

Aspects biochimiques des herbicides à base de triazines

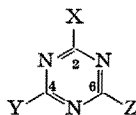
par E. EBERT et P. W. MÜLLER¹

J. R. Geigy S.A., Dépt. Prod. Antiparasitaires, Bâle (Suisse)

L'élucidation du mode d'action d'une substance de synthèse douée d'activité biologique présente un intérêt non seulement en vue de son utilisation pratique, mais aussi pour la recherche fondamentale. Une telle substance, par son action spécifique, peut se révéler précieuse dans l'étude des mécanismes biochimiques.

Les herbicides intervenant au niveau de la photosynthèse en sont un remarquable exemple. Parmi les inhibiteurs de la réaction de HILL, les s-triazines alkylées prennent place à côté des phénylurées substituées, des acylanilides et des carbamates. Bien que leur action sur la croissance des plantes semble être principalement due à l'inhibition de la photosynthèse, les triazines modifient également d'autres systèmes biochimiques, même en l'absence de lumière.

De nombreuses plantes supérieures ont la faculté de métaboliser la molécule de triazine, de même que certains microorganismes dépourvus de tout appareil photosynthétique. La nette sélectivité des sym-triazines à l'égard de certaines espèces végétales est due à diverses réactions métaboliques particulières provoquant une modification et une détoxification de la matière active. Quelques-uns des dérivés triaziniques mentionnés dans ce travail sont réunis dans le Tableau suivant.



Désignation commune	X	Y	Z
simazine	Cl	NH C ₂ H ₅	NH C ₂ H ₅
atrazine	Cl	NH C ₂ H ₅	NH iso-C ₃ H ₇
propazine	Cl	NH iso-C ₃ H ₇	NH iso-C ₃ H ₇
ipazine	Cl	NH iso-C ₃ H ₇	N (C ₂ H ₅) ₂
chlorazine	Cl	N (C ₂ H ₅) ₂	N (C ₂ H ₅) ₂
prométryne	SCH ₃	NH iso-C ₃ H ₇	NH iso-C ₃ H ₇
prométone	OCH ₃	NH iso-C ₃ H ₇	NH iso-C ₃ H ₇
dérivé hydroxylé	OH	comme ci-dessus	
amméline	OH	NH ₂	NH ₂
ammélide	OH	NH ₂	OH
acide cyanurique	OH	OH	OH

Les substances les plus utilisées appartiennent au groupe des chlorotriazines et sont connues sous les dénominations communes de simazine, atrazine et propazine. La prométryne est un exemple de la série des méthylthiotriazines et la prométone est un bon herbicide parmi les dérivés méthoxylés. Les analogues hydroxylés n'ont pas de propriétés herbicides.

Cette étude résume l'état actuel de nos connaissances sur la biochimie des herbicides à base de triazines et sur leur vaste champ d'action intéressant le métabolisme végétal.

(1) Effets des triazines sur la photosynthèse et sur les processus liés à la lumière

On sait que les herbicides du type phénylurée ou triazine inhibent la photolyse de l'eau, privant ainsi le système chlorophyllien des électrons nécessaires à la photosynthèse.

Les premiers travaux de MORELAND et al.^{2,3} et de EXER^{4,5} sur des chloroplastes isolés d'orge et d'épinard ont montré que la simazine diminuait considérablement la réaction de HILL avec le ferricyanure de potassium ou le vert de Janus. GYSIN et KNÜSLI⁶ et GOOD⁷ ont donné un résumé des taux d'inhibition pour quelques dérivés triaziniques.

La simazine n'agissant pas sur la photoréduction d'algues telles que *Scenedesmus* ou *Ankistrodesmus* adaptées à la photoréduction en atmosphère d'hydrogène, on en déduit que le lieu d'interférence des triazines avec la photosynthèse doit être situé dans la zone de dégagement de l'oxygène, selon le schéma

¹ Une partie de ce travail a été présentée lors de la 463^e séance de la Biochemical Society, Aberystwyth, septembre 1966. P. W. MÜLLER, *Biochem. J.* 101, 1P. (1966).

Nous tenons à exprimer nos remerciements à R. TRUAN qui a bien voulu se charger de la version française ainsi qu'à G. DUPUIS pour sa participation à la mise au point du manuscrit.

² D. E. MORELAND et K. L. HILL, *Weeds* 10, 229 (1962).

³ D. E. MORELAND, W. A. GENTNER, J. J. HILTON et K. L. HILL, *Pl. Physiol.* 34, 432 (1959).

⁴ B. EXER, *Weed Res.* 1, 233 (1961).

⁵ B. EXER, *Experientia* 14, 135 (1958).

⁶ H. GYSIN et E. KNÜSLI, *Adv. Pest Control Res.* 3, 342 (1960).

⁷ N. E. GOOD, *Pl. Physiol.* 36, 788 (1961).

général de la photosynthèse qui comprend 2 réactions photochimiques⁸ (voir schéma).

Toute théorie sur le mécanisme de la photosynthèse doit considérer la concentration d'inhibiteur qui provoque une inhibition de 50% de la réaction de HILL dans les chloroplastes isolés; pour la simazine, cette concentration est d'environ $7 \times 10^{-7} M$. La concentration de la chlorophylle est beaucoup plus forte. Notons à ce propos que le nombre de centres catalytiques produisant de l'oxygène a été estimé par GOOD à 1 pour 2.500 molécules de chlorophylle. ZWEIG, TAMAS et GREENBERG⁹ ont déterminé l'inhibition provoquée par la simazine et l'atrazine dans des suspensions de *Chlorella* en mesurant la diminution du dégagement d' O_2 . Les valeurs ainsi obtenues sont du même ordre de grandeur que celles résultant d'études sur les chloroplastes isolés avec réduction du ferricyanure comme mesure de l'activité. Une étude détaillée sur le nombre de points doués d'activité photosynthétique dans des chloroplastes isolés a été entreprise par IZAWA et GOOD¹⁰. Deux méthodes indépendantes ont été utilisées pour déterminer la quantité d'inhibiteur réellement présente dans les chloroplastes: GOOD les a appelées «chloroplast-amount-method» et «chloroplast-removal-method». Selon la première méthode, on détermine la quantité d'inhibiteur nécessaire pour obtenir le même degré d'inhibition qu'un système de référence déjà inhibé, après adjonction d'une quantité connue de chloroplastes non traités. La seconde méthode est fondée sur la centrifugation d'une suspension de chloroplastes traités. La quantité d'inhibiteur restant dans la solution qui surnage est déterminée au moyen de chloroplastes frais. Soulignons que le diuron est absorbé beaucoup plus fortement par les chloroplastes que ne le sont le monuron et l'atrazine. Les résultats de ces expériences ont montré que l'absorption de ces inhibiteurs par les chloroplastes faisait intervenir au moins trois mécanismes. Premièrement, une liaison à peu près irréversible de l'inhibiteur jusqu'à ce que soit atteinte la concentration d'une molécule d'inhibiteur pour 1000 molécules de chlorophylle. Deuxièmement, un processus d'absorption indépendant de la concentration en inhibiteur. Troisièmement, une absorption correspondant intimement au degré d'inhibition.

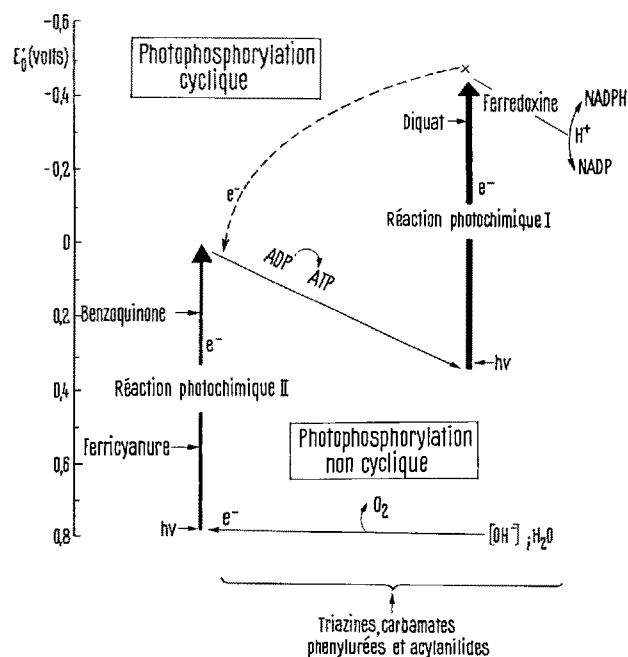
Mentionnons, sous cet aspect, les travaux de VAN RENSEN et de VAN STEEKELENBURG¹¹. La diminution de la photosynthèse obtenue par la simétone dans les algues unicellulaires *Scenedesmus* était réversible après lavage des cellules à l'eau.

Un autre phénomène observé en présence de triazines est la stimulation de la fluorescence (induite par la lumière) du système photochimique. Dans des suspensions de *Chlorella*, ZWEIG, TAMAS et GREENBERG⁹ trouvèrent une relation linéaire entre l'accroissement de la fluorescence en % et le logarithme de la concentration en triazines. La concentration pour

laquelle la fluorescence augmente de 50% correspond très bien à la concentration nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de la production d'oxygène avec *Chlorella*. Nos connaissances sur la biochimie de la photolyse de l'eau étant encore très limitées, le lieu exact d'action des herbicides à base de triazines, demeure imprécis.

L'une des conséquences du blocage de la réaction de HILL^{4,5} est l'inhibition de la réduction du NADP. Or la production de NADPH₂, en plus de celle d'ATP par les systèmes de photosynthèse, sont indispensables à l'assimilation subséquente de CO_2 .

Une hypothèse a été avancée pour expliquer l'action phytotoxique des herbicides à base de triazines: l'inhibition de la photolyse de l'eau provoquerait un blocage de la photoassimilation du CO_2 et, par conséquent, de la formation des glucides. En effet les enzymes intervenant dans la synthèse de l'amidon ne sont pas inhibées dans leur action. On a pu empêcher la disparition de l'amidon dans les feuilles de *Coleus blumei* traité aux triazines en fournissant du saccharose aux feuilles¹². De plus, les dégâts provoqués par la simazine à des plants d'orge par suite de ce blocage ont été neutralisés par l'administration de glucose à travers les feuilles². L'action des triazines se situerait



Lieux d'action supposés des herbicides au cours de la photosynthèse

⁸ N. J. BISHOP, Biochim. biophys. Acta. 57, 186 (1962).

⁹ G. ZWEIG, I. TAMAS et E. GREENBERG, Biochim. biophys. Acta. 66, 196 (1963).

¹⁰ S. IZAWA et N. E. GOOD, Biochim. biophys. Acta. 102, 20 (1965).

¹¹ J. J. S. VAN RENSEN et P. A. VAN STEEKELENBURG, Meded. Landbougesch. Wageningen, 65, 1 (1965).

¹² A. GAST, Experientia 14, 134 (1958).

donc non pas au niveau de la synthèse des polysaccharides et de l'amidon, mais bien au niveau de celle des monosaccharides eux-mêmes.

Comme les triazines arrêtent le flux d'électrons mus par la lumière entre OH^- et NADP, la photophosphorylation non cyclique, réaction stoechiométrique, est aussi inhibée, alors que la photophosphorylation cyclique reste intacte. Les triazines sont cependant capables de découpler la photophosphorylation cyclique, mais les concentrations nécessaires sont alors de 50–100 fois plus élevées que celles requises pour bloquer la réaction de HILL¹³. Si l'on compare la constitution chimique des herbicides qui se ressemblent par le mode d'action, on constate une caractéristique commune: ils ont un groupe imino ($=\text{N}-\text{H}$) voisinant avec un groupe carbonyle ($=\text{C}=\text{O}$) dans la phénylurée et les acylanilides. Chez les triazines, le groupe ($=\text{C}=\text{N}-$) a des propriétés analogues. Les composés de ce type ont la propriété de former des «liaisons hydrogène» et réagissent de cette manière avec le centre actif des enzymes. Il y a pourtant une exception: la chlorazine n'a pas d'hydrogène en groupe imino et elle exerce cependant une activité herbicide, 100 fois plus faible toutefois que la simazine⁷. La théorie de la liaison hydrogène rendant compte de l'activité des triazines symétriques a été confirmée par des études sur la constitution moléculaire¹⁴; il est vrai que d'autres faits expérimentaux semblent infirmer cette théorie¹⁵.

La diminution de la transpiration est un autre phénomène qui, selon une théorie, trouve une explication dans l'action des triazines sur la photosynthèse. SMITH et BUCHHOLTZ¹⁶ dans le Wisconsin et WILLS, DAVIS et FUNDERBURK¹⁷ dans l'Alabama ont signalé une modification du taux de la transpiration chez plusieurs plantes traitées à l'atrazine. L'examen microscopique a montré que cette réduction de la transpiration était due à la fermeture des stomates et non à un ralentissement de l'absorption d'eau par les racines. La fermeture des stomates, le fait a été démontré, est liée à une diminution de la turgescence des cellules péristomatiques. Deux mécanismes différents ont été proposés pour expliquer la diminution de turgescence de ces cellules. Selon le premier, il y aurait une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire, selon le second, les réactions de métabolisme seraient affectées. Or il n'est pas très probable que la perméabilité de la membrane cellulaire soit influencée, car l'hydroxyatrazine ne réduit pas le taux de transpiration et n'inhibe pas non plus la photosynthèse. L'explication la plus plausible est que le blocage de la photosynthèse augmente la concentration de CO_2 dans la cellule. Une élévation du taux de CO_2 dans la cellule inhibe la synthèse de l'acide glycolique, auquel WAGGONER et ZELITCH¹⁸ attribuent un rôle spécial dans la synthèse des glucides des cellules péristomatiques. Toutefois, avant de parvenir à une conclusion valable, il faut connaître avec plus de précision l'un ou l'autre

des chemins qui mène à l'assimilation du CO_2 . Il faut en outre découvrir les mécanismes de régulation qui garantissent un bon fonctionnement des réactions métaboliques.

ASHTON, GIFFORD et BISALPUTRA¹⁹ étudièrent les modifications de structure dans *Phaseolus vulgaris* sous l'influence de l'atrazine. Une désagrégation progressive de la structure des chloroplastes fut observée et un effondrement des cellules se produisit après traitement avec 10 ppm d'atrazine. Selon KRIHNING²⁰ au contraire, le protoplasme et les membranes cytoplasmiques des cellules épidermiques de *Solanum tuberosum* ne sont pas affectés par $2,5 \times 10^{-5} M$ de simazine. A des concentrations sous-létales de plusieurs produits à base de triazines, on observe même une stimulation par épaissement foliaire dû au développement de cellules parenchymateuses spongieuses et chlorophylliennes²¹. Les feuilles des plantes traitées sont souvent plus vertes que les témoins^{22–25}, la synthèse chlorophyllienne semble être stimulée ou sa dégradation retardée, ce qui ralentit la sénescence. KARNATZ²⁴ ainsi que MASTAKOV et PROHORČIK²⁶ ont fait des estimations quantitatives de cette augmentation de la chlorophylle.

Le résultat le plus intéressant obtenu par ASHTON et ses collaborateurs²⁷ est d'avoir établi que l'action de l'atrazine sur la structure végétale, sur les cellules et les chloroplastes, est liée à la lumière. En effet, ASHTON²⁷ montra que le degré des dégâts provoqués par l'atrazine et le monuron sur l'avoine et le haricot nain était fonction de l'intensité de la lumière. La toxicité des herbicides augmentait avec l'accroissement de la quantité de lumière. En étudiant les dégâts en fonction des radiations de diverses longueurs d'onde, il s'avéra que les dégâts maxima étaient provoqués par des radiations de 428 nm et 658 nm. Ces longueurs d'onde sont semblables à celles qui stimulent fortement la croissance de plantes non traitées. Ces résultats ont été interprétés comme suit: des substances phytotoxiques sont formées par éclaircissement, les chlorophylles

¹³ C. C. BLACK et L. MYERS, Weeds 14, 331 (1966).

¹⁴ K. L. HILL, Proc. sth. Weed Conf. 18, 594 (1965).

¹⁵ R. C. BRIAN, Chemy Ind. 1955 (1965).

¹⁶ D. SMITH et K. P. BUCHHOLTZ, Science 136, 263 (1962).

¹⁷ G. D. WILLS, D. E. DAVIS et H. H. FUNDERBURK JR., Weeds 11, 253 (1963).

¹⁸ P. E. WAGGONER et I. ZELITCH, Science 150, 1413 (1965).

¹⁹ F. M. ASHTON, E. M. GIFFORD et T. BISALPUTRA, Bot. Gaz. 124, 329 (1963).

²⁰ J. KRIHNING, Phytopath. Z. 53, 65, 241, 372 (1965).

²¹ C. L. FOY et T. BISALPUTRA, Pl. Physiol., Lancaster 39, suppl. LXVIII (1964).

²² C. BARTLEY, Agr. Chem. 12, 34, 113 (1957).

²³ A. GAST, Schweiz. Z. Obst- u. Weinb. 69, 203 (1960).

²⁴ H. KARNATZ, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, Sonderheft 2, 175 (1964).

²⁵ S. GOREN et S. P. MONSELISE, Weeds 14, 141 (1966).

²⁶ S. M. MASTAKOV et R. A. PROHORČIK, Dokl. Akad. Nauk belorussk. SSR 6, 517 (1962).

²⁷ F. M. ASHTON, Weeds 13, 164 (1965).

a et *b* jouant un rôle dans ces réactions. Cette hypothèse a déjà été proposée par SWEETSER et TODD²⁸ qui étudièrent le mode d'action des phénylurées. On n'a cependant pas encore isolé la substance toxique en cause.

(2) Effets des triazines sur les systèmes indépendants de la lumière

Jusqu'ici nous avons vu les herbicides à base de triazines dans leur action plus ou moins directe sur la photosynthèse et les mécanismes dépendant de la lumière. La mise en évidence de toute action des triazines sur un système entièrement indépendant des réactions lumineuses complèterait nos connaissances sur leur mode d'action. Des recherches ont effectivement été faites dans cette direction. JORDAN, MURASHIGE, MANN et DAY²⁹, travaillant sur du tissu calleux et non photosynthétique de tabac, observèrent que l'atrazine et la simazine inhibaient la croissance de ce tissu, à l'obscurité et dans un milieu contenant du saccharose. L'inhibition était de 50% pour une concentration d'atrazine de $10^{-6}M$. Cette concentration est presque 20 fois plus forte que celle qui inhibe la photosynthèse. Avec le monuron, la même toxicité a été obtenue avec une concentration de $10^{-4}M$. Aux concentrations de $10^{-5}M$ et $10^{-4}M$, l'analogue hydroxylé de l'atrazine ne s'est pas montré toxique pour le tissu calleux du tabac. Cette action des triazines symétriques sur la croissance des cellules végétales serait l'une des raisons de leur phytotoxicité pour quelques espèces de plantes, même à l'obscurité, ainsi que l'a noté CRAFTS³⁰. Lorsque les concentrations d'herbicide sont suffisamment élevées, les plantules des adventices n'émergent pas du tout, ce qui fait supposer une action sur les hormones de croissance.

Les modifications survenant dans la croissance des cellules végétales pourraient être dues, non seulement à une interaction au sein de l'équilibre hormonal, mais aussi à des facteurs physico-chimiques. Chez des pétioles de *Lycopersicum esculentum* traités avec $2,5 \times 10^{-5}M$ de simazine, l'absorption d'eau était constamment plus grande que la perte d'eau par transpiration, ce qui fit augmenter le poids frais. Une étude sur la plasmolyse des protoplastes des pétioles de *Solanum tuberosum* traités avec la même concentration de simazine montra une légère stimulation de la turgescence et une accélération de la perméabilité à l'eau du plasmolème³¹. On expliquerait de cette manière la turgescence et l'état de fraîcheur des feuilles d'arbres fruitiers traités à la simazine.

Un autre processus est influencé par les triazines avec localisation dans la zone du plasmolème de la membrane cellulaire: il s'agit d'une absorption accrue de sels minéraux par les racines. DE VRIES³¹ suppose que les triazines qui ont une action herbicide influencent favorablement chez le maïs, l'absorption de l'azote contenu dans le milieu nutritif. FRENEY³² a

fait l'observation suivante chez les pousses de maïs: lorsqu'elles sont cultivées dans une solution nutritive contenant 0,06 ppm de simazine, les pousses de maïs augmentent leur absorption de 37% pour l'azote, de 25% pour le phosphore, de 24% pour le magnésium et de 24% pour le potassium. La teneur en matière sèche de la partie aérienne augmenta de 37%. Une augmentation du poids de la matière sèche, due particulièrement à une teneur plus élevée en azote et surtout en protéines a été constatée par de nombreux auteurs^{22,24,33-40}. Ces observations proviennent surtout de cultures en plein champ.

Il est apparu assez rapidement que les triazines n'influençaient pas seulement la photosynthèse mais encore d'autres phénomènes touchant à la physiologie végétale. ZWEIG et ASHTON⁴¹ traitèrent des feuilles de haricot avec 10 ppm d'atrazine et laissèrent les plantes 72 h à la lumière en présence de $^{14}CO_2$. Aucune radioactivité n'était présente dans le saccharose, alors que l'aspartate, le glutamate, le malate, la sérine et la glycine étaient radio-marqués. Cette incorporation du $^{14}CO_2$ ressemblait à celle observée dans l'obscurité en l'absence d'atrazine, mais les acides aspartique et glutamique étaient significativement plus marqués.

On a également obtenu des modifications et des augmentations des fractions des acides aminés chez des plantes traitées aux triazines. Des chercheurs polonais⁴²⁻⁴⁵ trouvèrent une teneur plus forte en acides aminés libres, surtout en asparagine, chez des plants d'avoine traités aux triazines. Des variations semblables dans la teneur en acides organiques ont été trouvées dans le raifort et le blé par GNANARETHINAM⁴⁶.

²⁸ P. B. SWEETSER et C. W. TODD, Biochim. biophys. Acta. 51, 504 (1961).

²⁹ L. S. JORDAN, T. MURASHIGE, J. D. MANN et B. E. DAY, Weeds 14, 134 (1966).

³⁰ A. S. CRAFTS, The Chemistry and Mode of Action of Herbicides (N.Y. Interscience Publ. 1961).

³¹ M. L. DE VRIES, Weeds 11, 220 (1963).

³² J. R. FRENEY, Austr. J. agric. Res. 16, 257 (1965).

³³ H. DOMANSKA, Combatearea Buruienelor cu Ajutorul Erbicidelor, Bucharest, 99 (1962).

³⁴ A. GAST et H. GROB, Pest Technol. 68 (1960).

³⁵ S. K. RIES, R. P. LARSEN et A. L. KENWORTHY, Weeds 11, 270 (1963).

³⁶ A. D. KONEW et T. A. GERASSIMOWA, Chimija w sel'skom choz. 4, 46 (1965).

³⁷ S. K. RIES et A. GAST, Weeds 13, 272 (1965).

³⁸ S. K. RIES, H. CHMIEL, D. R. DILLEY et P. FILNER, Proc. natn Acad. Sci. USA 58, 526 (1967).

³⁹ J. V. GRAMLICH et D. E. DAVIS, Weeds 15, 157 (1967).

⁴⁰ R. J. FINK et O. H. FLETCHALL, Weeds 15, 272 (1967).

⁴¹ G. ZWEIG et F. M. ASHTON, J. exp. Bot. 13, 5 (1962).

⁴² B. SWIETOCHOWSKI et S. MIKLASZEWSKI, Zesz. nauk. wysz. Szk. roln. Wrocl. 15, 91 (1962).

⁴³ B. SWIETOCHOWSKI, M. PLOSZYNSKI et H. ZURAWSKI, Pam. Pulawski 21, 211 (1966).

⁴⁴ J. GLABISZEWSKI, M. PLOSZYNSKI, G. SZUMILAK et H. ZURAWSKI, Pam. Pulawski 21, 233 (1966).

⁴⁵ M. PLOSZYNSKI et H. ZURAWSKI, Pam. Pulawski 21, 227 (1966).

⁴⁶ J. L. GNANARETHINAM et J. CARLES, C. r. Séanc. Soc. Biol. 160, 1093 (1966).

Afin de savoir s'il existe d'autres blocages du métabolisme que celui de la photosynthèse, ASHTON et URIBE⁴⁷ comparèrent l'influence de l'atrazine sur le métabolisme du saccharose et de la sérine marqués au ¹⁴C chez le haricot, à la lumière et à l'obscurité. Les modifications dans la distribution relative des composés marqués par le ¹⁴C sont évidentes, surtout dans les fractions des acides aminés. Ces observations suggèrent l'existence d'une stimulation de voies métaboliques secondaires sous l'influence des triazines. Selon GRAMLICH, DAVIS et FUNDERBURK^{48,49}, une telle stimulation en présence d'atrazine peut être observée dans l'activité de la réductase des nitrates du tissu de maïs.

Dans des essais sur le maïs à basse température et à des concentrations réduites de nitrate dans la solution nutritive, RIES et al.^{38,50} trouvèrent que l'activité de la réductase des nitrates était augmentée en présence de faibles quantités de simazine. D'autre part, MANN, JORDAN et DAY⁵¹ étudièrent systématiquement l'influence de nombreux herbicides sur l'incorporation de la leucine dans les protéines de fragments de plantules d'orge et de *Sesbania*. Cette incorporation ne fut pas sensiblement modifiée par des concentrations de 2 et 10 ppm d'atrazine. Dans leurs expériences, SINGH et WEST⁵² trouvèrent que 1 ppm de simazine provoquait, dans les plantules d'avoine, une réduction notable des protéines de structure des chloroplastes, alors que les protéines des autres fractions cellulaires n'étaient pas atteintes au bout de 8 jours.

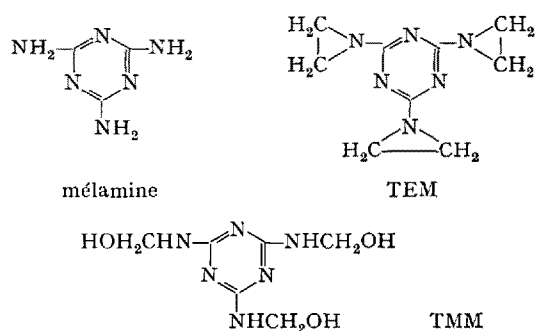
Quant aux effets des triazines sur le système des enzymes oxydatives de la respiration, plusieurs auteurs^{38,53} trouvèrent une stimulation de l'absorption de O₂ sans que le quotient respiratoire ne soit modifié. Selon ALLEN et PALMER⁵⁴ au contraire, la respiration de racines d'orge n'est pas influencée de manière significative par la simazine. Toutefois, l'absorption de O₂ par les racines est stimulée lorsqu'on ajoute au substrat du glucose, de l'asparagine ou de l'aspartate. D'après ces résultats, il est évident que les racines d'orge métabolisent ces substances différemment lorsqu'elles ont été traitées à la simazine. Alors que l'oxydation du succinate et de l' α -cétoglutarate semble être diminuée avec $3,25 \times 10^{-5} M$ de simazine⁵⁵, la respiration est au contraire à peine influencée. Le phénomène respiratoire peut donc se réaliser de diverses façons. Certaines voies pourraient relier le métabolisme de l'azote au système respiratoire. La déamination de l'aspartate, fournissant de l'oxalo-acétate, en serait un exemple. Un autre chemin pourrait donner naissance au pyruvate par déamination de l'alanine. La carboxylation du pyruvate donne du malate, lequel est lié à l'oxydase cytochrome⁵⁶. Ce processus est admis comme fortement probable, car l'atrazine provoque une baisse notable de la synthèse de l'alanine et une augmentation de la production de malate⁴⁷.

TEMPERLI et al.⁵⁷ ont récemment publié les résultats de leurs travaux sur le mutant auxotrophe triple de

Escherichia coli 15 arg⁻, t⁻, 4⁻ (nécessitant de l'arginine, de la thymine et de l'uracile). Après adjonction à un milieu de culture incomplet d'une triazine marquée au ¹⁴C dans l'hétérocycle, les fractions de l'ARN et de l'ADN renferment de la radioactivité. Le nucléotide correspondant n'a pas été isolé.

Certains auteurs suggèrent que les herbicides à base de triazines auraient une influence sur le noyau des cellules radiculaires des plantes, ainsi KIERMAYER⁵⁸, RAGAB⁵⁹. Ils se basent sur un travail de WAKONIG et ARNASON⁶⁰ qui ont signalé une rupture de chromosome provoquée dans les pointes des racines de *Vicia faba* par la tri-(éthylèneimino)-2,4,6-sym-triazine (TEM), substance utilisée dans la chimiothérapie du cancer en raison de ses propriétés alkylisantes⁶¹. Il s'agit cependant d'une interprétation erronée. Les herbicides à base de triazines en effet ne sont pas des agents d'alkylation comme la TEM. RÖHRBORN⁶² étudiant l'effet mutagène de plusieurs dérivés triaziniques, trouva que le noyau triazinique lui-même, ainsi que la mélamine (triamino-2,4,6-sym-triazine), étaient sans action génétique. En revanche, la triméthylolmélamine (TMM) (tri-(hydroxyméthylamino)-2,4,6-sym-triazine) et la TEM ont une forte action mutagène due au fort pouvoir d'alkylation des trois substituants méthylol et éthylène respectivement.

En plus, des recherches en cytologie ont montré que, dans les cellules des stipules de *Vicia faba* et dans les poils de *Tradescantia* traités à des faibles concentra-



⁴⁷ F. M. ASHTON et E. G. URIBE, *Weeds* 10, 295 (1962).

⁴⁸ J. V. GRAMLICH, D. E. DAVIS et H. H. FUNDERBURK, *Proc. sth. Weed Conf.* 18, 611 (1965).

⁴⁹ J. V. GRAMLICH, Thèse, Université de Auburn, Alabama (1965).

⁵⁰ J. A. TWEEDY et S. K. RIES, *Pl. Physiol.* 42, 280 (1967).

⁵¹ J. D. MANN, L. S. JORDAN et B. E. DAY, *Pl. Physiol.* 40, 840 (1965).

⁵² R. P. SINGH et S. H. WEST, *Weeds* 15, 31 (1967).

⁵³ W. ROTH, *Experientia* 14, 137 (1958).

⁵⁴ W. S. ALLEN et R. D. PALMER, *Weeds* 11, 27 (1963).

⁵⁵ C. L. FOY et D. PENNER, *Weeds* 13, 226 (1965).

⁵⁶ H. H. LUKE et T. E. FREEMAN, *Nature* 202, 719 (1964).

⁵⁷ A. TEMPERLI, H. TÖRLER et C. D. ERCEGOVICH, *Z. Naturf.* 21b, 903 (1966).

⁵⁸ O. KIERMAYER, dans *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*, (Ed. L. J. AUDUS; Academic Press, London and New York 1964), p. 212.

⁵⁹ M. T. H. RAGAB et J. P. MCCOLLUM, *Weeds* 9, 72 (1961).

⁶⁰ R. WAKONIG et T. J. ARNASON, *Can. J. Bot.* 37, 403 (1959).

⁶¹ M. V. NADKARNI, E. I. GOLDENTHAL et P. K. SMITH, *Cancer Res.* 17, 97 (1957).

⁶² G. RÖHRBORN, *Z. VererbLehre* 93, 1 (1962).

tions d'atrazine, la mitose se déroulait et se terminait normalement dès le début de la prophase⁶³.

Il serait fort intéressant d'aborder le problème du mode d'action des herbicides à base de triazines par l'étude des micro-organismes dépourvus de l'appareil photosynthétique. La plupart des travaux relatifs aux effets des triazines sur les micro-organismes ont été fait dans un but pratique afin de connaître l'influence de ces substances sur la microflore tellurique. La méthode employée ne consistait trop souvent qu'en une évaluation du dégagement de CO₂ et de la consommation de O₂ dans le sol. Il existe trois réactions possibles des micro-organismes à une concentration donnée d'un herbicide: aucune interaction, une inhibition, ou bien une stimulation. Ces 3 cas ont été observés. BOLLEN⁶⁴, dans sa publication consacrée aux interactions des pesticides et des microorganismes telluriques, ne mentionne que 2 travaux traitant des effets des triazines. Entretemps, un grand nombre de recherches ont été publiées et résumées par HARRIS et al.⁶⁵. Si l'on tient compte des résultats disponibles, on peut conclure que les triazines ne modifient pas de manière néfaste l'équilibre microbiologique du sol lorsqu'elles sont appliquées aux dosages requis par la pratique⁶⁶⁻⁶⁸.

Les processus de fixation de l'azote méritent qu'on leur prête une attention spéciale, vu leur importance. On a trouvé, en effet, avec d'autres herbicides, que les bactéries nitrifiantes étaient parmi les micro-organismes les plus sensibles. POCHON⁶⁹ observa une légère stimulation de *Azobacter* après application de doses usuelles de simazine, et GUILLEMAT^{70,71} obtint, dans certains sols, un accroissement de la population de *Azobacter* après l'application de simazine à raison de 6 kg/ha. Afin de déterminer l'effet des triazines sur le taux de fixation de l'azote chez *Azobacter vinelandii*, TEMPERLI⁷² fit des essais dans nos laboratoires avec la prométryne, la prométone, l'atrazine et la simazine, à des concentrations allant de 10-160 ppm. Le taux spécifique de fixation de l'azote ne fut pas modifié. L'oxydation de l'ammoniaque en nitrite et en nitrate, effectuée par *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* ne semble pas être fortement modifiée et serait même légèrement stimulée dans certains cas par les triazines⁷³⁻⁷⁵. Toutefois, FARMER, BENOÎT et CHAPPELL⁷⁶, dans des expériences de perfusion dans le sol, observèrent une action inhibitrice de la simazine sur l'utilisation de l'ammoniaque, à des concentrations de 6-9 ppm, alors que des cultures pures de *Nitrosomonas* n'étaient pas influencées. Le taux d'oxydation du nitrite par *Nitrobacter* était diminué en présence de 6 ppm de simazine. Une inhibition semblable fut observée dans des essais en plein champ par KELLER⁷³. Tout récemment, BARTHA, LANZILOTTA et PRAMER⁷⁷ publièrent le résultat de leurs recherches sur la stabilité et les effets de quelques pesticides dans le sol: ils ne constatèrent aucune dépression de la nitrification après l'application de simazine et une légère inhibition avec l'atrazine. Il est

intéressant de noter que l'évolution du CO₂ du sol fut stimulée par la simazine.

Les triazines peuvent également exercer quelque influence sur les espèces *Rhizobium*. SZABO et AVROV^{78,79} ont mentionné une diminution du nombre et du diamètre des nodules des racines chez le pois. Cependant le poids des plantes traitées était plus élevé que celui des contrôles. Par contre, sous d'autres conditions expérimentales, une stimulation de la formation des nodules a été observée par RANKOV et al.⁸⁰.

Les mycorhizes ectotrophes de *Picea abies* et de *Pinus silvestris* sont influencées positivement par la simazine^{81,82}, ce qui contribuerait à la croissance plus vigoureuse et au meilleur état de santé, observés chez les plantes ligneuses traitées par la simazine.

(3) Rôle de certains facteurs dans la sélectivité des herbicides à base de triazines

Divers mécanismes peuvent être responsables de la résistance d'un organisme végétal à un herbicide: métabolisme de l'herbicide avec détoxification simultanée; absence de transport à l'intérieur de la plante jusqu'aux centres où l'action herbicide pourrait s'exercer; faible absorption par les racines, etc. Dans le cas particulier des triazines, les premières études sur de nombreuses espèces végétales ont clairement démontré que les différences d'absorption et de transport ne suffisaient pas à rendre compte de la sélectivité.

Mentionnons tout d'abord un mécanisme particulier de détoxification qui peut expliquer en partie la résistance du coton aux triazines symétriques. Il ne semble pas que le coton puisse dans une large mesure métaboliser et dégrader la molécule d'ipazine ou de

⁶³ S. SAWAMURA, Cytologia 30, 325 (1965).

⁶⁴ W. B. BOLLEN, A. Rev. Microbiol. 15, 69 (1961).

⁶⁵ C. J. HARRIS, D. D. KAUFMAN, T. J. SHEETS, R. G. NASH et P. C. KEARNEY, en préparation.

⁶⁶ H. C. SIKKA, R. W. COUCH, D. E. DAVIS et H. H. FUNDERBURK, Proc. sth. Weed Conf. 18, 616 (1965).

⁶⁷ G. PANTOS, P. GYURKÓ, T. TAKÁČZ et L. VARGA, Acta agron. hung. XIII, Fasc. 1-2 (1964).

⁶⁸ E. I. KOZLOWA, Agrobiologiya 2, 271 (1964).

⁶⁹ J. POCHON, P. TARDIEUX et M. CHARPENTIER, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 250, 1555 (1960).

⁷⁰ J. GUILLEMAT, M. CHARPENTIER, P. TARDIEUX et J. POCHON, Annls Épiphyt. 11, 262 (1960).

⁷¹ J. GUILLEMAT, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 250, 1343 (1960).

⁷² A. TEMPERLI, Dépt. Recherches Produits antiparasit., Geigy, Bâle, résultats non publiés.

⁷³ T. KELLER, Mitt. schweiz. Anst. forstl. VersWes. 37, 401 (1961).

⁷⁴ K. STEINBRENNER, F. NAGELITSCH et I. SCHLICHT, Albrecht-Thaer-Arch. 4, 611 (1960).

⁷⁵ V. I. SMIRNOVA, Agrobiologiya, 88 (1963).

⁷⁶ F. H. FARMER, R. E. BENOÎT et W. E. CHAPPELL, Proc. N-East Weed Control Conf. 19, 350 (1965).

⁷⁷ R. BARTHA, R. P. LANZILOTTA et D. PRAMER, Appl. Microbiol. 15, 67 (1967).

⁷⁸ I. SZABO, Mosonmagy. agrartud. Föisk. Közl. 6, 26 (1964).

⁷⁹ O. E. AVROV, Dokl. vses. Akad. sel'.-khoz, Nauk. 16 (1966).

⁸⁰ V. RANKOV, E. ELENKOV, P. SURLEKOV et B. VELEV, Agrochimika 115 (1966).

⁸¹ S. K. UHLIG, Arch. Forstw. 15, 463 (1966).

⁸² S. K. UHLIG, Wiss. Z. tech. Univ. Dresden 15, 639 (1966).

prométryne^{83,84}. Après traitement par des triazines marquées au ¹⁴C, les autoradiogrammes témoignent d'une accumulation de la radioactivité dans les glandes lysigènes des racines, des tiges et des feuilles, alors que dans les graines on ne trouve pas de produits radiomarqués. L'analogue hydroxylé n'est pas accumulé. On pense, d'après des travaux sur du coton avec glandes et sur des variétés génétiquement sans glande, que les glandes en question jouent le rôle de dépôts éliminant la substance phytotoxique du protoplasme en la liant par formation d'un complexe irréversible⁸⁵.

Le maïs tolère remarquablement bien la simazine et l'atrazine. On pense, d'après les études de plusieurs chercheurs, que dans le maïs et, à des degrés variables dans d'autres plantes, les chlorotriazines sont transformées en hydroxy-2-triazine correspondante⁸⁶⁻⁸⁸. Les composés hydroxy-2 ne sont pas phytotoxiques, de sorte que cette transformation constitue un mécanisme de détoxification. On peut également observer la formation des hydroxytriazines in vitro en présence de jus de presse de jeunes plants de maïs^{89,90}.

ROTH et KNÜSLI⁹¹ ont démontré que la dihydroxy-2,4-methoxy-7-benzoxazine-1,4-one-3 était le système non enzymatique responsable de cette conversion. VIRTANEN et ses collaborateurs^{92,93} ont montré que les dérivés de la benzoxazinone sous la forme de glucoside étaient des constituants ordinaires du maïs, du seigle et du blé. Le mécanisme de cette réaction n'a pas été élucidé. Les groupes *N*-hydroxy et carbonyl en position ortho sont indispensables à l'action d'un composé. Ce fait est illustré par une substance de synthèse, la *N*-hydroxyphthalimide, qui déchlorure les chlorotriazines également⁹⁴.

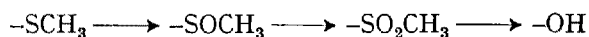
La portée physiologique de ce mécanisme est encore indéterminée, car certaines plantes résistantes à la simazine ne semblent pas contenir de benzoxazinone. Selon ROTH⁸⁹ c'est le cas pour *Imperata cylindrica*, d'où l'on a pu isoler des quantités considérables de simazine, alors qu'aucun symptôme de toxicité n'était visible⁶. HAMILTON⁹⁵ fit une étude intéressante avec des lignées pures de maïs. L'une des lignées était caractérisée par une teneur en benzoxazinone 8 fois moindre qu'une autre lignée. Toutefois, la différence de résistance à la simazine entre les 2 hybrides était assez faible. PALMER et GROGAN⁹⁶ ont obtenu des résultats similaires.

D'autres plantes, par contre, telles les plantules de seigle et de blé, contiennent le glucoside du dérivé de la benzoxazinone et sont cependant sensibles à l'herbicide^{92,93}. HAMILTON⁹⁷ démontra, dans des expériences sur plusieurs espèces de graminées, que la déchloruration qui s'opère dans les racines est liée à la teneur en benzoxazinone, alors que ce n'est pas le cas pour leur tolérance à l'atrazine.

Les méthoxytriazines telles que la prométryne ne sont détoxifiées que lentement dans le système benzoxazinone, et les méthylthiotriazines telles que la pro-

métryne ne sont pas détoxifiées du tout (MÜLLER⁹⁸). Ces 2 herbicides étant cependant transformés dans les plantes en leurs analogues hydroxylés, d'autres mécanismes doivent entrer en jeu.

Pour les méthylthiotriazines, un processus d'oxydation⁹⁹ avec formation, respectivement, d'un sulfoxyde et (ou) d'une sulfone a été proposé:



Ces 2 produits d'oxydation sont très instables lorsqu'ils sont soumis à la scission hydrolytique, de sorte qu'ils pourraient être des étapes intermédiaires du métabolisme végétal. Chez *Vicia faba* ayant reçu de la prométryne radiomarquée par le ¹⁴C dans le noyau triazinique, on a séparé 2 métabolites correspondant à la sulfone et probablement au sulfoxyde. Après hydrolyse de ces composés, il se forma de l'hydroxypropazine¹⁰⁰. Le taux d'hydrolyse, exprimé en période de demi-dégradation du composé dans un milieu donné, a été déterminé pour la prométryne et ses produits d'oxydation dans HCl 0,1 *N*. Ces périodes sont de 22 jours pour la prométryne, de 96 min pour le sulfoxyde et de 16 min pour la sulfone. Pour ces 3 composés, l'hydrolyse donne de l'hydroxypropazine. Le sulfoxyde et la sulfone ont été préparés dans nos laboratoires par oxydation de la prométryne au moyen d'acide monoperphthalique¹⁰¹. L'oxydation du groupe méthylthio de la prométryne a aussi été réalisée dans le système peroxydase-dihydroxyfumarate en atmosphère d'oxygène, selon le procédé de MASON¹⁰². On peut prendre en considération l'existence de tels systèmes dans les plantes supérieures capables de détoxifier les herbicides triaziniques. De nombreux chercheurs ont d'ailleurs étudié le rôle joué par les enzymes d'oxydation dans la résistance de diverses plantes aux triazines. ROTH⁸⁹ note que les plantes qu'il a examinées et qui étaient sensibles à la simazine, manifestaient une plus grande

⁸³ R. H. HAMILTON et D. E. MORELAND, Weeds 11, 213 (1963).

⁸⁴ D. C. WHITENBERG, Weeds 13, 68 (1965).

⁸⁵ C. L. FOY, Pl. Physiol. 37, Suppl. 25 (1962).

⁸⁶ M. MONTGOMERY et V. H. FREED, J. agric. Fd Chem. 12, 11 (1964).

⁸⁷ P. CASTELFRANCO, C. L. FOY et D. B. DEUTCH, Weeds 9, 580 (1961).

⁸⁸ N. S. NEGI, H. H. FUNDERBURK et D. E. DAVIS, Weeds 12, 53 (1964).

⁸⁹ W. ROTH, Thèse, Université de Strasbourg, (1958).

⁹⁰ W. ROTH, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 245, 942 (1957).

⁹¹ W. ROTH et E. KNÜSLI, Experientia 17, 312 (1961).

⁹² A. I. VIRTANEN et P. K. HIETALA, Acta. chem. scand. 14, 499 (1960).

⁹³ O. WAHLROSS et A. I. VIRTANEN, Acta. chem. scand. 13, 1906 (1959).

⁹⁴ P. W. MÜLLER et P. H. PAYOT, Dépt. Recherches Produits antiparasit. Geigy, Bâle, résultats non publiés.

⁹⁵ R. H. HAMILTON, Weeds 12, 27 (1964).

⁹⁶ R. D. PALMER et C. O. GROGAN, Weeds 13, 219 (1965).

⁹⁷ R. H. HAMILTON, Agr. and Food Chem. 12, 14 (1964).

⁹⁸ P. W. MÜLLER, Dépt. Recherches Produits antiparasit. Geigy, Bâle, résultats non publiés.

⁹⁹ H. GYSIN, Chém. Ind. 1393 (1962).

¹⁰⁰ P. W. MÜLLER et P. H. PAYOT, Proc. IAEA Symp. Vienna 1965, Isotopes in Weed Research, 61 (1966).

¹⁰¹ E. KNÜSLI, Proc. 7th Br. Weed Control Conf. 287 (1964).

¹⁰² D. R. BUHLER et H. S. MASON, Arch. Biochem. Biophys. 92, 424 (1961).

activité de catalase que les plantes résistantes, alors que les plantes tolérantes à des degrés divers, montraient une plus grande activité de peroxydase.

Ce point est sujet à controverse. Nous avons déjà mentionné les travaux de EASTIN, PALMER et GROGAN^{96,103}. Ils observèrent une diminution significative de l'activité de la catalase dans une lignée pure de maïs sensible à l'atrazine et une augmentation de cette activité dans une lignée résistante¹⁰³. L'activité de la peroxydase dans la lignée résistante se montra également plus grande que l'activité dans la lignée sensible. Ces observations concordent avec celles de FUNDERBURK et DAVIS¹⁰⁴. Chez 8 espèces végétales possédant des degrés divers de résistance et de sensibilité à l'atrazine, l'activité de plusieurs oxydases diminua en général 7 et 11 jours après le traitement. Mentionnons encore que les chercheurs russes VOLOVİK et PONOMAROV¹⁰⁵ estiment que la grande activité de la peroxydase est une des causes de la résistance du maïs à la simazine.

Un groupe de chercheurs américains du Département de l'Agriculture a découvert un mode de dégradation fondamentalement différent au cours de leurs études sur les micro-organismes telluriques. KEARNEY, KAUFMAN et SHEETS¹⁰⁶ constatèrent la formation d'un métabolite *N*-déalkylé, la chloro-2-amino-4-éthylamino-6-sym.-triazine, dans des cultures pures de *Aspergillus fumigatus*. Dans ces travaux, les auteurs utilisèrent de la simazine radiomarkée par le ³⁶Cl. Ils isolèrent un second métabolite radioactif avec le noyau triazinique intact mais sans substituants alkylés. Après cette première étape du processus de dégradation, il pourrait y avoir une deuxième déalkylation des substituants en position 4 ou 6, puis hydrolyse du substituant en position 2, ce qui donnerait de l'amméline, de l'ammélide ou de l'acide cyanurique, constituant naturel du sol¹⁰⁷.

On trouva plus tard les preuves d'une dégradation semblable dans des études faites sur des plantes. Dans nos propres expériences avec la prométryne sur le pois, nous avons obtenu des résultats basés sur la chromatographie sur couche mince montrant qu'une déalkylation de l'une des chaînes latérales était le premier stade de la dégradation (MÜLLER et PAYOT¹⁰⁸). SHIMABUKURO, KADUNCE et FREAR¹⁰⁸ isolèrent par chromatographie en phase gazeuse et identifièrent par spectroscopie IR la chloro-2-amino-4-isopropylamino-6-sym.-triazine comme étant le principal métabolite de l'atrazine chez le pois adulte. D'autres preuves expérimentales sur l'existence d'une déalkylation sont apportées par les travaux de HURTER¹⁰⁹. Utilisant la méthode de chromatographie sur échangeurs d'ions décrite par PLAISTED et THORNTON¹¹⁰, HURTER montra la présence de plusieurs métabolites polaires dans l'extrait éthanolique de *Coix lacryma* traité avec de la simazine marquée au ¹⁴C dans l'hétérocycle. Trois de ces métabolites correspondent à l'hydroxysimazine,

l'hydroxy-2-amino-4-éthylamino-6-sym.-triazine et à l'amméline.

Se fondant sur les résultats d'expérience avec des triazines marquées au ¹⁴C dans le noyau, où les plantes traitées produisaient du CO₂ radioactif, GYSIN et KNÜSLI⁶ proposèrent une suite de réactions conduisant de l'hydroxysimazine au CO₂. MONTGOMERY et FREED⁸⁶ émettent l'hypothèse que la dégradation du noyau triazinique donnerait naissance à une biguanide substituée qui serait ensuite hydrolysée en biuret correspondant ou en guanidine substituée et en dérivé uréique. Ils séparèrent par chromatographie d'extraits de maïs traité par la propazine, marquée par le ¹⁴C dans le noyau triazinique deux métabolites dont les R_f ressemblaient à ceux des biguanide et biuret substitués.

En conclusion, les dérivés triaziniques doués d'activité biochimique, avec leurs diverses propriétés chimiques et physiques, offrent dans leurs interactions avec les mécanismes du métabolisme végétal une image intéressante de la sélectivité, aux nombreuses répercussions pratiques.

Summary. The triazine herbicides are potent inhibitors of the HILL reaction, resembling the phenylureas, acylanilides and carbamates. The inhibition of the photosynthesis by the triazines is the most obvious explanation for their mode of action in plant metabolism. Besides this there are also effects on light independent reactions where the effective concentrations are higher than those inhibiting the photosynthesis. Particularly, a positive influence of the triazines on the uptake of the nutrients by the roots was noted. Changes in the nitrogen metabolism of the plants, due to increased uptake of nitrate from the medium, result in a higher content of organic nitrogen in the plants.

Several enzyme systems in plants and in micro-organisms are influenced by the triazine herbicides. Until now, the mechanism of action has not been elucidated.

Concerning the phenomenon of the selectivity of the triazine herbicides, several factors may be responsible. The different abilities of the plant species to metabolize the herbicide and to translocate it to the active centres in the cells are significant from the biochemical point of view.

¹⁰³ E. F. EASTIN, R. D. PALMER et C. O. GROGAN, *Weeds* 12, 64 (1964).

¹⁰⁴ H. H. FUNDERBURK et D. E. DAVIS, *Weeds* 11, 101 (1963).

¹⁰⁵ O. G. VOLOVİK et G. S. PONOMAR'OV, *Pitannya Eksperim. Botan. Akad. Nauk. Ukr. RSR., Inst. Botan.* 48 (1964).

¹⁰⁶ P. C. KEARNEY, D. D. KAUFMAN et T. J. SHEETS, *J. agric. Fd Chem.* 13, 369 (1965).

¹⁰⁷ E. H. WALTERS et L. E. WISE, *J. Am. chem. Soc.* 39, 2472 (1917).

¹⁰⁸ R. H. SHIMABUKURO, R. E. KADUNCE et D. S. FREAR, *J. agric. Fd Chem.* 14, 392 (1966).

¹⁰⁹ J. HURTER, *Experientia* 22, 741 (1966).

¹¹⁰ P. H. PLAISTED et M. L. THORNTON, *Contr. Boyce Thomson Inst. Pl. Res.* 22, 399 (1964).