pourrait inciter les chercheurs à effectuer des études plus poussées.

D'autres substances chimiques qui se retrouvent dans l'huile des cellules idioblastiques, comme la persine, pourraient être difficiles à développer à cause de leur structure plus complexe et, notamment leur stabilité limitée, mais il pourrait être possible de synthétiser des analogues plus stables (Carman et Duffield, 1995 ; Carman et Karoli, 1998). Ainsi, Carman et Handlay (1999) ont identifié un analogue saturé (tétrahydropersine) dans les feuilles de l'avocatier. Ce composé, dont la concentration représente environ 2 % de celle de la persine, est probablement plus stable parce qu'il ne possède pas le groupement 1,4-diène de la persine qui s'oxyde facilement (Carman R., communication personnelle). En outre, bien que deux méthodes de synthèse de la persine aient été signalées (Bull et Carman, 1994 ; McLeod et Schäffeler, 1995), ni l'une ni l'autre ne permettent réellement une production économique et à grande échelle qu'exige un produit agrochimique.

En conclusion, il faudra encore accumuler beaucoup d'informations sur la dose à utiliser, la toxicité envers les mammifères, la photostabilité et la phytotoxicité des constituants des cellules oléagineuses idioblastiques de l'avocat avant que leur commercialisation puisse être envisagée. Toutefois, pour conclure sur une note optimiste, il faut souligner que l'avocat n'a jamais été considéré comme dangereux pour la santé. Les humains consomment l'avocat sous forme de fruit frais ou transformé depuis des siècles, et l'huile d'avocat est largement utilisée dans les cosmétiques (anonyme, 1980). Cette absence apparente de toxicité pourrait être due à la nature des idioblastes : ces cellules ont une paroi cellulaire très dure. Elle pourrait ne pas être digérée par l'organisme humain, de telle sorte que les cellules restent intactes après avoir traversé le tube digestif.

Quoi qu'il en soit, d'autres recherches sont actuellement nécessaires pour mieux cerner le potentiel de ces composés dans le contrôle des insectes.

Références bibliographiques

- Alvarado-Rodriguez B (1987). Parasites and disease associated with larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae), infesting processing tomatoes in Sinaloa, Mexico. *Florida Entomol.*, **70** : 444-449.
- Anonymous (1980). Final report of the safety assessment for avocado oil. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **4** : 93-103.
- Appleman D (1944). Preliminary report on toxicity of avocado leaves. *Yearbook California Avocado Soc.*, 1944 : 37.
- Armstrong WWJ (1964). *Distribution of oil cells in Persea*. Masters Thesis, University of California, Riverside.
- Awad M, Young RE (1979). Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectin-methylesterase in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.*, **64** : 306-308.
- Baas P, Gregory M (1985). A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. *Israel J. Botany*, **34** : 167-186.
- Biale JB, Young RR (1971). The avocado pear. In : Hulmer AC. *The Biochemistry of Fruits and their Products*. Academic Press, London, 1-63.
- Brewer MJ, Meade T, Trumble JT (1995). Development of insecticide-resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) exposed to furanocoumarins found in celery. *Environ. Entomol.*, **24** : 392-401.
- Brewer MJ, Trumble JT (1989). Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **82** : 1520-1526.
- Brewer MJ, Trumble JT, Alvarado-Rodriguez B, Chaney WE (1990). Beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed habitats and relationship to laboratory selection for resistance. *J. Econ. Entomol.*, **83** : 2136-2146.
- Bull SD, Carman RM (1994). Synthesis of the avocado antifungal, (Z, Z)-2-hydroxy-4-oxohenicosa-12,15-dien-1-yl acetate. *Aust. J. Chem.*, **47** : 1661-1672.
- Burger WP, Naude TW, van Rensburg IBJ, Botha CJ, Pienaar ACE (1994). Avocado (*Persea americana*) poisoning in ostriches. In : Colegate, SM, Dorling PR. *Plant-associated Toxins : Agricultural, Phytochemical, and Ecological Aspects*. CAB International, UK, 546-551.
- Carman RM, Duffield AR (1995). The isolation of (R)-2-hydroxy-4-oxohenicosa-1-yl acetate from avocado leaves. *Tetrahedron Lett.*, **36** : 2119-2120.
- Carman RM, Handley PN (1999). Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. *Phytochemistry*, **50** : 1329-1331.
- Carman RM, Karoli T (1998). A further synthesis of an analogue of the antifungal/antiherbivore lipid from avocado. *Aust. J. Chem.*, **51** : 955-959.
- Chang CF, Isogai A, Kamikado T, Murakoshi S, Sakurai A, Tamura S (1975). Isolation and structure elucidation of growth inhibitors for silkworm larvae from avocado leaves. *Agr. Biol. Chem.*, **39** : 1167-1168.
- Craigmill AL, Seawright AA, Mattila T, Frost AJ (1992). The toxicity of avocado (*Persea americana*) leaves for the lactating mammary gland of the goat. In : James LF, Keeler RF, Bailey EM, Cheeke PR, Hegarty MP. *Poisonous Plants*. Iowa State University Press, USA, 623-625.
- Cummings K, Schroeder CA (1942). Anatomy of the avocado fruit. *Yearbook California Avocado Soc.*, 1942 : 56-64.
- Diawara MM, Trumble JT, White KK, Carson WG, Martinez LA (1993). Toxicity of linear furanocoumarins to *Spodoptera exigua* : Evidence for antagonistic interactions. *J. Chem. Ecol.*, **19** : 2473-2484.
- Eigenbrode SD, Trumble JT (1994). Fruit-based tolerance to damage by beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) in tomato. *Environ. Entomol.*, **23** : 937-942.
- Esau K (1967). *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons, New York.
- Fahn A (1979). *Tissues Secreting Lipophilic Substances*. Academic Press, London.
- Fahn A (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, **108** : 229-258.

- Fraga B, Terrero D (1996). Alkene- γ -lactones and avocodofurans from *Persea indica* : a revision of the structure of majorenolide and related lactones. *Phytochemistry*, **41** : 229-232.
- Gaydou EM, Lozano Y, Ratovohery J (1987). Triglyceride and fatty acid compositions in the mesocarp of *Persea americana* during fruit development. *Phytochemistry*, **26** : 1595-1597.
- Kashman Y, Néeman I, Lifshitz A (1969a). New compounds from avocado pear. *Tetrahedron*, **25** : 4617-4631.
- Kashman Y, Néeman I, Lifshitz A (1969b). Six new C₁₇-olefinic and acetylenic oxygenated compounds from avocado pear. *Israel J. Chem.*, **7** : 173-176.
- Kobiler I, Prusky D, Midland S, Sims JJ, Keen NT (1993). Compartmentation of antifungal compounds in oil cells of avocado fruit mesocarp and its effect on susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Molecul. Plant Pathol.*, **43** : 319-328.
- Leikin-Frenkel A, Prusky D (1998). Ethylene enhances the antifungal lipid content in idioblast from avocado mesocarp. *Phytochemistry*, **49** : 2291-2298.
- Lersten NR, Curtis JD (1993). Subepidermal idioblasts in leaflets of *Caesalpinia pulcherrima* and *Parkinsonia aculeata* (Leguminosae : Caesalpinioideae). *Bull. Torrey Botanical Club.*, **120** : 319-326.
- Lersten NR, Curtis JD (1998). Foliar idioblasts in *Physostegia virginiana* (Lamiaceae). *J. Torrey Botanical Soc.*, **125** : 133-137.
- Levin DA (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Rev. Biology*, **48** : 3-15.
- McLeod JK, Schäffeler L (1995). A short enantioselective synthesis of a biologically active compound from *Persea americana*. *J. Nat. Prod.*, **58** : 1270-1273.
- Magalhaes Alves H, Coxon DT, Falshaw CP, Godtfredsen WO, Ollis WD (1970). The avocatin - a new class of natural products. *Anais Academia Brasil. Cienc.*, **42** (supplement) : 45-48.
- Mariani P, Cappelletti EM, Campoccia D, Baldan B (1989). Oil cell ultrastructure and development in *Liriodendron tulipifera* L. *Botanical Gazette*, **150** : 391-396.
- Maron R, Fahn A (1979). Ultrastructure and development of oil cells in *Laurus nobilis* L. leaves. *Botanical J. Linnean Soc.*, **78** : 31-40.
- Mazliak P (1971). Lipids. In : Hulmer AC. *The Biochemistry of Fruits and their Products*. Academic Press, London, 209-239.
- McKenzie HL (1935). *Biology and control of avocado insects and mites*. University of California, Berkeley, Bull. 592.
- McKenzie RA, Brown OP (1991). Avocado (*Persea americana*) poisoning of horses. *Australian Veterinary J.*, **68** : 77-78.
- Metcalf CL, Flint WP, Metcalf RL (1962). *Destructive and Useful Insects. Their Habits and Control*. McGraw-Hill, New York.
- Moar WJ, Trumble JT (1987). Toxicity, joint action, and mean time of mortality of Dipel 2X, avermectin B₁, neem, thuringiensin against beet armyworms (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **80** : 588-592.
- Murakoshi S, Isogai A, Chang CF, Kamikado T, Sakurai A, Tamura S (1976). Effects of two components from the avocado leaves (*Persea americana* Mill) and the related compounds on the growth of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, **20** : 87-91.
- Néeman I, Lifshitz A, Kashman Y (1970). New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Applied Microbiol.*, **19** : 470-473.
- Oelrichs PB, Ng JC, Seawright AA, Ward A, Schäffeler L, McLeod JK (1995). Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *Natural Toxins*, **3** : 344-349.
- Platt KA, Thomson WW (1992). Idioblast oil cells of avocado : Distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *International J. Plant Sciences*, **153** : 301-310.
- Platt-Aloia KA (1980). *Ultrastructure of mature and ripening avocado (Persea americana Mill.) fruit mesocarp ; scanning, transmission and freeze fracture electron microscopy*. Ph.D. Dissertation : University of California, Riverside.
- Platt-Aloia KA, Oross JW, Thomson WW (1983). Ultrastructural study of the development of oil cells in the mesocarp of avocado fruit. *Botanical Gazette*, **144** : 49-55.

- Previtera L, Merola D, Monaco P (1985). Acetogenins from aquatic plant *Elodea canadensis*. *Phytochemistry*, **24** : 1838-1840.
- Prusky D, Keen NT (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease*, **77** : 114-119.
- Prusky D, Keen NT, Sims JJ, Midland SL (1982). Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology*, **72** : 1578-1582.
- Rodriguez-Saona C, Maynard DF, Phillips S, Trumble JT (1999a). Alkylfurans : Effects of alkyl side-chain length on insecticidal activity. *J. Nat. Prod.*, **62** : 191-193.
- Rodriguez-Saona C, Maynard DF, Phillips S, Trumble JT (2000). Avocadofurans and their tetrahydrofuran analogues : Comparison of growth inhibitory and insecticidal activity. *J. Agric. Food Chem.*, **48** : 3642-3645.
- Rodriguez-Saona C, Millar JG, Maynard DF, Trumble JT (1998). Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. *J. Chem. Ecol.*, **24** : 867-889.
- Rodriguez-Saona C, Millar JG, Trumble JT (1997). Growth inhibitory, insecticidal, and feeding deterrent effects of (12Z, 15Z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene, a compound from avocado fruit, to *Spodoptera exigua*. *J. Chem. Ecol.*, **23** : 1819-1831.
- Rodriguez-Saona C, Millar JG, Trumble JT (1999b). Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. *J. Nat. Prod.*, **61** : 1168-1170.
- Rodriguez-Saona C, Trumble JT (1996). Toxicity, growth, and behavioral effects of an oil extracted from idioblast cells of the avocado fruit on the generalist herbivore beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **89** : 1571-1576.
- Rodriguez-Saona C, Trumble JT (1999). Effect of avocadofurans on larval survival, growth, and food preference of the generalist herbivore, *Spodoptera exigua*. *Entomol. Exp. Applic.*, **90** : 131-140.
- Rodriguez-Saona C, Trumble JT (2000a). Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Current Organic Chem.*, **4** : 1249-1260.
- Rodriguez-Saona C, Trumble JT (2000b). Secretory avocado idioblast oil cells : Evidence of their defensive role against a non-adapted insect herbivore. *Entomol. Exp. Applic.*, **94** : 183-194.
- Rosenblat G, Kagan HM, Shah MA, Spiteller G, Néeman I (1995a). Chemical characterization of lysyl oxidase inhibitor from avocado seed oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **72** : 225-229.
- Rosenblat G, Werman MJ, Yudicky E, Ben-Itzhak O, Néeman I (1995b). Hepatic collagen solubility in growing rats following oral administration of a lysyl oxidase inhibitor from avocado seed oil. *Med. Sci. Res.*, **23** : 813-814.
- Seawright AA, Oelrichs PB, Ng JC, McLeod J, Ward A, Schaffeler L, Carman RM (1995). *Method of treatment of cancer as well as method of inhibition of lactation in mammals*, Patent Coop. Treaty Int. Appl. No. WO 95/22969, Australian National University : Australia.
- Smits PH, van Velden MC, van de Vrie M, Vlak JM (1987). Feeding and dispersion of *Spodoptera exigua* larvae and its relevance for control with a nuclear polyhedrosis virus. *Entomol. Exp. Applic.*, **43** : 67-72.
- Werman MJ, Mokady S, Néeman I, Auslaender L, Zeidler A (1989). The effect of avocado oils on some liver characteristics in growing rats. *Food and Chemical Toxicol.*, **27** : 279-282.
- Weyerstahl P, Marshall H, Scora RW (1993). Constituents of the leaf essential oil of *Persea indica* (L.) K. Spreng. *Flavour Fragrance J.*, **8** : 201-207.
- Wilson JW (1932). Notes on the biology of *Laphygma exigua* Huebner. *Florida Entomol.*, **16** : 33-39.