

DOSAGE, MIGRATION ET DISTRIBUTION D'UN FONGICIDE SYSTÉMIQUE (BENOMYL) DANS LES FEUILLES DE BANANIER

par M. BARON

Travail réalisé au Laboratoire de Phytopathologie de l'IFAC
à la Faculté des Sciences d'Orsay

DOSAGE, MIGRATION ET DISTRIBUTION D'UN FONGICIDE SYSTÉMIQUE (BENOMYL) DANS LES FEUILLES DE BANANIER

M. BARON

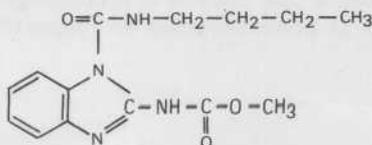
Fruits, oct. 1971, vol. 26, n° 10, p. 643-650.

RESUME - Dans ce travail présenté par l'auteur pour une soutenance de D.E.A. à la Faculté des Sciences d'Orsay, plusieurs faits intéressants peuvent être retenus : tout d'abord une méthode de dosage du benomyl par voie biologique déjà connue mais adaptée au bananier, ensuite la vérification de l'absorption du benomyl par le système racinaire et sa distribution dans la plante. Enfin et ceci est le plus important l'absorption par les feuilles, la descente dans le bulbe et la présence du fongicide dans les nouvelles feuilles émises plus de deux mois après le traitement d'un mélange huile-benomyl. Toutes ces données expérimentales présentent un très grand intérêt pour la lutte contre la cercosporiose du bananier.

La technique de lutte contre la cercosporiose du bananier à l'aide d'atomisations huileuses, mise au point par l'IFAC aux Antilles a fait partout ses preuves. En revanche toutes les tentatives d'amélioration d'efficacité des traitements par adjonction de fongicides divers se sont soldées par des échecs. La recherche d'un fongicide permettant d'augmenter l'efficacité des traitements huileux est donc déterminante et c'est pourquoi, parmi les récentes acquisitions de la chimie organique de synthèse, le benomyl semble particulièrement intéressant.

Les travaux de l'IFAC au Cameroun (Ph. MELIN) et aux Antilles ayant montré que le mélange huile-benlate offrait de nouvelles possibilités quant à la fréquence et à l'efficacité des traitements il nous a semblé intéressant d'essayer d'étudier le dosage, la migration et la distribution de ce nouveau fongicide dans des feuilles de bananiers.

Le benomyl est l'ester méthylique de l'acide 1-butylcarbonyl-2 benzimidazole carbamique, il a été synthétisé aux Etats-Unis dans les laboratoires de recherche de la Société E. I. DU PONT DE NEMOURS. C'est un composé de poids moléculaire 290,3 dont la formule développée est la suivante :



Le bananier utilisé est le cultivar Poyo-Robusta provenant de Côte d'Ivoire. Les plantes ont été cultivées en serre (25°-30°C) avec éclairage d'appoint durant les jours courts de 6 h à 9 h et de 17 h à 21 h.

Deux types de traitements ont été expérimentés :

- incorporation de fongicide dans le sol ;
- atomisation de mélanges huile-benlate sur le feuillage.

CLEMONS et SISLER ayant montré que le benomyl était rapidement décomposé en méthyl 2 benzimidazole carbamate (MBC) cela aussi bien en solution aqueuse que dans les plantes, ce que nous doserons aux cours de toutes nos expériences sera par conséquent ce composé mais pour une meilleure commodité d'expression nous garderons le terme benomyl tout au long de notre exposé.

Pour étudier le transport et la distribution du benomyl dans les feuilles du bananier la méthode simple et classique qui consiste à découper des morceaux de feuilles à l'emporte-pièce et à les déposer après stérilisation sur une culture de champignon sensible s'est avérée insuffisante. La raison de cet échec nous est apparue après la mise au point d'une technique d'extraction chimique du fongicide. L'expérience suivante a été déterminante : une feuille de bananier a été mise à tremper dans une solution aqueuse de benomyl (50 ppm). Au bout de 8 jours des fragments de feuille ont été découpés et déposés sur une culture de *Penicillium expansum* le reste de la feuille étant soumis à une extraction chimique, les résultats ont été les suivants :

- rondelles de feuilles : aucune zone d'inhibition de développement du champignon autour des différents fragments de feuille
- extraction chimique : l'extraction chimique a donné comme masse de fongicide recueillie ramenée à 1 gramme de matière végétale fraîche 0,7 µg de benomyl par gramme de feuille

Sachant que chaque rondelle de feuille pèse en moyenne 20 mg, chacune de celles-ci possède donc $14 \cdot 10^{-3}$ µg de benomyl, quantité trop infime pour se révéler efficace vis-à-vis d'une culture de champignon.

TECHNIQUE DE L'EXTRACTION CHIMIQUE

Les échantillons de feuille à analyser sont découpés en petits fragments puis broyés au mixer en présence d'acétate d'éthyle. Le volume de solvant importe peu à ce stade de la manipulation, il faut simplement que tous les fragments végétaux soient au contact de l'acétate. Ce broyat est laissé une nuit en présence du solvant. Dans toutes nos expériences le poids des échantillons de feuille variait entre 10 et 15 grammes pour un volume d'acétate voisin de 50 ml. Le lendemain le broyat est filtré sur coton, le filtrat est récupéré puis concentré par distillation sous pression réduite. Le vide partiel réalisé au moyen d'une trompe à eau permet d'obtenir une ébullition du solvant à des températures relativement basses (20-30°C) températures facilement obtenues dans un bain-marie d'eau et qui ne peuvent provoquer ni la volatilisation ni la dégradation du fongicide. La distillation est arrêtée lorsque le filtrat est réduit à 2 ou 3 ml. Le concentré est recueilli et sert alors à un test biologique.

Dans ce concentré, sont mises à tremper des rondelles de papier filtre, qui sont ensuite séchées puis déposées sur une culture de champignon. Ces cultures sont obtenues en incorporant au milieu gélosé maintenu en surfusion à 38°C des spores de *Penicillium expansum*. Ce milieu est ensuite coulé en boîte de Pétri. Après refroidissement, les rondelles de papier filtre sont déposées à raison de quatre par boîte. On a soin d'humidifier ces rondelles en déposant une goutte d'eau stérile sur chacune de celles-ci. 24 heures après, un anneau d'inhibition de germination peut être décelé et mesuré. Se référant à une courbe d'étalonnage on peut facilement déduire du diamètre d'inhibition de germination la concentration en fongicide puis sa masse connaissant le volume du concentré.

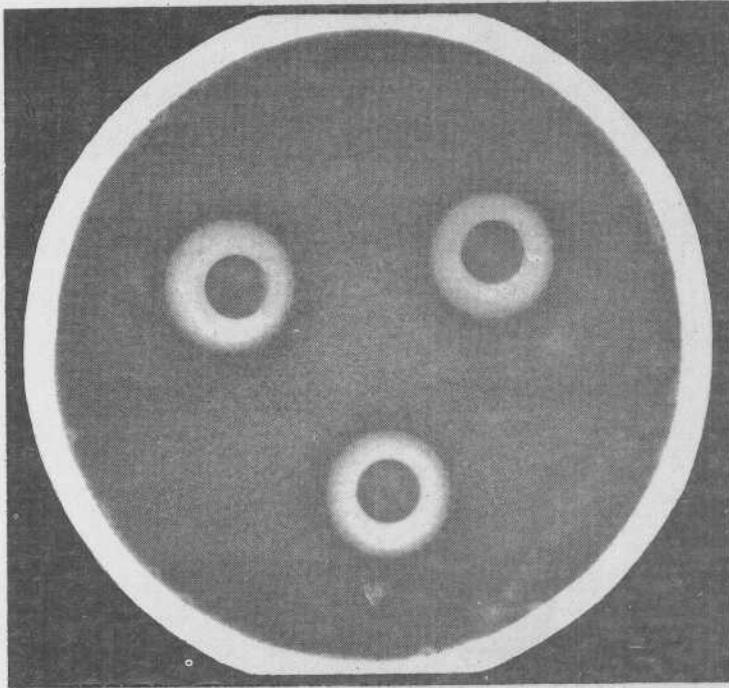
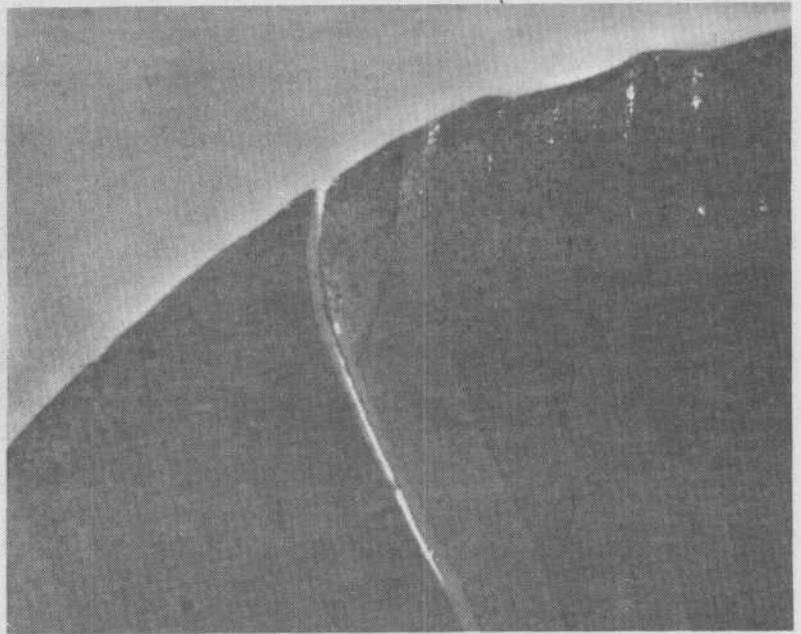


Photo 1 - La présence de benlate dans la pastille amène la formation d'un halo où le champignon ne se développe pas.

Photo 2 - L'accumulation du benlate provoque sur le bord du limbe l'apparition de poqctuations noirâtres.



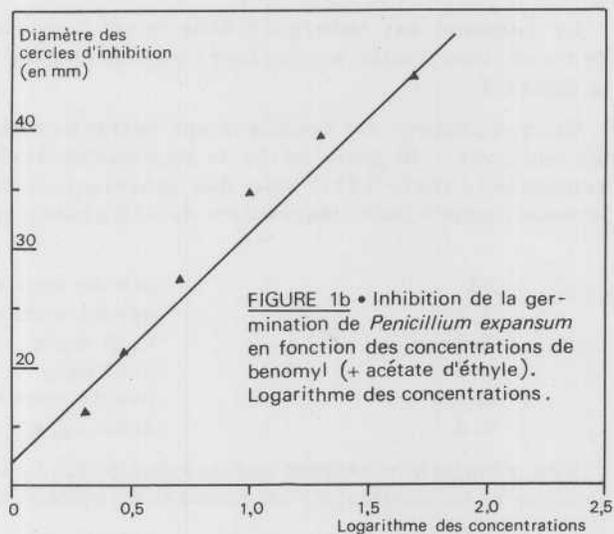
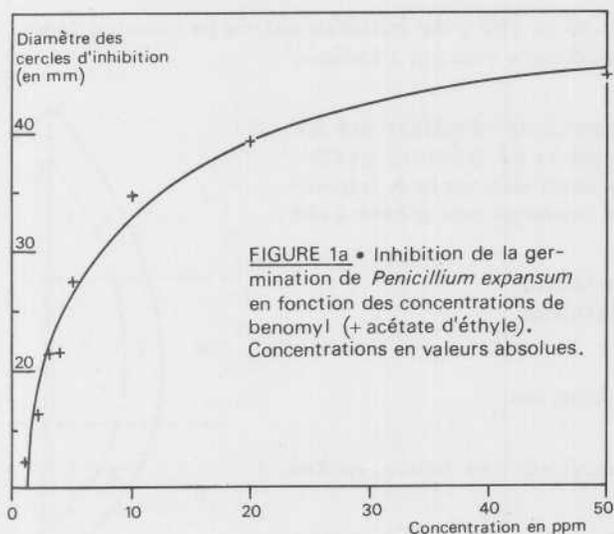
ÉTABLISSEMENT DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

Une gamme étalon de concentration en matière active connue est obtenue par dilution du fongicide dans de l'acétate d'éthyle. Des filtres de cellulose de 8 mm de diamètre sont immergés dans ces différentes dilutions. Après séchage, les rondelles sont déposées sur une culture de *Penicillium expansum*. Le fongicide diffuse dans la gélose et inhibe à une distance plus ou moins grande, la croissance et la sporulation du champignon. Les diamètres des anneaux d'inhibition de germination sont mesurés en retournant les boîtes de Pétri.

Tableau I - Diamètre moyen des cercles d'inhibition de la germination de *P. expansum* en fonction de la concentration en fongicide

Concentration du fongicide (ppm)	1	2	3	4	5	10	20	50
Diamètre des cercles d'inhibition (mm) y compris les 8 mm de la rondelle	12,2	16,2	21,5	21,5	27,4	34,8	39,5	44,7

Représentation graphique des résultats. Si l'on étudie le diamètre des anneaux d'inhibition de germination en fonction des doses de fongicides, la courbe représentative prend la forme visible à la figure 1a. Cette courbe est logarithmique : en portant en abscisse non plus les concentrations mais le logarithme des concentrations on obtient une droite (figure 1b) dont l'équation peut facilement être calculée (MATHER, 1965).



EXEMPLE D'UNE EXPÉRIENCE

- poids du fragment de feuille à analyser : 8,8 grammes.
- volume du concentré : 2 ml.
- diamètre des anneaux d'inhibition de germination (12 rondelles de papier filtre ont été immergées dans le concentré). Les résultats obtenus sont les suivants : 18, 15, 13, 15, 16, 12, 16, 15, 16, 12, 16, 11, et la moyenne de 14,5 mm.

La courbe d'étalonnage nous permet de déduire de ce diamètre la concentration en fongicide dans le concentré : soit 1,2 ppm.

Connaissant le volume du concentré (2 ml) et en utilisant la formule :

$$x \mu\text{g de fongicide} = y \text{ g de solvant} \times z \text{ ppm}$$

on peut connaître la masse de fongicide contenue dans ce concentré et par conséquent dans le fragment de feuille

$$x \mu\text{g} = 2 \times 1,2 = 2,4 \mu\text{g de benlate}$$

Le fragment de feuille pesait 8,8 grammes, la masse de fongicide par gramme de matière fraîche est donc :

$$\frac{2,4}{8,8} = 0,27 \mu\text{g/g}$$

Le chloroforme, autre solvant du benomyl, a donné de moins bons résultats. Deux fragments symétriques d'une feuille ont été analysés. L'un a subi une extraction par le chloroforme l'autre par l'acétate d'éthyle

extraction à l'acétate d'éthyle	0,70 $\mu\text{g/g}$
extraction par le chloroforme	0,35 $\mu\text{g/g}$

C'est donc l'acétate d'éthyle qui donne de meilleurs résultats. Des extractions témoins à partir de feuilles de bananiers n'ayant reçu aucun traitement ont été réalisées. Aucune zone d'inhibition de croissance ni de sporulation ne fut repérée. La technique de cette extraction n'entraîne donc pas l'apparition de composés fongicides.

DISTRIBUTION DU BENOMYL DANS UNE FEUILLE

Le benomyl est incorporé dans le sol à raison de 50 et 250 g de matière active par mètre cube de terre. Une feuille est prélevée puis découpée en secteurs comme l'indique la figure 2.

Chaque secteur est soumis à une extraction chimique. Les résultats ont été les suivants : 49 jours après le traitement (traitement le 22 janvier, prélèvement le 12 mars 1971) pour des bananiers cultivés dans une terre à laquelle nous avons ajouté l'équivalent de 250 grammes de benomyl par mètre cube :

A1	pas de zone d'inhibition
A2	pas de zone d'inhibition
B1	0,33 $\mu\text{g/g}$
B2	0,53 $\mu\text{g/g}$
C1	pas de zone d'inhibition
C2	2,26 $\mu\text{g/g}$

Ces résultats montrent une accumulation du benomyl sur les bordures des feuilles et en particulier au sommet de celles-ci.

Le fait de n'obtenir aucune zone d'inhibition de germination dans certains secteurs ne signifie pas qu'il n'y a pas de benomyl dans ces secteurs. Il se trouve sûrement une faible quantité de fongicide dans ces parties mais du fait de la faible masse des échantillons (3 grammes en moyenne) ce peu de benomyl ne peut être extrait et ne peut se révéler sur une culture de champignon. Une autre expérience a donné des résultats analogues; bananier poussant sur un sol contenant 50 grammes de matière active par mètre cube de terre (prélèvement effectué aux mêmes dates.

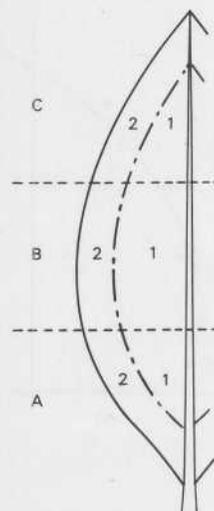


FIGURE 2

A 1	pas de zone d'inhibition
A 2	1,05 $\mu\text{g/g}$
B 1	pas de zone d'inhibition
B 2	1,4 $\mu\text{g/g}$
C 1	pas de zone d'inhibition
C 2	1,5 $\mu\text{g/g}$

On note des différences assez sensibles entre ces deux essais selon la dose utilisée et l'emplacement des prélèvements, ceci peut s'expliquer par des différences d'absorption par les systèmes racinaires qui ne sont jamais identiques.

L'accumulation du benomyl sur les bordures a été mentionnée par de nombreux auteurs. PETERSON et EDGINGTON en particulier ont montré qu'il y avait un changement progressif dans la distribution du benomyl dans des feuilles provenant de plantules de haricot en culture hydroponique. Initialement le composé chimique est présent dans toute la feuille, il est toutefois plus concentré dans la partie basale et le long de la nervure centrale. Après quelques jours le benomyl se concentre dans les parties marginales et au sommet des feuilles. Si les plantules sont remises dans un milieu nutritif sans fongicide la partie centrale devient complètement dépourvue de fongicide.

Nous pouvons noter que les travaux de ces chercheurs américains ont été faits dans la plupart des cas sur des plantules en culture hydroponique. Nous avons cultivé des bananiers en hydroponie. De trop fortes concentrations en benomyl 100, 250 ppm inhibent la croissance du bananier. Il apparaît des symptômes d'engorgement, le système racinaire cesse toute croissance, les feuilles présentent sur leur pourtour de nombreuses petites taches marron qui sont dues à une accumulation de benomyl dans ces zones où la concentration est particulièrement importante (figure 3) comme le montre les résultats suivants :

zone A	70 $\mu\text{g/g}$
zone B	24 $\mu\text{g/g}$

Certains auteurs PETERSON et EDGINGTON expliquent ce phénomène par un mouvement passif des molécules qui tendent à s'accumuler sur l'extérieur et au sommet des feuilles. Une expérience simple confirme leur thèse. Des morceaux de papier filtre sont découpés de façon à reproduire la forme d'une feuille. Ces papiers filtres sont mis à tremper dans un colorant (Eosine 0,1 p. cent). Le colorant est ensuite remplacé par de l'eau, on constate alors une migration intense et une accumulation du colorant sur les bordures et au sommet des papiers filtres.

Ce mouvement passif n'est sûrement pas le seul responsable de l'accumulation du benomyl sur les bordures et à l'apex des feuilles. La feuille est un organe vivant, elle respire, elle transpire, le nombre des stomates fonctionnels est plus important sur les bordures qu'au centre. La feuille comme nous le verrons dans le chapitre suivant présente une variation continue quant à sa concentration en fongicide. Ces variations semblent être en rapport avec son activité métabolique. Cette accumulation sur les bordures semble être la résultante d'un ensemble de phénomènes tant physiques que physiologiques. Les facteurs hydriques ayant une influence sur la régulation stomatique, des expériences de dosage de fongicide en fonction du degré hygrométrique pourraient être tentées.

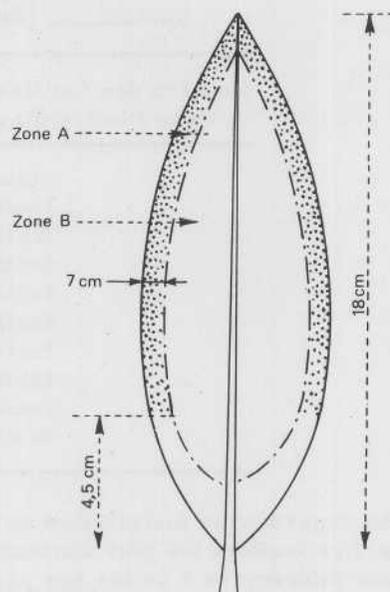


FIGURE 3

DISTRIBUTION DU BENOMYL DANS UN BANANIER

Le bananier sur lequel nous avons prélevé les différentes feuilles nécessaires à cet essai s'est développé sur un sol contenant l'équivalent de 250 g de matière active par mètre cube de terre.

Trois séries d'extraction ont été effectuées à trois dates différentes. Lorsqu'une même feuille a été analysée deux fois, l'extraction a porté sur deux fragments symétriques par rapport à la nervure centrale afin de pouvoir comparer les résultats (tableau 2).

Tableau 2 - Concentration en fongicide dans les différentes feuilles d'un bananier (en $\mu\text{g/g}$)
(Date d'application le 22 janvier)

Numéro des feuilles au moment de l'analyse dans l'ordre d'âge croissant	Dates des extractions		
	27 avril	5 mai	10 mai
cigare 13			0,35
feuille 12		0,87	0,6
feuille 11		3,6	3,15
feuille 10	2	3	
feuille 9		3,3	1,95
feuille 8	1,74	1,12	
feuille 6	3,23		2,34
feuille 4	1,16		
feuille 2	1,4		
feuille 1	0,56		

En regardant la distribution du fongicide à un temps donné nous constatons des variations notables. Les feuilles les plus anciennement formées (feuilles 1, 2, 4) possèdent des quantités de fongicide inférieures à celles des parties supérieures. D'autre part, le pic de concentration maximum en fongicide se situe le 27 avril sur la feuille n° 6, le 5 mai ce pic est passé sur les feuilles 9, 10, 11, le 10 mai le pic se situe au niveau de la 11ème feuille. Comparant deux extractions effectuées à partir d'une même feuille à deux temps différents, nous voyons des variations assez importantes quant à la concentration en fongicide. Tous ces résultats quoique fragmentaires et qui demandent à être précisés ne se contredisent pas. Il semble que l'accumulation du fongicide soit liée à l'activité de la feuille. Les feuilles dont le métabolisme cellulaire est intense présentent de fortes accumulations de benomyl puis, du fait de la baisse de l'activité métabolique, le fongicide semble être redistribué dans les parties supérieures du bananier, parties supérieures nouvellement formées et présentant à leur tour une importante activité physiologique. Cette forte concentration en benomyl dans les feuilles supérieures est intéressante si on considère les modes de dispersion du *Cercospora musae* et de sa forme parfaite *Mycosphaerella musicola*. J. BRUN a montré qu'à partir d'un inoculum, conidies et ascospores se trouvant situées au niveau des feuilles âgées portant des nécroses, la dispersion pouvait s'effectuer dans trois directions :

- entraînement des conidies vers le bas par l'eau de ruissellement c'est-à-dire vers les feuilles des jeunes rejets
- entraînement des ascospores par les mouvements ascendants de l'air vers les jeunes feuilles les plus élevées du pied mère et des pieds environnants
- transport latéral des ascospores permettant une dissémination de la maladie sur plusieurs kilomètres.

Dans tous les cas les lésions de cercosporiose n'apparaissent que sur les jeunes feuilles. Si ces jeunes feuilles, comme l'indiquent les résultats précédents possèdent les plus fortes concentrations en fongicide, elles ne pourront être le siège d'une attaque et l'évolution de la maladie sera enrayée. Malheureusement le coût d'une incorporation de fongicide dans le sol rend cette expé-

rience inadaptée dans la pratique pour le moment du moins.

Le fait que le benomyl migre du sol dans la partie aérienne des plantes est bien connu. Mais sur bananiers, des observations ont montré que les feuilles apparaissant après un traitement foliaire étaient protégées contre les attaques de cercosporiose et cela pendant un délai minimum de 30 jours, cela suppose que le fongicide déposé sur la feuille migre vers le bulbe et est ensuite redistribué dans les nouvelles feuilles. Le but de notre manipulation était d'extraire, pour le doser, le fongicide contenu dans ces feuilles. Cependant avant d'exposer les résultats obtenus, il est indispensable de dire quelques mots sur la morphologie du bananier car de cette morphologie particulière plusieurs conclusions pourront être tirées lors de l'interprétation des résultats.

Le bananier est une plante herbacée géante et vivace. La partie vivace est un rhizome souterrain qui émet d'une part des racines et d'autre part une série de feuilles pourvues d'une partie basale cylindrique développée : la gaine foliaire. Ces gaines s'imbriquent les unes dans les autres et forment le pseudo-tronc (figure 4).

Ce que l'on appelle la "tige" est en fait une fausse tige formée par l'emboîtement des bases des feuilles insérées sur un axe réel (tr) réduit.

Les bananiers qui ont servi lors de ces expériences ont été traités de la manière suivante : atomisation sur le feuillage complet d'une dose de 250 mg de matière active en suspension dans 6 cc d'huile.

Date de la pulvérisation : 26 avril.

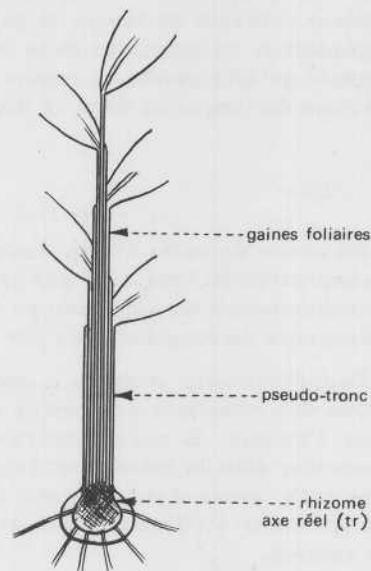


FIGURE 4 • Schéma d'une coupe longitudinale dans un bananier.

Tableau 3 - Concentration en fongicide dans les quatre feuilles apparues après un traitement du feuillage

extractions date	jours*	nombre feuilles apparues *	concentration $\mu\text{g/g}$ fongicide
10.5	14	1	0,18
26.5	30	2	0,18
9.6	44	3	0,12
28.6	63	4	0,16

* après traitement.

Ces résultats confirment la présence de benomyl dans les feuilles apparues après un traitement.

Cette mise en évidence est importante car du fait de la morphologie particulière du bananier cette présence de benomyl dans les nouvelles feuilles implique vraisemblablement une descente du fongicide par les canaux de la sève élaborée, puis une remontée vers les jeunes feuilles par les canaux de la sève brute. Ces résultats ont aussi des conséquences d'ordre pratique. La remontée du fongicide dans les feuilles nouvellement apparues assure une certaine protection de celles-ci et permet par conséquent d'espacer les traitements. Cependant avant d'envisager cette solution, il est nécessaire de préciser plusieurs points.

Ces doses relativement faibles en fongicide sont-elles suffisantes pour prolonger la protection

* Des extractions réalisées le 15 juillet et le 26 juillet après la rédaction du manuscrit ont montré des concentrations de 0,15 μg dans la feuille 5 et 0,05 μg dans la feuille 6.

des feuilles contre les attaques du *Cercospora* ? Un début de réponse nous est donné par les observations en bananeraies. Les quatre feuilles apparues après un traitement contiennent du fongicide. Cependant des infections artificielles devraient être tentées au laboratoire pour connaître la concentration minimale nécessaire pour éviter l'infection.

Quand cesse cette distribution du fongicide dans les feuilles nouvelles ou, en d'autres termes, pendant combien de temps la protection est-elle assurée ? Cette protection est en rapport avec la dégradation du fongicide dans la plante. Nous avons très peu de données à ce sujet, il semble cependant qu'elle existe au moins durant 60 jours. D'autres essais permettront de préciser la durée d'action du fongicide dans la plante après un traitement foliaire.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un certain nombre de faits :

- absorption du fongicide par les racines et distribution de celui-ci dans les feuilles,
- accumulation du fongicide en bordure et à l'apex des feuilles,
- descente du fongicide par les canaux de sève élaborée et distribution dans les nouvelles feuilles.

Des études sur le terrain ont été menées conjointement à ce travail en laboratoire, la confrontation des résultats permettra sûrement une meilleure compréhension des phénomènes. Cependant pour l'avenir, il serait intéressant, possédant une technique d'extraction simple et rapide, d'approfondir afin de mieux les comprendre, chacun des résultats mentionnés au cours de cet exposé. Une très bonne connaissance de la distribution du fongicide dans le bananier pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des traitements en diminuant leur fréquence et par conséquent leur prix de revient.

BIBLIOGRAPHIE

- AUBERT (B.). 1970. Etude de la résistance à la diffusion gazeuse au niveau de l'épiderme foliaire du bananier (*Musa acuminata* Colla c.v. *sinensis*) et de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en conditions naturelles. *Fruits*, vol. 25, n° 7-8, p. 495-507.
- BRUN (J.). 1963. La cercosporiose du bananier en Guinée. Etude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* Leach. Thèse Institut français de Recherches fruitières Outre-Mer (IFAC), Paris.
- CESSAC (M.) et DOBEL (J.B.). 1969. Caractéristiques générales du benomyl ou fongicide Du Pont 1961. *Phytiatrie - Phytopharmacie*, Tome 18, n° 1, 3-8.
- CHANCOGNE (M.) et GREDT (M.) 1969. Etude au laboratoire de l'efficacité fongicide du benomyl. *Phytiatrie - Phytopharmacie*, Tome 18, n° 1, p. 9-13.
- CLEMONS (G.P.) et SISLER (H.D.). 1969. Formation of a fungitoxic derivative from Benlate. *Phytopathology*, 59, 705-706.
- MATHER (K.). 1965. Analyse statistique en biologie. Gauthiers-Villars, Paris
- MELIN (Ph.). 1970. Nouvelles perspectives de lutte contre la cercosporiose du bananier. *Fruits*, vol. 25, n° 3, p. 141-143.
- PETERSON (C.A.) et EDGINGTON (L.V.). 1970. Transport of the systemic fungicide, benomyl in bean plants. *Phytopathology*, 60, 475-478.
- PETERSON (C.A.) et EDGINGTON (L.V.). 1971. Transport of Benomyl into various plant organs. *Phytopathology*, 61, 91-92.
- RAPILLY (F.). 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties*, vol. 19, n° hors série.

