

MARIA RAPHAELA MUSUMECI
Bióloga
Bioquímica Fitopatológica
Instituto Biológico - São Paulo
Bolsista do CNPq

ACÚMULO DE FENÓIS E FITOALEXINAS NOS TECIDOS DE LARANJEIRA
AZEDA E LARANJEIRA DOCE APÓS INOCULAÇÃO COM
PHYTOPHTHORA CITROPHTHORA

Tese apresentada à Universidade
Estadual de Campinas para a ob-
tenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientador - Prof.Dr.
AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Campinas - 1974

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos àqueles que pela orientação, incentivo, fornecimento de material, auxílio, sugestões ou revisão dos originais concorreram efetivamente para a execução e apresentação desta Tese.

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Welkyria B.C. Moraes
Instituto Biológico

Bióloga Elza Maria Frias Martins
Instituto Biológico

Eng^a. Agr^a. Ednei de Conti
Instituto Biológico

Dra. Victoria Rossetti
Instituto Biológico

Dr. Mario Barreto Figueiredo
Instituto Biológico

Eng^a. Agr^a. Rosa Maria Gayoso
Instituto Biológico

Eng^o. Agr^o. Orchisio O. T. Mello
Instituto Biológico

Dr. Alvaro Santos Costa
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. Caio O. Nogueira Cardoso
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Dr. Irineu J. B. Camargo
Universidade Estadual de Campinas

Eng^o. Agr^o. Domingos Oliveira
Instituto Biológico

Dr. Adolpho Martins Penha
Instituto Biológico

Eng^o. Agr^o. Aluísio P. C. Alba
Instituto Biológico

Srta. Erna Elizabeth Bach
Instituto Biológico

Sra. Cecília Abeid Teixeira
Instituto Biológico

Sr. Paulo Palazzo e funcionários da Seção de Museus
e Exposições
Instituto Biológico

Sra. Juventina dos Santos e funcionários da Seção
de Desenho
Instituto Biológico

Eng^o. Agr^o. Joaquim Teófilo Sobrinho e funcionários
da Estação Experimental de Citricultura de Cordeirópolis
Instituto Agrônômico de Campinas

Sr. Waldomiro Siqueira Junior da Seção de Documentação
Instituto de Medicina Tropical - USP

Sra. Lucia Moreira de Oliveira

^e
Sr. Raul Ginjo da Seção de Documentação
Faculdade de Medicina - USP

Sra. Edith Mackrodt

Demais funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica
do
Instituto Biológico

Í N D I C E

	PAG.
I. Siglas e abreviações	I
II. Relação das tabelas	III
III. Relação das figuras	V
 1. <u>INTRODUÇÃO</u>	 1
 2. <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	 3
 3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	 11
3.1 - Plantas	11
3.2 - Fungos	11
3.3 - Inoculação	11
3.4 - Extração, cromatografia, espectro fotometria e hidrólise	15
3.5 - Bioensaios	18
 4. <u>RESULTADOS</u>	 21
4.1 - Observações decorrentes da inocu- lação com <u>P.citrophthora</u> nos teci- dos destacados das plantas e ino- culados segundo a Técnica 1	21
4.2 - Análise dos cromatogramas de ex- tratos de tecidos destacados das plantas e inoculados com <u>P.citro-</u> <u>phthora</u> segundo a Técnica 1	24
4.3 - Cromatografia dos extratos de te- cidos destacados das plantas e i- noculados com <u>P.citrophthora</u> se- gundo a Técnica 2	26
4.4 - Espectrofotometria de absorção à luz ultravioleta dos extratos de tecidos inoculados com <u>P.citroph-</u> <u>thora</u> segundo a Técnica 1	26
4.5 - Total de fenóis nos extratos de ramos e cascas de LA e LD não ino- culadas e inoculadas com <u>P.citro-</u> <u>phthora</u>	32

4.6 - Observações decorrentes da inoculação com <u>P.parasitica</u> , <u>P.cinnamomi</u> , <u>P. infestans</u> e <u>C.paradoxa</u> nos tecidos destacados das plantas e inoculados segundo a Técnica 1	35
4.7 - Análise dos cromatogramas de extratos de tecidos inoculados com <u>P.parasitica</u> , <u>P.cinnamomi</u> , <u>P.infestans</u> e <u>C. paradoxa</u> , segundo a Técnica 1	37
4.8 - Análise dos cromatogramas de extratos de tecidos das plantas inoculadas com <u>P.citrophthora</u> segundo a Técnica 2	37
4.9 - Bioensaios com <u>P.citrophthora</u>	38
4.10- Bioensaios com fungos patogênicos e não patogênicos	54
4.11- Características do composto 1	54
 5. <u>DISCUSSÃO</u>	 61
6. <u>CONCLUSÕES</u>	74
7. RESUMO	75
8. <u>SUMMARY</u>	79
9. <u>LITERATURA CITADA</u>	82

I. SIGLAS E ABREVIACÕES

A	- água
AcA	- ácido acético:água (15:85)
ACf	- ácido cafeico
ACl	- ácido clorogênico
ApC	- ácido p-cumárico
A 3,4-DMC	- ácido 3,4-dimetoxioinâmico
BACa	- butanol:ácido acético:água (4:1:5)
BDA	- batata-dextrose-ágar
BE	- benzeno:éter (80:20)
C	- casca
C ₁	- composto 1
C ₂	- composto 2
DE ₅₀	- dose efetiva de inibição
DO	- densidade ótica
h	- horas
I	- inoculada
L	- lenho
LA	- laranjeira azeda
LAC	- cascas de laranjeira azeda não inoculadas
LACI	- cascas de laranjeira azeda inoculadas
LAL	- lenho de laranjeira azeda não inoculado
LALI	- lenho de laranjeira azeda inoculado
LAR	- ramos de laranjeira azeda não inoculados
LARI	- ramos de laranjeira azeda inoculados
LD	- laranjeira doce
LDC	- cascas de laranjeira doce não inoculadas
LDCI	- cascas de laranjeira doce inoculadas
LDL	- lenho de laranjeira doce não inoculado
LDLI	- lenho de laranjeira doce inoculado
LDR	- ramos de laranjeira doce não inoculados
LDRI	- ramos de laranjeira doce inoculados

min - minutos

R - ramos

UV - ultravioleta

II. RELAÇÃO DAS TABELAS

TABELA N°		PAG.
I	Fungos utilizados nos experimentos	12
II	Sistemas de solventes utilizados para separação das substâncias nos extratos etanólicos dos tecidos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD)	17
III	Ação, no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u> , dos extratos de cascas (C) de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculadas e inoculadas (I) com <u>P. citrophthora</u>	40
IV	Ação, no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u> , dos extratos de ramos (R) de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculadas e inoculadas (I) com <u>P. citrophthora</u>	43
V	Ação das substâncias do extrato de casca (C) de laranjeira azeda inoculada (LACI-72 h), separadas por cromatografia em sílica, no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u>	45
VI	Ação das substâncias do extrato de ramos de laranjeira azeda inoculada (LARI-72 h), separadas por cromatografia em sílica, no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u>	51
VII	Ação das substâncias do extrato de ramos de laranjeira doce inoculada (LDRI-72 h), separadas por cromatografia em sílica, no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u>	53
VIII	Efeito de diferentes concentrações do "composto 1" (C ₁) no crescimento micelial de <u>P. citrophthora</u>	55

TABELA Nº

PAG.

IX	Ação, das substâncias do extrato de casca (C) de laranjeira azeda inoculada (LACI-72 h), no crescimento micelial de fungos patogênicos e não patogênicos	56
X	Valores de Rf do "composto 1" (C ₁), ácido cafeíco (ACf), ácido clorogênico (ACl) e ácido 3,4-dimetoxicinâmico (A 3,4-DMC)	58

III. RELAÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA Nº		PAG.
1	Tecidos inoculados segundo a Técnica 1 e a Técnica 2	14
2	Lenho, casca e ramo de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados (a) e inoculados (b) com <u>P.citrophthora</u>	22,23
3	Cromatofolha de sílica com extratos (100µl) de tecidos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados e inoculados com <u>P.citrophthora</u>	25
4	Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de ramos de laranjeira azeda (LA) não inoculados (LAR-0 h, LAR-72 h) e inoculados (LARI-72 h) com <u>P.citrophthora</u>	28
5	Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de ramos de laranjeira doce (LD) não inoculados (LDR-0 h, LDR-72 h) e inoculados (LDRI-72 h) com <u>P.citrophthora</u>	29
6	Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de casca de laranjeira azeda (LA) não inoculadas (LAC-0 h, LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h) com <u>P.citrophthora</u>	30
7	Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de casca de laranjeira doce (LD) não inoculadas (LDC-0 h, LDC-72 h) e inoculadas (LDCI-72 h) com <u>P.citrophthora</u>	31
8	Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de lenho de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados (LAL-0 h, LAL-72 h, LDL-0h, LDL-72 h) e inoculados (LALI-72 h, LDLI-72 h) com <u>P.citrophthora</u>	33
9	Total de fenóis em ramos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados e inoculados com <u>P.citrophthora</u>	34

FIGURA Nº

PAG.

10	Total de fenôis em cascas de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculadas e inoculadas com <u>P. citrophthora</u>	36
11	Crescimento micelial de <u>P.citrophthora</u> em extratos de cascas e ramos de laranjeira azeda e laranjeira doce não inoculadas e inoculadas com <u>P.citrophthora</u>	39
12	Efeito dos extratos de cascas de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) no crescimento de <u>P.citrophthora</u>	41
13	Efeito dos extratos dos ramos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) no crescimento de <u>P.citrophthora</u>	44
14	Crescimento de <u>P.citrophthora</u> nos eluídos da cromatofolha com extrato de casca de laranjeira azeda (LACI) e nos eluídos das cromatofolhas com extratos de ramos de laranjeira azeda (LARI) e laranjeira doce (LDRI)	46
15	Ação das substâncias do extrato de casca de laranjeira azeda inoculada (72h), separadas pela cromatografia em placas de sílica, no crescimento micelial de <u>P.citrophthora</u>	47
16	Espectro de absorção ao ultravioleta dos eluídos da faixa 1 das cromatofolhas com extratos de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h)	49
17	Espectro de absorção ao ultravioleta dos eluídos da faixa 3 das cromatofolhas com extratos de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h)	50
18	Ação das substâncias dos extratos de ramos inoculados de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD), separadas pela cromatografia em sílica, no crescimento micelial de <u>P.citrophthora</u>	52

FIGURA Nº

PAG.

19	Crescimento micelial de <u>C.scoparium</u> , <u>C. lindemuthianum</u> , <u>H.carbonum</u> , <u>Pythium</u> sp, <u>P.cinnamomi</u> , <u>P.infestans</u> e <u>P.parasitica</u> nos eluídos da faixa 1 e faixa 3 (Com - posto 1) da cromatoplace com extrato de LACI-72 h	57
20	Espectro de absorção do "composto 1" (C ₁) ao ultravioleta	60

1. INTRODUÇÃO

A cultura dos citros assume um papel considerável dentro de nossa economia agrícola, constituindo-se numa das mais importantes fontes de divisas para o estado de São Paulo. Diversos problemas interferem na cultura em relação ao aspecto fitossanitário, pois, doenças causadas por fungos, vírus e bactérias constituem fatores limitantes da produção cítrica.

Entre as doenças fúngicas a "gomose" ou "podridão do pé" causa nas plantas afetadas uma degeneração e apodrecimento da casca do tronco, podendo a podridão progredir para as raízes. As células doentes produzem uma goma que exuda das lesões escorrendo pelo tronco ou formando incrustações. A "gomose" é causada por fungos do gênero Phytophthora sendo: P. citrophthora (Sm e Sm) Leoniam e P. parasitica (Dest), os mais importantes. Todavia são também mencionados P. cactorum (Leh e Cohn) Schoret, P. palmivora Butler e P. cinnamomi Rands (GALLI et al., 1968). Estes fungos vivem saprofiticamente no solo, atacando a planta quando as condições se tornam favoráveis. Alta umidade ao redor do tronco, a existência de ferimentos ocasionados por implementos agrícolas, o acúmulo de matéria orgânica na periferia do tronco e temperaturas próximas ao ótimo de crescimento dos fungos estão entre os fatores que propiciam a infecção. Esta pode, também, ocorrer na ausência de ferimentos, principalmente se o solo umedecido e contaminado estiver em contato com a casca de variedades suscetíveis por um tempo prolongado. Após a penetração pelos tecidos da casca do hospedeiro, o fungo se aloja nos vasos liberianos prejudicando, assim, o transporte da seiva elaborada.

As espécies cítricas diferem em sua suscetibilidade à doen-

ça, sendo as laranjeiras doces (Citrus sinensis Osbeck) e o limão Cravo (Citrus reticulata Blanco) os mais suscetíveis, as laranjeiras azedas (Citrus aurantium L.) resistentes (ROSSETTI, 1947) e Trifoliata (Poncirus trifoliata Raf.) imune ao fungo.

O uso de variedades resistentes é um dos métodos empregados para reduzir a incidência de certas doenças. Estudos vem se desenvolvendo nos últimos 30 anos procurando relacionar a resistência das plantas aos patógenos com os fenômenos bioquímicos que ocorrem na interação parasita-hospedeiro. Em consequência dessas pesquisas pretende-se explicar, em parte, a resistência pela presença de compostos fungitóxicos pré-existentes na planta ou sintetizados pelos tecidos após a infecção.

O desenvolvimento deste trabalho de tese visou dar uma contribuição aos estudos sobre a resistência de certas espécies cítricas à gomose, pesquisando compostos fungitóxicos sintetizados ou acumulados nos tecidos de laranjeira azeda e laranjeira doce em resposta à inoculação com fungos patogênicos e não patogênicos. Esses compostos foram submetidos a métodos de análise como cromatografia e espectrofotometria ao ultravioleta. O significado desses compostos no mecanismo de resistência à gomose foi avaliado por bioensaios.

O fungo P.citrophthora é um dos patógenos comumente relatado em nosso meio e foi escolhido como modelo para verificação dos fenômenos observados, por ser mais estável no que se refere a patogenicidade, quando mantido em meio de cultura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

WALKER (1923) associou a pigmentação vermelha ou amarela das escamas dos bulbos de cebola (Allium cepa L.) com a resistência das mesmas ao fungo Colletotrichum circinans (Berk.) Vogl. LINK et al. (1929), ANGELL et al. (1930), LINK e WALKER (1933), verificaram que esses pigmentos são flavonas e antocianinas que ocorrem juntamente com os fenóis simples - o ácido protocatechuico e o catecol. Os autores demonstraram que estes fenóis são inibidores da germinação do C. circinans.

Em oposição aos estudos que se referem à presença de substâncias fungitóxicas, como fatores pré-formados de resistência, maior atenção foi dada aos estudos sobre as mudanças metabólicas ocorridas pós-infecção, levando à liberação e acúmulo de substâncias com ação fungitóxica sobre o patógeno.

MULLER et al. (1939) e MULLER e BORGER (1939, 1940) após estudarem as respostas que se seguiram a inoculação de tubérculos de variedades de batata (Solanum tuberosum L.) com variantes virulentos e avirulentos de Phytophthora infestans (Mont.) de By, verificaram a produção de um composto químico com propriedades fungitóxicas, desenvolvido apenas quando as células vivas do hospedeiro eram invadidas pelo parasita. Estabeleceu-se um conceito sobre certas substâncias que foram denominadas por MULLER (1956) "FITOALEXINAS" e definidas por ele como "antibióticos produzidos pelo resultado da interação de dois sistemas metabólicos diferentes: hospedeiro e parasita". Essas substâncias inibem o crescimento de microrganismos fitopatogênicos. Segundo as conclusões apresentadas, as fitoalexinas são substâncias não específicas em sua toxicidade aos fungos, porém, as diferentes espécies de fungos podem variar em sua sensibilidade às mesmas. A resposta básica à infecção que ocorre nos hospedeiros resistentes e susce

tíveis é a mesma, porém a base da diferenciação está na velocidade da resposta do hospedeiro resistente e do suscetível em formar tais fitoalexinas. A reação de defesa é confinada ao tecido invadido pelo fungo e às células vizinhas.

KUC' (1972) propôs um significado mais amplo ao termo fitoalexina, que seria aplicado a todos os compostos que contribuem para a resistência às doenças, sejam eles desenvolvidos em resposta a lesão mecânica, a estímulos fisiológicos, à presença de agentes infecciosos, ou aos produtos de tais agentes.

HIURA (1943) isolou de raízes de batata doce (Ipomoea batatas Lam.) infectadas com Ceratocystis fimbriata Ell & Halst, a "IPOMEAMARONA". O significado dessa substância, como composto fungitóxico produzido após infecção, foi relatado por URITANI et al. (1954) e URITANI e AKAZAWA (1955). Esse composto se acumulou nas raízes das variedades resistentes inoculadas, inibindo o crescimento "in vitro" de C.fimbriata.

GAUMANN et al. (1950) relataram as reações ocorridas como resultados da interação entre Rhizoctonia repens G. Bernard e o tecido de pseudobulbos de orquídea (Orchis militaris L.). A substância não foi produzida quando um grande número de fungos saprófitas ou parasitas de solo foram empregados como inóculo. GAUMANN e KERN (1959) detectaram essa substância nos pseudobulbos 48 horas após a inoculação. Também as raízes infectadas sintetizaram essa substância, porém em concentração inferior à encontrada no tecido do pseudobulbo infectado. Posteriormente, GAUMANN et al. (1960) isolaram essa toxina, que passou a ser conhecida como "ORCINOL".

Na soja (Glycine max (L.)Merr.), UEHARA (1958) relatou o acúmulo de compostos fungitóxicos em vagens inoculadas com

quatro fungos não patogênicos a essa planta. KLARMAN e GEDERMANN (1963) mostraram que folhas de variedades de soja resistentes à Phytophthora sojae Kauf & Gerd, desenvolveram, após a inoculação um composto fungitóxico a esse fungo. BIEHN, KUC* e WILLIAMS (1968) relataram o acúmulo de fenóis em "seedlings" etiolados de soja inoculados com o fungo - Helminthosporium carbonum Ullstrup, Após o período de 24 horas, decorrente da inoculação com H.carbonum, o total de fenóis aumentou de quatro a cinco vezes em relação ao teor de fenóis dos "seedlings" não inoculados. Os mesmos fenóis se acumularam quando "seedlings" de soja foram inoculados com Monilinia fructicola (Wint) Honey, Trichoderma viride Pers. e Fr. e Alternaria sp., havendo um acúmulo maior após inoculação com Alternaria sp., BIEHN, WILLIAM e KUC' (1968) constataram que um desses fenóis se acumulou em quantidade suficiente para inibir 70 a 90% o crescimento do H.carbonum. Posteriormente, KEEN et al. (1971) identificaram esse inibidor como a "6-a-HIDROXI-FASEOLINA", a fitoalexina dos hipocótilos de soja.

A partir de discos de cenoura (Daucus carota L.), inoculados com Ceratocystis fimbriata fungo não patogênico à cenoura, CONDON e KUC' (1960) isolaram uma "ISOCUMARINA". Esse composto foi detectado em níveis fungitóxicos, 24 horas após a inoculação com diversos fungos não patogênicos à cenoura. HERNDON et al. (1966) verificaram que em raízes intactas de cenoura inoculadas com C.fimbriata, houve acúmulo da isocumarina na casca, 72 horas após a inoculação. Esses autores relataram que esporos de C.fagacearum (Bertz), C. pilifera (Fr.) Moreau e C.coerulescens (Munch) Bakshi, que não germinaram no tecido de cenoura, não estimularam o acúmulo do ácido clorogênico e da isocumarina. O acúmulo de isocumarina foi verificado com sete isolados de C.fimbriata em cinco variedades de cenoura. SONDHEIMER (1957), verificou que o

frio produz o acúmulo dessa substância e CONDON et al. (1963) demonstraram que a isocumerina pode também ser induzida por agentes químicos.

Do tecido do endocarpo de vagens de ervilha (Pisum sativum L.), destacadas e inoculadas com um fungo não patogênico - Monilinia fructicola (Wint) Honey, CRUICKSHANK e PERRIN (1960, 1961) isolaram a "PISATINA". CRUICKSHANK (1962) verificou que a pisatina é um antibiótico fraco de amplo espectro. A pisatina foi produzida em igual concentração para o patógeno Ascochyta pisi Lib. e para o não patógeno M. fructicola. Ensaios da ação dessa substância "in vitro", sobre esses fungos, mostraram que a concentração necessária para inibir completamente a germinação de M. fructicola reduziu de apenas 25% a germinação de A. pisi. CRUICKSHANK e PERRIN (1963a) verificaram que a pisatina não é formada como resultado de danos mecânicos e que esse composto se acumulou no endocarpo de vagens de ervilha em resposta a inoculação com 18 fungos. CRUICKSHANK e PERRIN (1965) afirmaram que a formação de pisatina por 58 cultivares de ervilha seguida à inoculação por M. fructicola é uma evidência do papel da pisatina no mecanismo de resistência desta planta às doenças. DE WIT-ELSHOVE (1968, 1969) verificou que a pisatina é degradada por certos fungos patogênicos da ervilha, mas dificilmente por não patógenos, e sugeriu que um mecanismo para a degradação da pisatina determinaria a possibilidade de um organismo parasitar a ervilha. Posteriormente, DE WIT-ELSHOVE e FUCHS (1971) demonstraram que a degradação da pisatina "in vitro" por patógenos da ervilha o Fusarium oxysporum f. psii Sny et Hans e o Mycosphaerella pinodes (Berk et Blox) Stone, foi influenciada pela fonte de carboidrato no meio de cultura.

De vagens destacadas de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.), após inoculação com M. fructicola, CRUICKSHANK e PERRIN (1963b)

isolaram uma substância fungitóxica a qual denominaram "FA-SEOLINA". PIERRE e BATEMAN (1967) constataram a produção da faseolina em "seedlings" de feijoeiro em resposta à infecção ao patógeno Rhizoctonia solani Kuhn. A toxidez da faseolina sobre o patógeno nos testes "in vitro", levou os autores a associarem-na com o mecanismo responsável pela redução do tamanho das lesões no estágio em que as plantas são suscetíveis ao fungo. Esse composto foi também detectado após inoculação de "seedlings" de feijão com outros fungos. O papel da faseolina no mecanismo da resistência varietal de vagens de feijão à antracnose foi evidenciado por RAHE et al. (1969) em suas pesquisas com o Colletotrichum lindemuthianum Sacc. & Magn. A variedade resistente apresentou, 72 horas após a inoculação com o C. lindemuthianum, um nível de faseolina bem maior que o tecido da variedade suscetível. Além da faseolina, outros compostos se acumularam nos tecidos após a inoculação reforçando o conceito de que mais de um composto pode contribuir para a resistência. CARDOSO (1971) relatou um acúmulo de fenóis e a presença de dois compostos com características de fitoalexina em hipocótilos de feijoeiro inoculados com Fusarium solani f. phaseoli (Burk) Syd e Hans.

Diversos compostos fungitóxicos foram relatados em "seedlings" de feijão fava - (Vicia faba L.). PURKAYASTA e DEVERALL (1964, 1965) relataram a produção de fitoalexinas em resposta à inoculação com os patógenos Botrytis cinerea Pers e B. fabae Sard. As lesões causadas por B. cinerea, permaneceram pequenas e limitadas, enquanto que as produzidas por B. fabae se estendem rapidamente através do tecido. Segundo as observações de DEVERALL (1967) o desenvolvimento do tubo germinativo de B. cinerea é inibido na superfície foliar, o que não acontece com B. fabae. DEVERALL e VESSEY (1969) observaram que uma grande quantidade de fitoalexinas se acumu

lou no tecido sadio circundando as lesões de B.fabae, e que apenas traços ocorreram nas partes centrais dessas lesões. Todavia com B.cinerea a maior quantidade de fitoalexinas se acumulou circundando os pontos de infecção. Segundo os autores, a diferença na patogenicidade entre os dois fungos, dependeria de suas habilidades em degradar a fitoalexina. WAIN et al. (1961) e FAWCETT et al. (1968) isolaram, do feijão fava um composto fungitóxico pré-formado, identificado como - "WYERONA". Embora a wyerona seja altamente fungitóxico para alguns não patógenos, ele é menos ativo contra B.cinerea. LETCHER et al. (1971) demonstraram que a wyerona é o metil-ester da fitoalexina do feijão fava - o "ÁCIDO WYERONICO", que é provavelmente o responsável pela inibição de B.cinerea nos tecidos de feijão fava.

BELL (1967) introduziu conídios de Verticillium albo-atrum R. & B. em galhos cortados de algodoeiros (Gossypium hirsutum L. e Gossypium barbadense L.), verificando um acúmulo do "GOSSIPOL" um pigmento normalmente descrito em folhas, galhos e cortex da raiz de diversas variedades de algodão. BELL (1969) observou que após inocular ramos destacados e plantas intactas com diferentes cepas de V.albo-atrum, a síntese do gossipol foi mais alta nas variedades resistentes do que nas suscetíveis, e que esse acúmulo era diretamente relacionado com a virulência da cepa inoculada.

De híbridos de batata A_6 (Solanum tuberosum x S. demissum Lindl.) resistentes à raça zero de P.infestans foi isolado por TOMYIAMA et al. (1968a,b) um novo composto fungitóxico, denominado "RISHITINA". Segundo os autores, a rishitina não foi detectada nos tecidos de tubérculos sadios ou nos extratos de cultura de P.infestans. Os autores infectaram o mesmo híbrido de batata com raças compatíveis e incompatíveis de P.infestans. Apenas traços de rishitina foram de-

tectados em tubérculos de batata cortados e não inoculados, ou nas combinações compatíveis (híbrido suscetível à raça inoculada). Nas combinações incompatíveis (híbrido resistente à raça inoculada) a concentração de rishitina foi de 120mg/kg de peso fresco do tecido. ISHIZAKA et al. (1969) comprovaram o papel inibidor da rishitina no crescimento do fungo. VARNS (1970) e VARNS et al. (1971) demonstraram que a rishitina também se acumulou em resposta a fungos não patogênicos da batata, o Ceratocystis fimbriata e o Helminthosporium carbonum. Os mesmos autores verificaram a formação simultânea de uma outra fitoalexina que denominaram "FITUBERINA".

HIGGINS e MILLAR (1968) verificaram que em folhas destacadas de alfafa (Medicago sativa L.) uma fitoalexina se desenvolveu em resposta à inoculação com dois fungos não patogênicos: Helminthosporium turcicum Pass e Colletotrichum phomoides Sacc. Utilizando fungos patogênicos à alfafa, o Stemphyllium loti Graham e S. botryosum Walli, observaram a formação de fitoalexina apenas em resposta à inoculação com S. loti cuja patogenicidade à alfafa é menor que a do S. botryosum. A concentração da fitoalexina foi menor que a produzida quando da inoculação com os fungos não patogênicos. HIGGINS e MILLAR (1969, 1970) demonstraram que uma fitoalexina foi formada em resposta à infecção aos dois fungos, porém, foi totalmente degradada pelo S. botryosum e em menor proporção pelo S. loti.

ALDWINCKLE (1969) constatou o desenvolvimento de uma substância com características de fitoalexina, em folhas de açafrão (Carthamus tinctorius L.) inoculadas com Phytophthora dreschleri Tucker. Posteriormente, THOMAS e ALLEN (1970) isolaram o "SAFINOL" demonstrando ser este composto a fitoalexina do açafrão.

Uma fitoalexina não identificada foi associada por LIM et al. (1970) na interação do milho com o patógeno Helminthosporium turcicum.

MUSSELL e STAPLES (1971) relataram um composto com características de fitoalexina provavelmente envolvido na resistência do morangueiro (Fragaria vesca L.) à Phytophthora fragariae Hickman.

BROWN e SWINBURNE (1972) verificaram a ação antifúngica do ácido benzóico formado em frutos de maçã (Pirus malus L.) após a infecção com Neotria galligena Bers.

Em citrus não foram constatadas fitoalexinas. Algumas investigações relatam a presença de substâncias fungitóxicas pré-existentes nas variedades resistentes a determinados patógenos. BEN-AZIZ (1967) associou a resistência de variedades de tangerina (Citrus reticulata Bl.) ao fungo Deuterophoma tracheiphila Petri à presença de uma flavona, a "NOBILETINA" existente nas cascas, folhas e frutos da variedade resistente. Essa substância apresentou uma grande atividade fungistática sobre esse fungo. PINKAS et al. (1968) isolaram de folhas de duas variedades de tangerina, quatro flavonas com atividade fungistáticas sobre D. tracheiphila. Dessas quatro flavonas duas foram identificadas como nobiletina e "TANGERITINA" que foram também tóxicas a Fusarium moniliforme Sheldon e Sclerotium rolfsii Sacc.

MUSUMECI et al. (1970) observaram que extratos metanólicos de cascas do tronco de laranjeira azeda, após tratamento pelo carvão, exerceram ação inibidora no crescimento "in vitro" de P. citrophthora.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Plantas

Foram utilizadas plantas de duas espécies cítricas - Citrus aurantium L. (laranjeira azeda) (LA) e Citrus sinensis Osbeck (laranjeira doce) (LD), variedade Caipira, de pomares situados na Estação Experimental de Citricultura do Instituto Agrônômico, em Cordeirópolis, SP, e no campo do Instituto Biológico, SP. Desses pomares foram escolhidas, respectivamente, 8 e 6 plantas adultas e sadias, com bom estado de vegetação, das quais foram coletados ramos cujo diâmetro variou de 0,5 a 1 cm e que foram acondicionados em sacos plásticos umedecidos e transportados para o laboratório de Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico.

3.2 - Fungos

Os fungos (Tabela I) foram cultivados em meio de batata-dextrose-água (BDA) (água OXOID), com exceção de P. parasitica e P. cinnamomi que foram cultivados em erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio líquido de Czapek, (TUIE, 1969) acrescido de tiamina 20 ppm. P. citrophthora foi cultivado em ambos os meios. As culturas foram mantidas por 15 dias à temperatura ambiente (15 a 28°C).

3.3 - Inoculação

Empregou-se ramos, casca e lenho de LA e LD. Foram feitas inoculações no laboratório com material destacado das plantas dos pomares de Cordeirópolis e do Instituto Biológico e inoculações nas plantas do campo do Instituto Biológico.

O material inoculado no laboratório foi cortado em seções

Tabela I. Fungos utilizados nos experimentos.

FUNGO	CEPA	ORIGEM
<u>Ceratocystis paradoxa</u> (Dade) C. Moreau	526	MIB
<u>Cilindrocladium scoparium</u> Morgan	223	MIB
<u>Colletotrichum lindemuthianum</u> (Sacc & Magn)	15	MBF
<u>Helminthosporium carbonum</u> Ullstrup	28	MBF
<u>Phytophthora cinnamomi</u> Rands	314	MIB
<u>Phytophthora citrophthora</u> (Sm e Sm) Leonian	147	MIB
<u>Phytophthora infestans</u> Mont. de By	537	MIB
<u>Phytophthora parasitica</u> Dast	729	MIB
<u>Pythium</u> sp	6586	MIB

MIB - Micotéca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico

MBF - Micotéca da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico.

de aproximadamente 15 cm de comprimento e imerso em álcool 80% por 2 minutos, para uma desinfecção parcial. Foram utilizadas duas técnicas:

TÉCNICA 1: Dos ramos (R) foi retirada uma secção longitudinal da casca, expondo-se, assim, o lenho. De outros ramos a casca (C) foi totalmente separada do lenho (L), utilizando-se isoladamente esses tecidos (Figura 1).

O material foi inoculado com os patógenos Phytophthora citrophthora, P.parasitica, P.cinnamomi e com P. infestans, patógeno da batata e do tomateiro (Lycopersicum esculentum Mill) e Ceratocystis paradoxa, patógeno do coqueiro (Cocus nucifera L.)

As culturas de P.citrophthora, P.parasitica e P. cinnamomi foram passadas através de gase e o micélio ressuspendido em 100 ml de água esterilizada foi homogeneizado (Homogeneizador Virtis 23) à rotação média por 3 minutos. As culturas de P.infestans e C.paradoxa adicionou-se 30 ml de água esterilizada a cada placa e o micélio foi raspado com agulha. A suspensão micelial foi transferida com uma pipeta para o material disposto nas placas de Petri previamente esterilizadas, contendo papel de filtro umedecido na tampa e no fundo. Os tecidos foram incubados à temperatura ambiente por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (h) após a inoculação. Os controles receberam apenas água esterilizada e foram incubados pelo mesmo tempo.

Empregou-se a mesma técnica com ramos e fungos autoclavados a 120°C por 15 minutos, que foram usados nas seguintes combinações: ramos autoclavados e fungo não autoclavado; ramos não autoclavados e fungo autoclavado; ramos e fungos autoclavados. Procedeu-se a incubação por 72 horas.

Fig.1 - Tecidos inoculados segundo a Técnica 1 e a Técnica 2.

TECNICA
1

R



L



C



TECNICA
2



TÉCNICA 2: Com um furador de 4mm de diâmetro retirou-se um cilindro de casca dos ramos, e no orifício foi colocado um cilindro de mesmo diâmetro de micélio de P.citrophthora cultivado em BDA (ROSSETTI, 1947). No controle, o inóculo foi substituído por BDA. O material foi incubado por 72 horas à temperatura ambiente (Figura 1).

A inoculação nas árvores foi feita utilizando-se a técnica 2. Foram escolhidas 6 plantas (3 de LA e 3 de LD) e de cada planta foram utilizados 6 ramos (3 ramos inoculados e 3 ramos controle). Amostras de tecidos foram coletadas nos períodos de 6, 12, 24, 48, 72 horas e 7 dias após a inoculação.

3.4 - Extração, Cromatografia, Espectrofotometria e Hidrólise

Após a incubação as cascas inoculadas, segundo a técnica 1, foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm e dos ramos e lenho foram retiradas lâminas de tecido de 2-3 mm de espessura. Dos ramos inoculados no laboratório, segundo a técnica 2, a casca e o lenho foram separados e divididos em 3 secções de aproximadamente 2 cm cada uma. Uma secção abrangeu a área da inoculação bem como 1 cm de cada lado do inóculo no sentido longitudinal do ramo. As outras 2 secções abrangeram 2 cm à direita e à esquerda, respectivamente, dessa área.

Os tecidos foram submetidos à extração em etanol (EtOH) à quente por 10 minutos. Os extratos foram filtrados em papel de filtro (Toyo 1) e reduzidos em um Evaporador Rotativo (Buchler) à baixa pressão e à temperatura de 60°C à concentração de g/ml em base do peso fresco do tecido extraído (Extrato Bruto).

Para separação das substâncias presentes nestes extratos foram aplicadas alíquotas de 100µl em papel Whatmann nº 1, nº 20 e em cromatofolhas de sílica (0,25mm) (Merck 60 F. 254, Germany), desenvolvidos unidimensionalmente com várias misturas de solventes (Tabela II). Para revelação das substâncias os cromatogramas foram examinados à luz ultravioleta de 366 e 253nm e pulverizados com os reveladores: ácido sulfanílico (2% EtOH) e tricloreto de antimonio (25% clorofórmio) (SEIKEL, 1964).

Os reveladores anilina-difenilamina (1% acetona v:v), cloreto férrico (1% EtOH), tricloreto férrico/ferrocianeto de potássio (1% água v:v) e Folin-Denis (PROCHAZKA, 1963) foram utilizados em etapas posteriores ao processo de purificação das substâncias dos extratos.

O total de fenóis nos extratos brutos foi determinado pelo método de Folin-Denis modificado por SWAIN e HILLIS (1959), utilizando-se em nossos experimentos o reagente Folin-Ciocalteu. Para esse teste foram empregadas alíquotas de 0,5 ml de cada extrato, utilizando-se para a leitura da reação, à 725nm, um espectrofotômetro Pye Unicam, Mod.SP 1800. Os valores foram relacionados com os valores de uma curva padrão de ácido p-cumárico (ApC), sendo os resultados expressos como equivalentes em µg de ApC por g de peso fresco.

Para os ensaios de espectrofotometria, os extratos brutos foram secados e, o resíduo, retomado em água acidulada com HCl 0,5N pH 4,0, foi extraído com éter 2:1 (v/v) até que a fase etérica ficasse incolor. As frações foram combinadas, secadas e retomadas na concentração de g/ml (peso fresco) em EtOH. Frações de 0,1ml desses extratos foram diluídas a 20 ml ou a 50 ml com EtOH e examinadas espectrofotometricamente (Pye Unicam, Mod.SP 1800) no intervalo de 210 a 380nm.

Tabela II. Sistemas de solventes utilizados para separação das substâncias existentes nos extratos etanólicos dos tecidos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD).

SOLVENTES	ABREVIACÃO	PROPORÇÃO
ácido acético:água	AcA	15:85
acetato de etila:ácido acético:água	AeAcA	11:2:2
benzeno:éter	BE	80:20
butanol:ácido acético:água	BAcA	4:1:5
clorofórmio:ácido acético:metanol	CACM	50:5:45
fenol:água	FA	73:27
isopropanol:amoníaco:água	iPAmA	8:1:1
isopropanol:água	iPA	1:1
butanol-ácido acético:água	BACa	4:1:1
tolueno:ácido acético:água	TACa	4:1:5

Uma fração do extrato bruto de cascas de LA inoculadas com P.citrophthora foi parcialmente purificada pelo fracionamento com éter e foi submetida à cromatografia bidimensional em papel Whatmann nº 3MM desenvolvido em BAcA e AcA, respectivamente. As substâncias, separadas pela cromatografia e detectadas ao UV, foram eluídas com EtOH, recromatografadas em AcA e novamente eluídas com EtOH 95%(Uvasol, Merck). Em seguida, foram submetidas à hidrólises ácida e alcalina, testes de coloração com reveladores e análise espectrofotométrica ao UV.

Na hidrólise ácida, HCl 1N foi adicionado ao eluído etanólico (1:1, v/v) e a hidrólise processou-se a 100°C por 60 minutos. O hidrolisado foi fracionado com acetato de etila e a fase orgânica recromatografada. A fase aquosa foi submetida ao teste de Molisch (TASTALDI, 1955).

Na hidrólise alcalina, o eluído etanólico foi hidrolisado com NaOH 1N (1:1, v/v), por 120 minutos, a 100°C. Após fracionamento com acetato de etila a fase orgânica foi cromatografada e a fase aquosa submetida ao teste de Molisch.

Na análise espectrofotométrica ao UV das substâncias eluídas do cromatograma, utilizou-se como referência o eluído etanólico de uma área de mesmo Rf de um cromatograma onde não foram aplicadas amostras.

3.5 - Bioensaios

Lâminas de vidro (2,5x7,5; 4x13; 7x15cm) colocadas em placas de Petri foram esterilizadas numa estufa a 120°C por 60 minutos, e cobertas asséticamente com 3, 10 e 15 ml respectivamente, de meio líqüefeito Czapek-ágar 1% ou BDA 1%. Após a solidificação do meio foram feitos orifícios,

com um furador de 3mm de diâmetro, e em cada um se distribuiu 10µl dos extratos a serem ensaiados. Num dos orifícios o extrato foi substituído por EtOH (controle 1). Aguardou-se um período de 6 horas para difusão das substâncias no meio e a seguir, os orifícios foram preenchidos com cilindros de BDA com micélio dos fungos. O crescimento do fungo nestes orifícios foi comparado ao crescimento em orifícios sem extratos e sem EtOH (controle 2). As lâminas foram incubadas por 72 horas à temperatura ambiente (15 a 24°C) e a avaliação do crescimento do fungo foi feita pelo cálculo do diâmetro médio considerando-se o diâmetro horizontal e vertical da cultura. As lâminas foram secadas à 60°C por 24 horas e coloridas com negro de amido (MUSUMECI e FIGUEIREDO, 1974).

Foram ensaiados os extratos brutos de cascas e ramos de LA e LD de 3 experimentos em que os tecidos foram inoculados segundo a técnica 1. Para o bioensaio esses extratos foram levados à concentração equivalente a 10g/ml em base do peso fresco do tecido.

Verificou-se também a ação no crescimento micelial de P. citrophthora de substâncias, separadas por cromatografia em sílica, existentes nos extratos de casca de LA inoculada e incubada por 72 horas (LACI-72h) e de ramos de LA e LD inoculados e incubados por 72 horas (LARI-72h e LDRI-72h). Frações de 0,5ml foram aplicadas em cromatofolhas de sílica, desenvolvidas em BE. Após secagem, as cromatofolhas foram divididas horizontalmente em 10 faixas de 1 cm de largura. A sílica de cada faixa foi respada separadamente e eluída com EtOH, do qual foi posteriormente, separada por decantação. O eluído etanólico foi, concentrado ao volume correspondente a 10g/ml em base do peso fresco.

Uma substância do extrato de LACI-72h, separada por cromato

grafia, foi diluída com EtOH, segundo uma progressão geométrica até 1:128. Cada uma das diluições foi submetida ao bioensaio.

4. RESULTADOS

4.1 - Observações decorrentes da inoculação com P.citrophthora nos tecidos destacados das plantas e inoculados segundo a Técnica 1.

Na laranjeira doce, hospedeiro suscetível, verificou-se o crescimento do patógeno P.citrophthora em todos os ramos inoculados após o período de incubação de 48 e 72 horas. Na laranjeira azeda, hospedeiro resistente, verificou-se o crescimento do fungo, após 48 horas em apenas 20% dos ramos inoculados.

Reação de hipersensibilidade caracterizada pelo escurecimento dos tecidos inoculados, foi verificada nos ramos de LA e LD após inoculação com P.citrophthora. Os ramos de LA apresentaram a reação após 24 horas da inoculação em determinados pontos do lenho e o escurecimento do tecido atingiu o máximo nos ramos incubados por 72 horas. Nos ramos de LD a reação de hipersensibilidade foi notada após 72 horas, porém em menor intensidade do que a verificada para os ramos de LA (Figura 2).

Quando a casca e o lenho foram inoculados isoladamente com P. citrophthora o fungo cresceu no lenho dos dois hospedeiros e apenas nas cascas de LD. A reação de hipersensibilidade foi visível na casca e lenho de LA e praticamente ausente na casca e lenho de LD.

Não se verificou crescimento do fungo quando P. citrophthora foi distribuído nos ramos autoclavados dos dois hospedeiros.

Reação de hipersensibilidade não foi observada nos ramos das duas espécies que receberam micélio autoclavado de P.citrophthora.

Figura 2 - Lenho, casca e ramo de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados (a) e inoculados (b) com P.citrophthora.

- 1 - Lenho e casca de laranjeira doce
- 2 - Lenho e casca de laranjeira azeda.

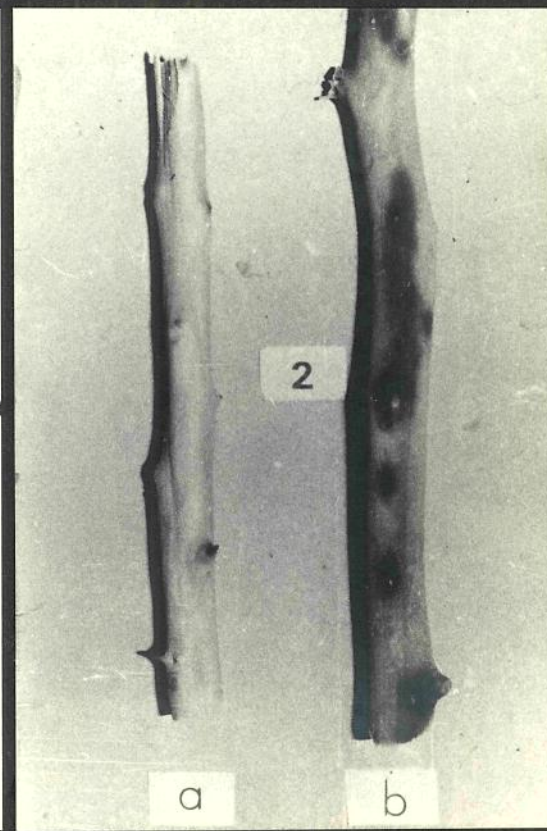
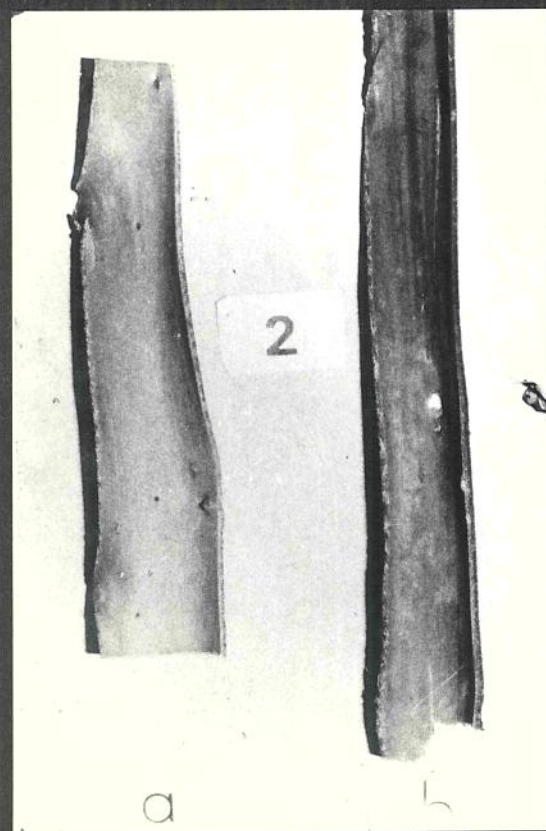
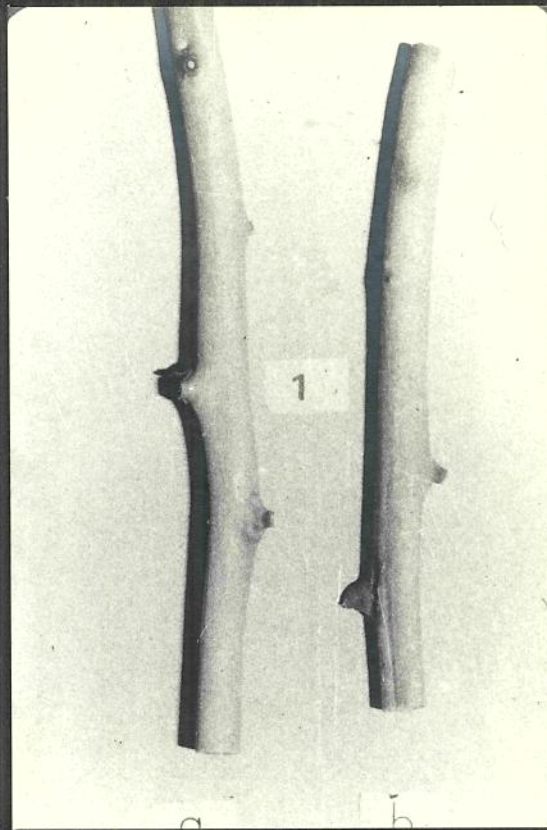
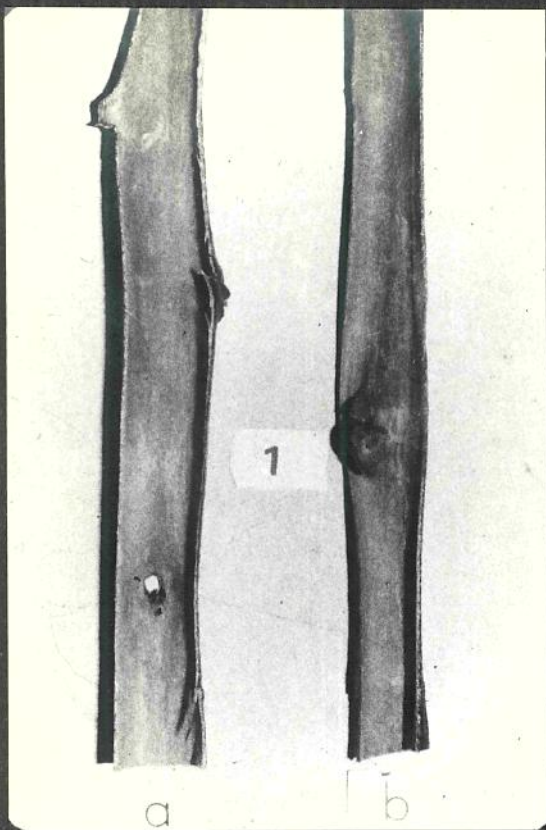


Figura 2 - Lenho, casca e ramo de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados (a) e inoculados (b) com P.citrophthora.

3 - Ramos de laranjeira azeda

4 - Ramos de laranjeira doce.



3a



3b



4a



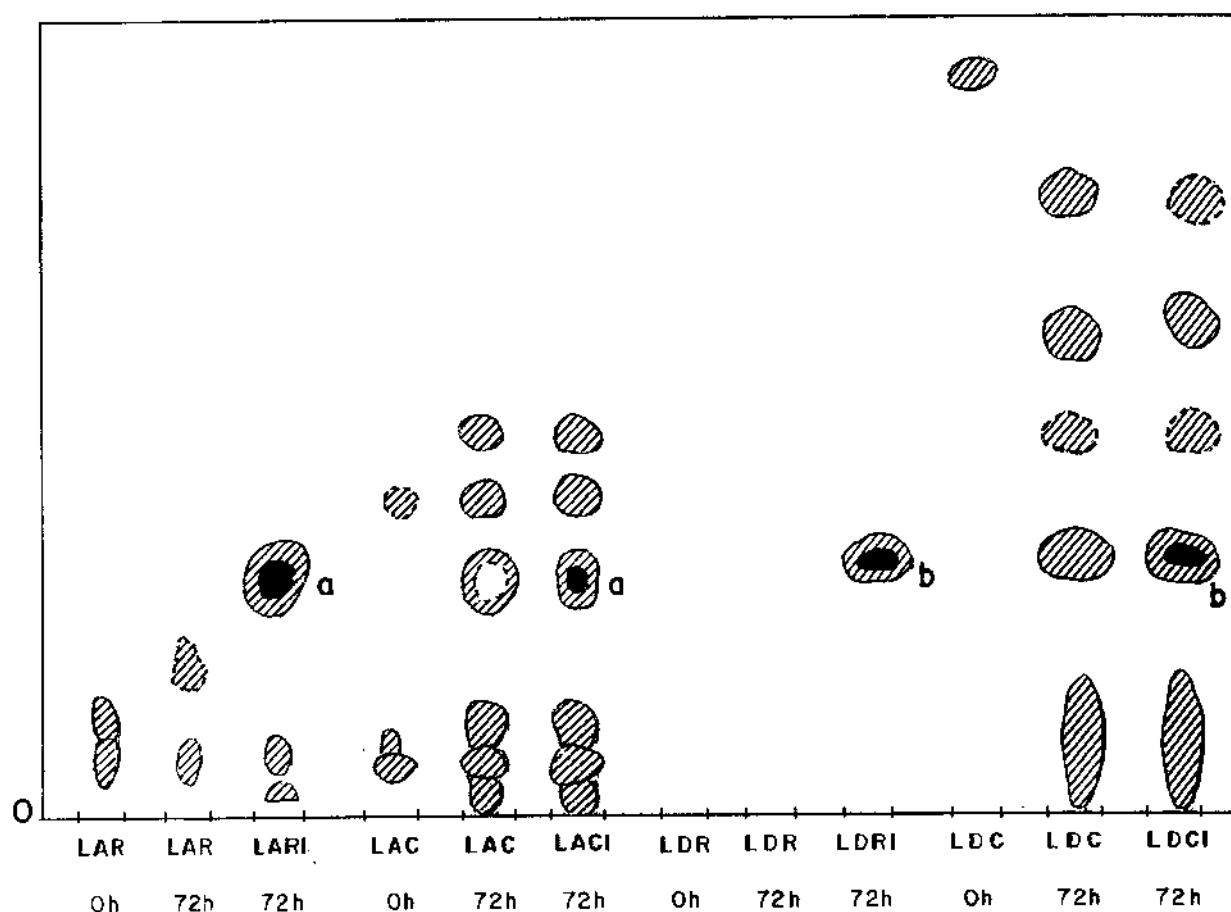
4b

4.2 - Análise dos cromatogramas de extratos de tecidos des tacados das plantas e inoculados com P.citrophthora segundo a Técnica 1.

A observação das cromatofolhas à luz ultra-violeta(UV) mos-
trou diferenças qualitativas na composição dos extratos dos
tecidos de LA e LD em consequência da inoculação com o pa-
tógeno. Um composto fluorescente (Rf 0,30 em BE) foi de-
tectado nos cromatogramas de extratos brutos de ramos e
cascas de LA inoculados com o patógeno. Essa substância
que será denominada "composto 1" (C_1) apresentou fluores-
cência de cor azul acentuada pela exposição do cromatogra-
ma aos vapores de amônia. O C_1 foi produzido pelos teci-
dos de ramos e cascas de LA em 24, 48, 72 e 96 h após a i-
noculação, sendo também produzido pelas cascas não inocula-
das e incubadas por 72 h (Figura 3). Nos cromatogramas com
extrato bruto de lenho de LA não se detectou o C_1 .

Nos cromatogramas de extrato bruto dos tecidos de LD inocu-
lados com P.citrophthora não se detectou o C_1 . Um compos-
to de coloração roxa (Rf 0,38 em BE) foi detectado ao UV
nos cromatogramas dos extratos de ramos, cascas e lenho i-
noculados e incubados por 48 h. Esse composto será denomi-
nado "composto 2" (C_2).

Substâncias que reagem positivamente com o ácido sulfaníli-
co, um revelador de fenóis, foram detectadas nos cromato-
gramas de extratos de ramos de LA e LD inoculados com P.
citrophthora. Os cromatogramas de extratos de cascas de
LA e LD não inoculadas (72h) e inoculadas (72h) apresenta-
ram maior número de substâncias reagindo positivamente com
o ácido sulfanílico, quando comparados a cromatografia dos
extratos de cascas não inoculadas (zero h). Ocorreram di-
ferenças qualitativas entre os extratos dos dois hospedei-



LAR e LDR - extratos de ramos de LA e LD não inoculados.
 LARI e LDRI - extratos de ramos de LA e LD inoculados.
 LAC e LDC - extratos de cascas de LA e LD não inoculados
 LACI e LDCI - extratos de cascas de LA e LD inoculados.

● substâncias reveladas pelo ácido sulfanílico.

● substâncias detectadas a luz ultra-violeta.

a = composto 1

b = composto 2

O = origem

Fig.3 - Cromatofolha de sílica com extratos (100µl) de tecidos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados e inoculados com P.citrophthora.

ros inoculados (Figura 3).

Os cromatogramas de extratos de ramos e cascas de LA e LD, inoculados e não inoculados, não mostraram diferenças qualitativas na composição de terpenos e esteroides, após revelação com tricloreto de antimonio.

Nos cromatogramas de extratos de ramos autoclavados, de LA e LD que receberam o fungo vivo ou autoclavado, bem como os cromatogramas de extratos de ramos não autoclavados que receberam o fungo autoclavado não foi verificada a presença de C_1 . Não foram observadas, também, outras diferenças nestes cromatogramas quando examinados ao UV.

4.3 - Cromatografia dos extratos de tecidos destacados das plantas e inoculados com P.citrophthora segundo a Técnica 2.

A revelação das substâncias existentes nos extratos de tecidos de LA e LD inoculados com P.citrophthora, segundo a técnica 2, foi feita pela observação dos cromatogramas ao UV.

Não se detectou o C_1 nos cromatogramas de tecidos de LA inoculados por esta técnica. Nos cromatogramas de casca, lenho e ramo de LA e LD não foi detectado o C_2 .

Comparando-se os extratos de tecidos da área da inoculação com extratos de tecidos das seções à direita e à esquerda dessa área, detectou-se o C_2 somente nos cromatogramas de extratos de tecidos que abrangeram a zona inoculada.

4.4 - Espectrofotometria de absorção ao ultravioleta dos extratos de tecidos destacados de plantas e inoculados com P.citrophthora segundo a Técnica 1.

Os extratos de tecidos de LA e LD apresentaram picos máximos de absorção na região do espectro compreendida entre 270 e 286nm.

O espectro de absorção dos extratos de ramos dos dois hospedeiros foi semelhante, sendo que os extratos de ramos não inoculados e incubados por 72 h e os extratos de ramos inoculados e extraídos após 72 h apresentaram valores de densidade ótica (DO) maior, que os extratos de ramos que não receberam nenhum tratamento (0 h). Comparando-se o espectro de absorção dos extratos de LA e LD nota-se que os extratos de ramos de LA não inoculados (LAR-72 h) e os inoculados (LARI-72 h) apresentaram valores de DO maiores que os extratos de LD (LDR-72 h e LDRI-72 h), enquanto que, os extratos de ramos de LA zero hora (LAR-0 h) apresentaram valores de densidade ótica menor que o extrato de LD zero hora (LDR-0 h) (Figuras 4 e 5).

Os extratos de casca de LA não inoculados (LAC-0 h e LAC-72 h) apresentaram picos máximos de absorção em 276 e 272 nm, respectivamente. O extrato de casca de LA inoculada (LACI-72 h) apresentou em relação a esses extratos um espectro de absorção modificado com um deslocamento no pico máximo de absorção para 286nm. (Figura 6).

Os extratos de cascas de LD apresentaram pico máximo de absorção em 284 e 286nm, verificando-se absorção maior com os extratos de cascas de LD que não receberam nenhum tratamento (LDC-0 h). Esse extrato apresentou pico de absorção menor em 325nm (Figura 7).

Os extratos de lenho apresentaram valores de densidade ótica (DO) muito pequenos. O extrato de lenho (L) de azeda não inoculado (LAL-0 h) não apresentou pico e o máximo de

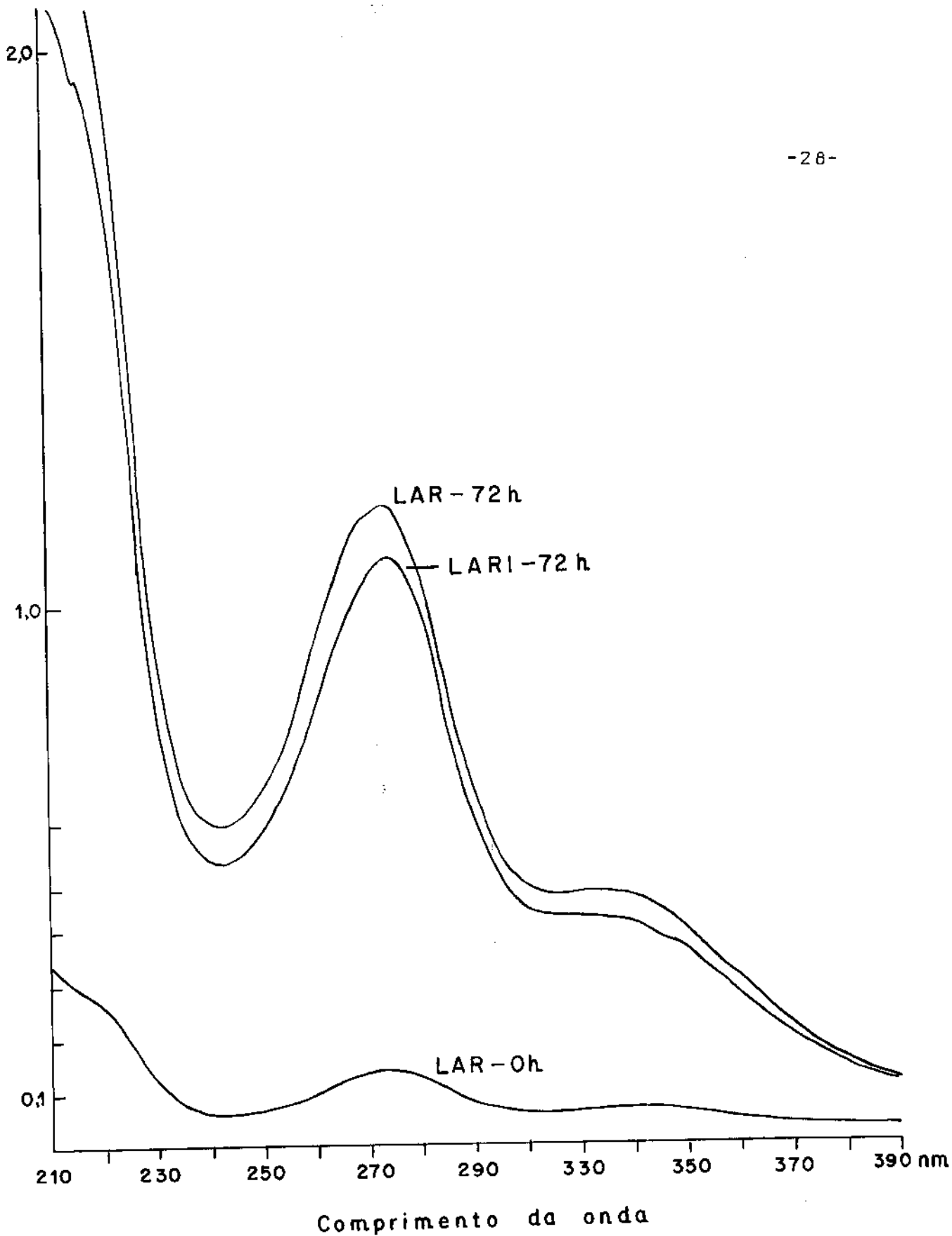


Fig.4 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de ramos de laranjeira azeda (LA) não inoculados (LAR-0 h e LAR-72 h) e inoculados (LARI-72 h) com P.citrophthora.

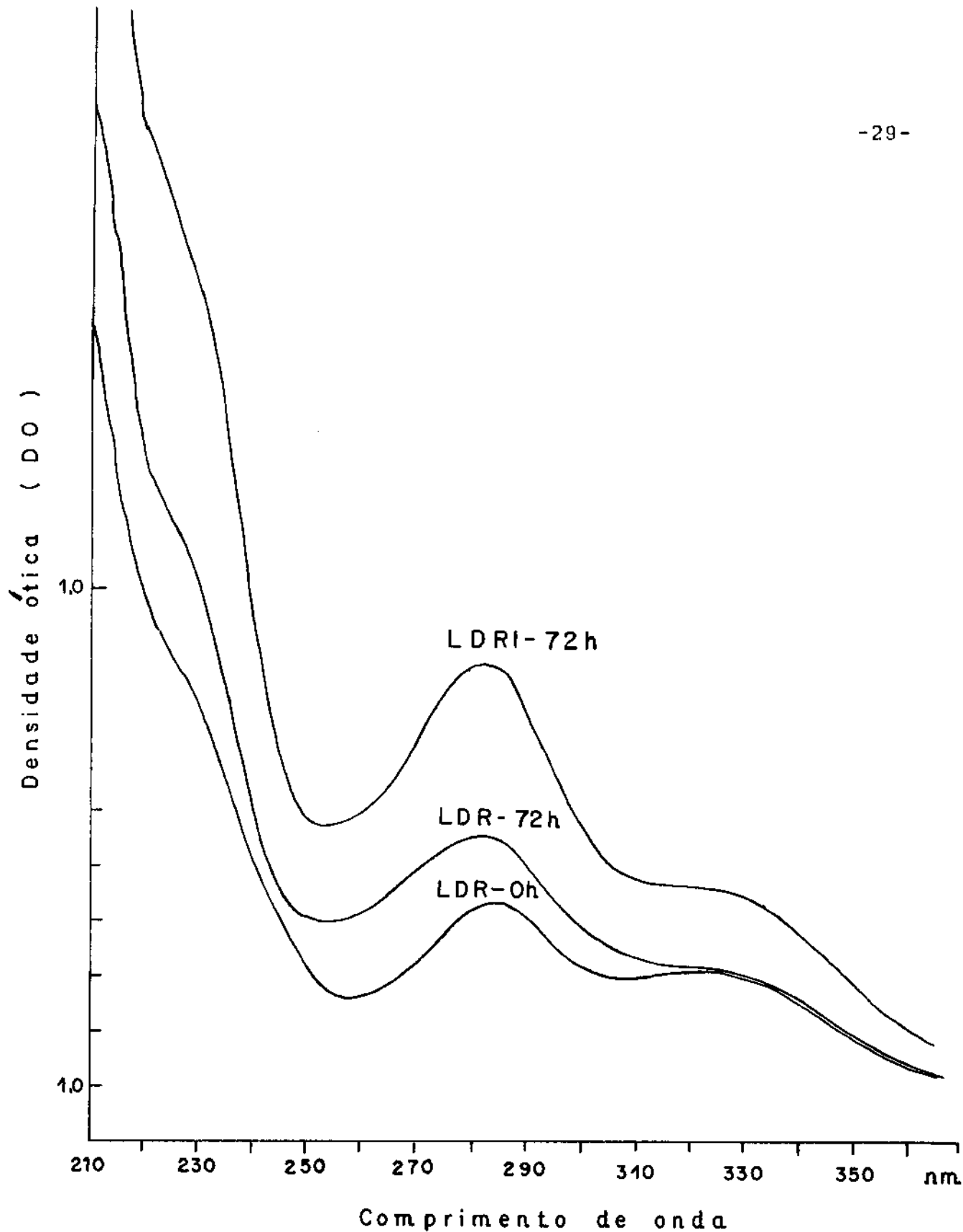


Fig.5 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de ramos de laranjeira doce (LD) não inoculados (LDR-0 h e LDR-72 h) e inoculados (LDRI-72 h) com P.citrophthora.

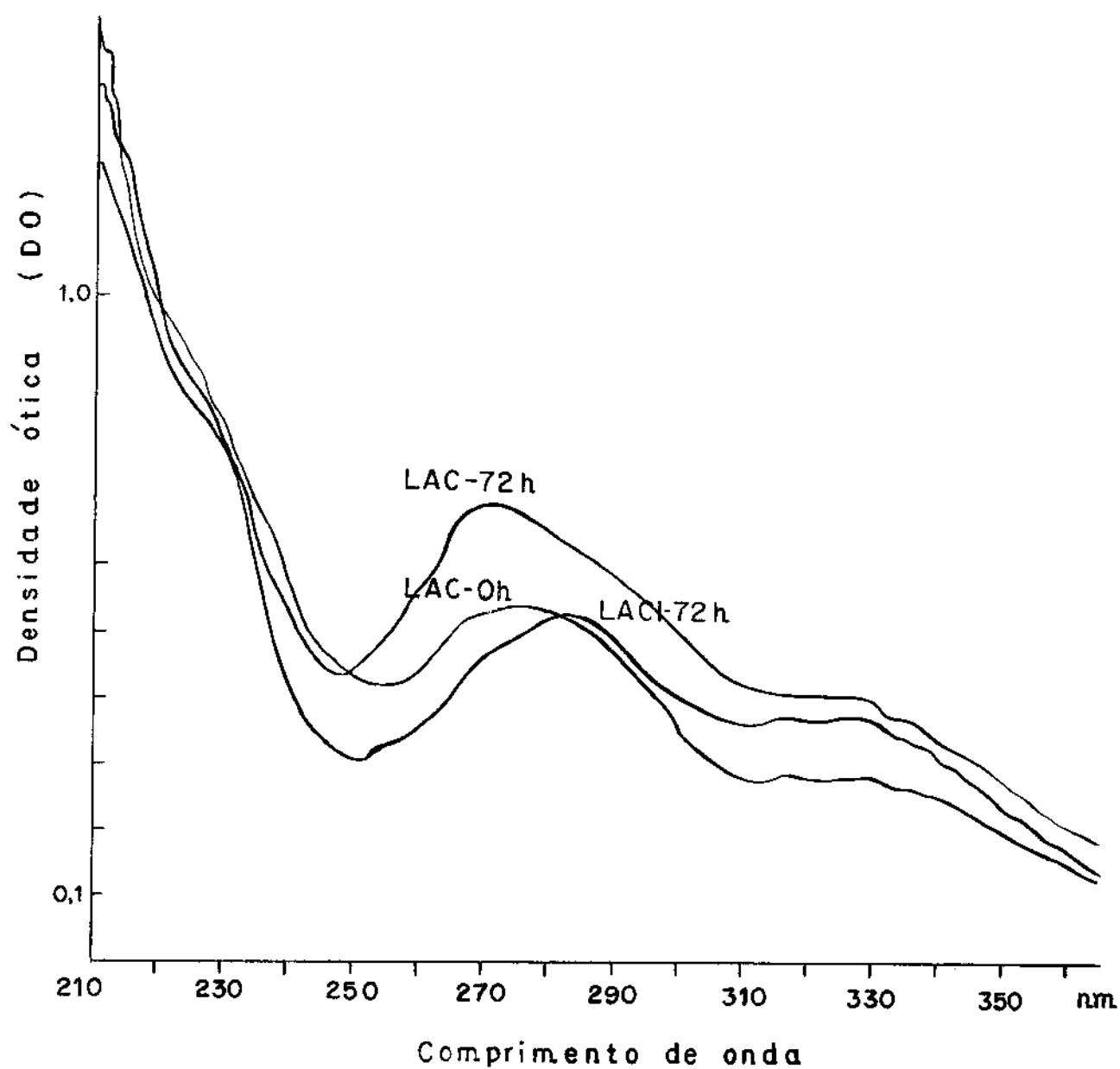


Fig.6 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de cascas de laranja azeda (LA) não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h) com *P.citrophthora*.

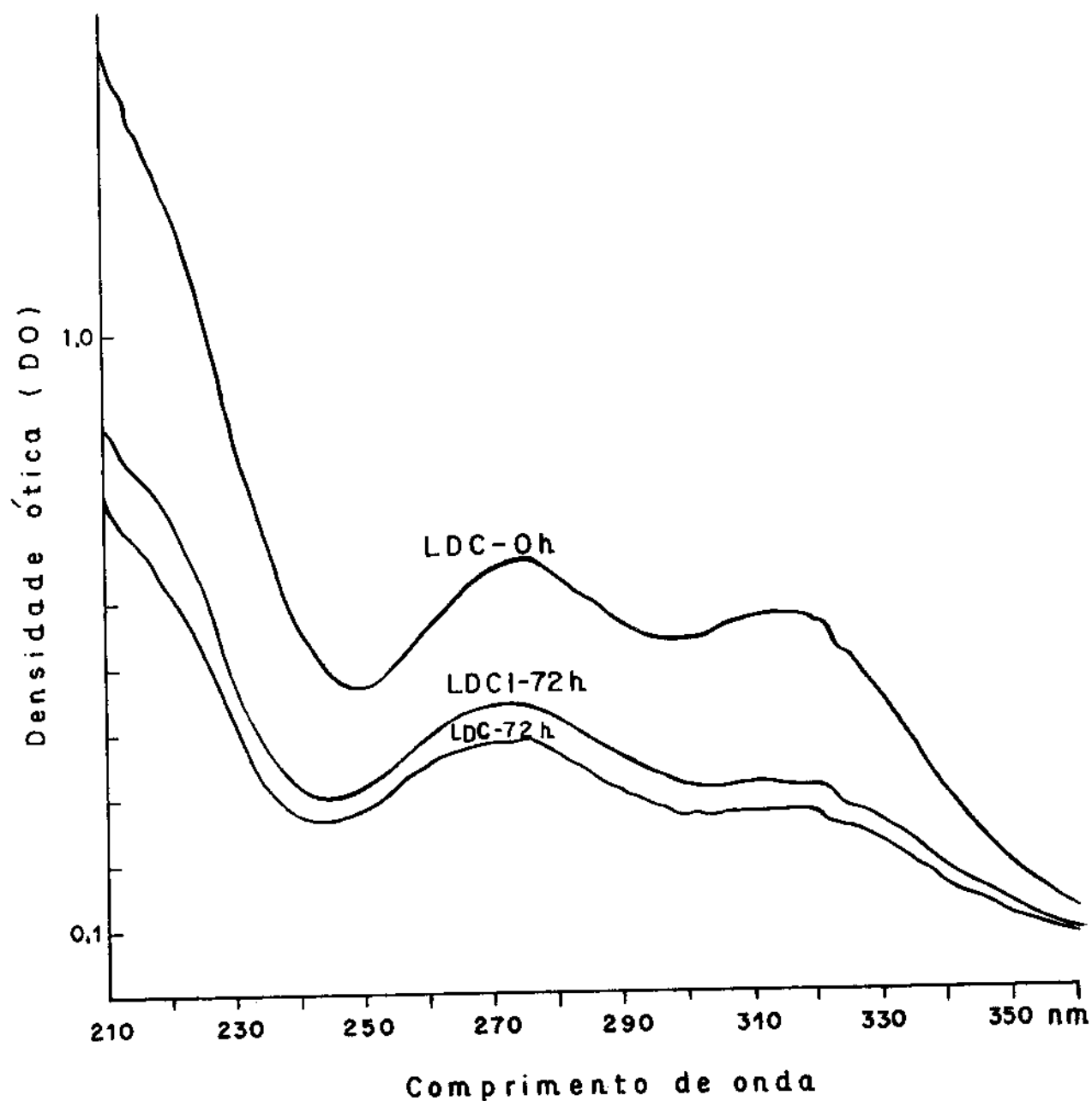


Fig.7 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de cascas de laranja doce (LD) não inoculadas (LDC-0 h e LDC-72 h) e inoculadas (LDCI-72 h) com P.citrophthora.

absorção foi entre 270 e 280nm. Os extratos de lenho de LA não inoculado (LAL-72 h) apresentaram pico em 280nm e os inoculados (LALI-72 h) apresentaram o pico máximo de absorção em 276nm. Os extratos de lenho de LD não inoculado (LDL-0 h e LDL-72 h) e o inoculado (LDLI-72 h) apresentaram em 276nm o máximo de absorção (Figura 8).

4.5 - Total de fenóis nos extratos de ramos e cascas de LA e LD não inoculados e inoculados com P.citrophthora

O total de fenóis, expresso como equivalentes em µg de ApC por g de peso fresco dos tecidos mostrou que nos extratos de ramos e cascas do hospedeiro resistente e do hospedeiro suscetível, os fenóis aumentam nos tecidos inoculados. O aumento de fenóis também foi verificado nos tecidos não inoculados e incubados durante os períodos de 24, 48 e 72 h.

Nos extratos de ramos verificou-se que o aumento de fenóis foi maior nos tecidos inoculados de LA comparado ao aumento nos tecidos inoculados de LD. Esse aumento foi bem pronunciado nos extratos de tecidos 24 h após a inoculação. O teor de fenóis aumentou nos tecidos extraídos após 48 h, diminuindo nos extratos de 72 h após a inoculação (Figura 9). Nos extratos de ramos inoculados (48 e 72 h) a quantidade total de fenóis foi menor em relação aos extratos dos ramos não inoculados (controles 48 e 72 h) (Figura 9).

Os extratos de ramos de LD apresentaram uma quantidade menor de fenóis que os extratos de ramos de LA (Figura 9). Verificou-se que 48 h após a inoculação houve um máximo de aumento dos fenóis que declinou nos extratos de 72 h.

Nas cascas de LA e LD o total de fenóis foi menor que o total verificado nos ramos. Nas cascas de LA as diferenças

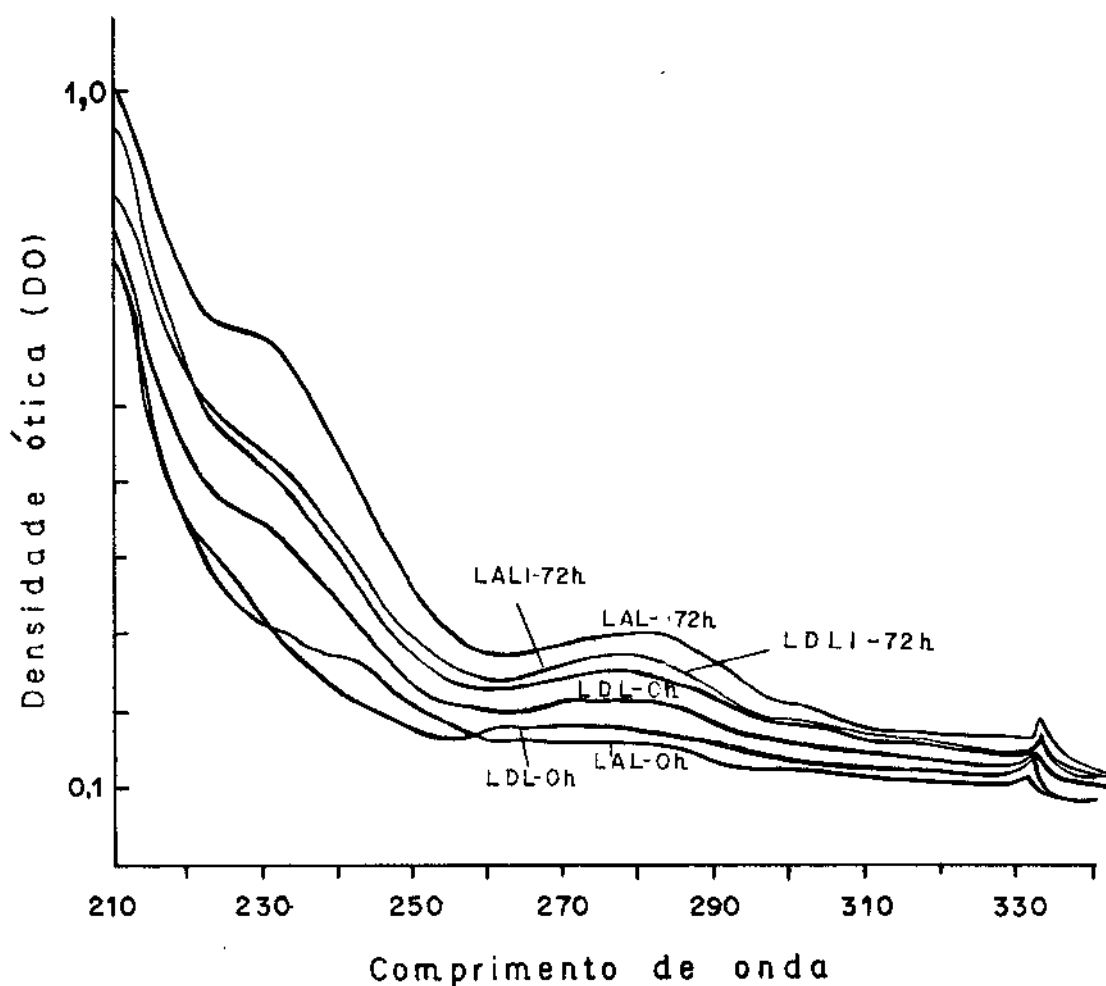


Fig.8 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos extratos de lenho de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados (LAL-0 h, LAL-72 h, LDL-0 h e LDL-72 h) e inoculados (LALI-72 h e LDLI-72 h) com P.citrophthora.

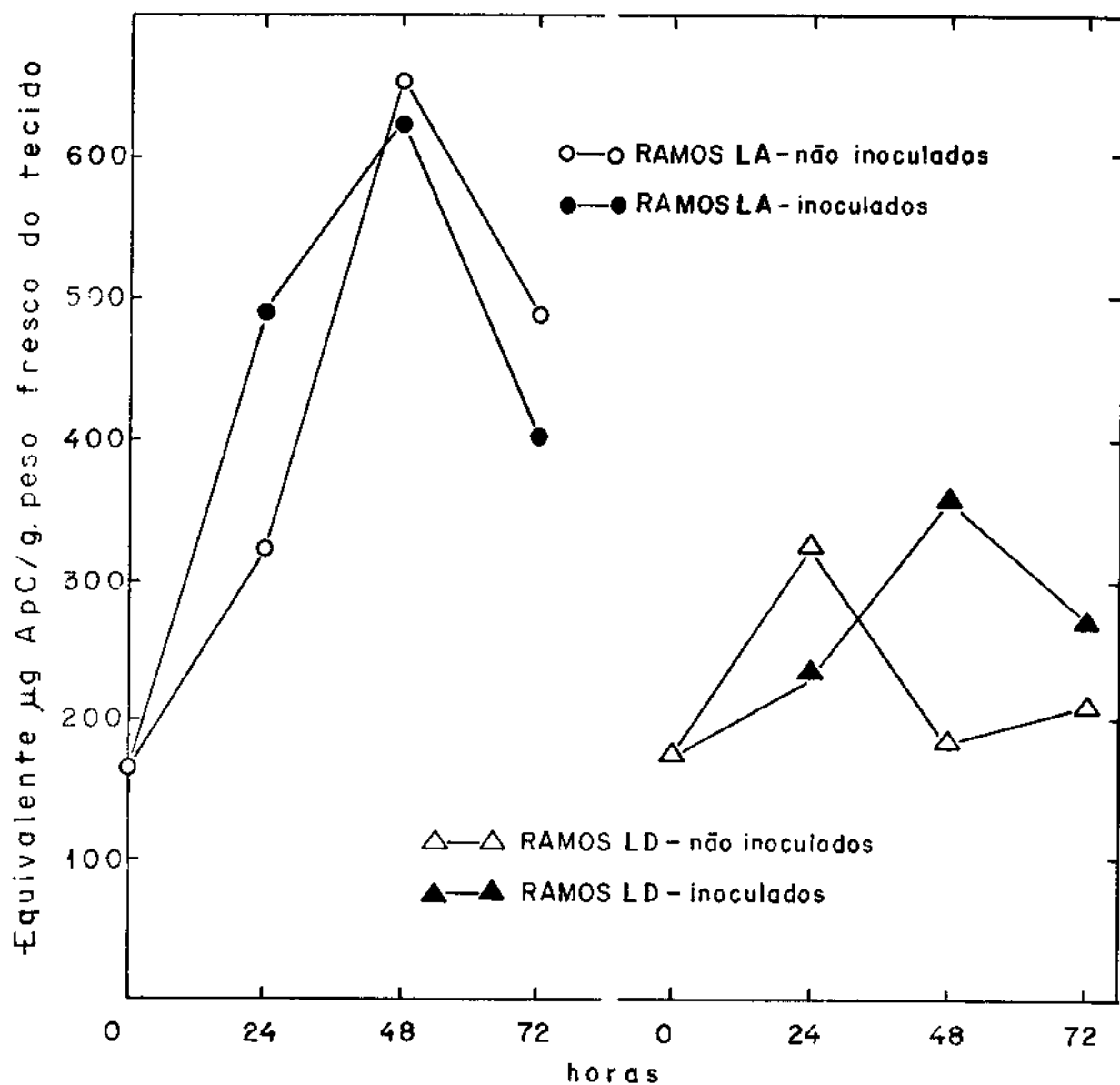


Fig.9 - Total de fenóis em ramos de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculados e inoculados com P.citrophthora*.

* Média de duas repetições.

entre cascas inoculadas e não inoculadas foram pequenas. Considerou-se que houve aumento no total de fenóis entre os extratos de zero hora para os extratos de cascas inoculadas e extraídas após 72 h, assim como com extratos de cascas não inoculadas (72 h). Nos extratos de cascas de LD ocorreu pequeno aumento no total de fenóis nas cascas não inoculadas em relação as inoculadas (Figura 10).

4.6 - Observações decorrentes da inoculação com P.parasitica, P.cinnamomi, P.infestans e C.paradoxa nos tecidos destacados das plantas e inoculadas segundo a Técnica 1.

Verificou-se a reação de hipersensibilidade nos ramos de LA após 48 h de incubação com o patógeno P.parasitica, sendo o crescimento do fungo no tecido deste hospedeiro menor em comparação com o crescimento do fungo nos ramos de LD onde não se notou reação de hipersensibilidade. Após o período de incubação de 72 h todos os ramos de LD apresentaram crescimento do fungo; nos ramos de LA o crescimento foi verificado em 40% dos ramos inoculados. Não houve desenvolvimento de P.parasitica nas cascas de LA e LD.

O fungo P.cinnamomi não se desenvolveu nas cascas de LA e LD. Nos ramos de LA inoculados com esse fungo verificou-se, em 30% dos ramos, reação de hipersensibilidade 72 h após a inoculação, notando-se o crescimento do fungo nos ramos desde o período de 48 h. Os ramos de LD não apresentaram reação de hipersensibilidade, verificando-se o crescimento de P.cinnamomi nos ramos, 48 h após a inoculação.

Nos ramos e cascas de LA e LD inoculados com os não patógenos P.infestans e C.paradoxa não ocorreu crescimento dos fungos e reação de hipersensibilidade.

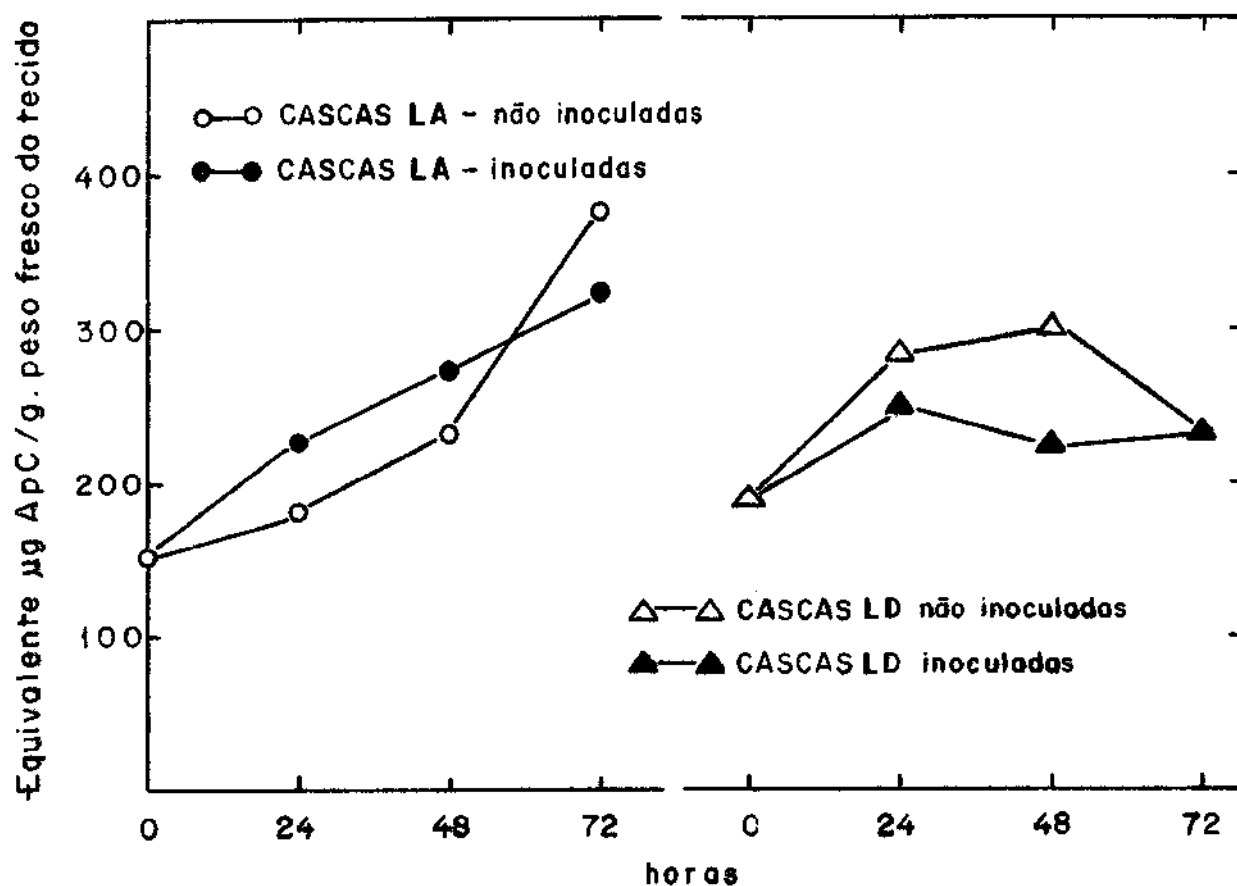


Fig.10 - Total de fungos em cascas de laranja azeda (LA) e laranja doce (LD) não inoculadas e inoculadas com *P.citrophthora**.

* Média de duas repetições.

4.7 - Análise dos cromatogramas de extratos de tecidos inoculados com P.parasitica, P.cinnamomi, P.infestans e C.paradoxa, segundo a Técnica 1.

Os cromatogramas dos extratos de ramos e cascas de LA inoculadas com P.parasitica e P.cinnamomi, examinados ao UV mostraram que ramos e cascas de LA desenvolveram o C_1 (Rf 0,30 em BE) após a inoculação com esses fungos. Nos cromatogramas de extratos de ramos e cascas de LD não se detectou o C_1 .

Os cromatogramas de extratos de cascas e ramos de LA e LD inoculados com os não patógenos P.infestans e C. paradoxa, observados ao UV mostraram não ter ocorrido produção do C_1 pelos tecidos de LA, não se detectando diferenças entre os tecidos inoculados dos dois hospedeiros.

4.8 - Análise dos cromatogramas de extratos de tecidos das plantas inoculadas com P.citrophthora, segundo a Técnica 2.

O exame ao UV dos cromatogramas de casca, ramo e lenho não mostrou a presença do C_1 , pelos tecidos de LA quando a inoculação com P.citrophthora foi feita nas plantas. Os cromatogramas mostraram a presença do C_2 , que foi também detectado nos cromatogramas dos extratos de tecidos inoculados de LD.

A observação dos cromatogramas ao UV mostrou que o C_2 começa a ser detectado nos extratos de tecidos de 48 h até 7 dias após a inoculação. Comparando-se os cromatogramas de extratos de tecido que apresentaram lesão, com os cromatogramas dos extratos de tecido das regiões próximas à lesão, verificou-se que a produção do C_2 é confinada aos tecidos

onde o fungo se desenvolveu.

4.9 - Bioensaios com P.citrophthora

Tomou-se como padrão do crescimento de P.citrophthora o desenvolvimento do fungo nos extratos de tecidos sadios. Oh, comparando-se o crescimento nesses extratos com o crescimento nos extratos de tecidos inoculados e não inoculados.

Verificou-se o efeito do EtOH dos extratos comparando-se o crescimento do fungo no controle 1 com o crescimento no controle 2 (sem EtOH).

No bioensaio com extratos de cascas de LA verificou-se que o crescimento de P.citrophthora foi inibido pelos extratos de cascas de LA inoculadas com este patógeno e extraídas após um período de incubação de 72 h (LACI-72 h) (Figura 11). A média do diâmetro da cultura de P.citrophthora nesse extrato foi de 6,1mm enquanto que nos extratos de tecido sadio desse hospedeiro (LAC-0 h) o diâmetro da cultura foi de 15,9mm (Tabela III). O EtOH não alterou o desenvolvimento do fungo quando comparado ao controle 2. O crescimento do fungo nesses controles foi relativamente maior ao crescimento nos extratos de casca de LA. Os extratos de casca de LA não inoculadas e incubadas por 72 h (LAC-72 h) também inibiram o crescimento micelial de P. citrophthora (Tabela III e Figuras 11 e 12).

O fungo se desenvolveu, uniformemente, em todos os extratos de casca de LD, notando-se, em um dos experimentos, uma pequena ação inibidora no crescimento micelial de P. citrophthora pelos extratos de cascas de LD não inoculadas e incubadas por 72 h (LDC-72 h) e as inoculadas e extraídas após 72 h de incubação com o fungo (LDCI-72 h) (Tabela III e Figuras 11 e 12).

Fig.11 - Crescimento micelial de P.citrophthora em extratos de cascas e ramos de laranjeira azeda e laranjeira doce não inoculadas e inoculadas com P.citrophthora.

1A a 4A - Extratos de tecidos não inoculados:
0, 24, 48, 72h, respectivamente.

2B a 4B - Extratos de tecidos inoculados:
24, 48, 72h, respectivamente.

5A - Controle 1 (com EtOH)

5B - Controle 2 (sem EtOH)

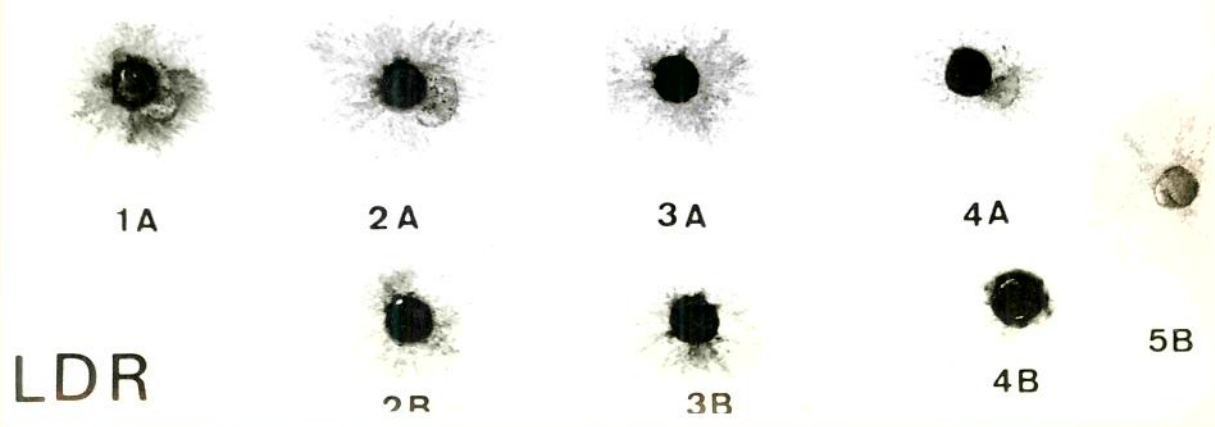
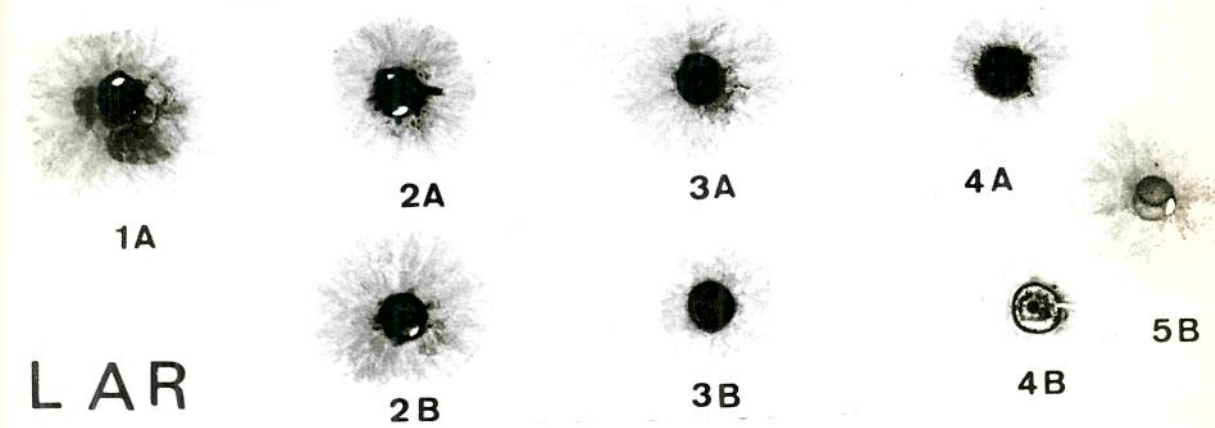
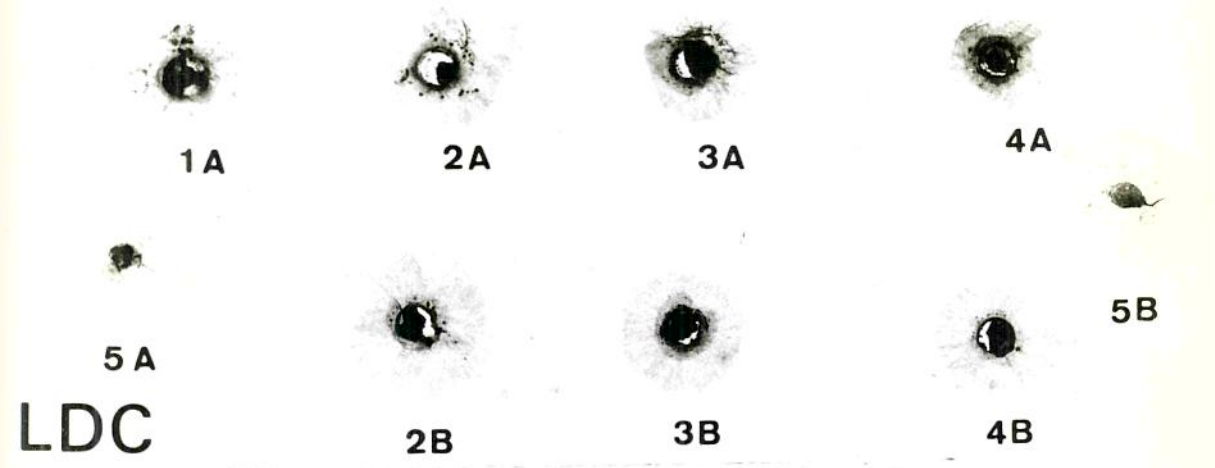
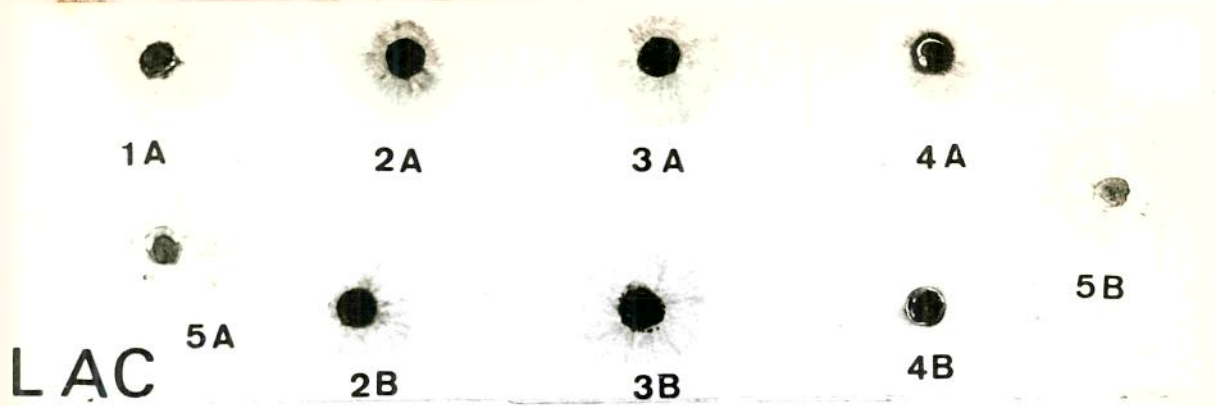


Tabela III. Ação no crescimento micelial de P.citrophthora, dos extratos de cascas (C) de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculadas e inoculadas (I) com P.citrophthora.

EXTRATOS	Diâmetro médio da cultura em mm [*]			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	M ^{**}
LAC-0 h	13,0	15,9	18,8	15,9
LAC-24 h	12,0	15,0	19,5	15,5
LAC-48 h	12,8	12,4	16,9	14,0
LAC-72 h	8,8	12,9	13,2	11,6
LACI-24 h	12,0	14,0	18,8	14,9
LACI-48 h	11,8	14,1	14,6	13,5
LACI-72 h	0,0	8,3	10,0	6,1
Controle 1	14,0	19,8	20,0	17,9
Controle 2	15,3	21,4	20,0	18,9
LDC-0 h	16,2	14,6	21,6	17,4
LDC-24 h	13,1	13,2	19,8	15,3
LDC-48 h	13,3	12,3	19,5	15,0
LDC-72 h	11,5	11,0	16,6	13,0
LDCI-24 h	14,2	14,5	21,3	16,6
LDCI-48 h	14,1	13,0	19,3	15,4
LDCI-72 h	15,0	13,0	12,6	13,5
Controle 1	15,9	14,9	20,0	16,9
Controle 2	16,1	13,2	20,0	16,4

* Média do crescimento em 4 repetições, por experimento.

** Média dos experimentos 1, 2 e 3.

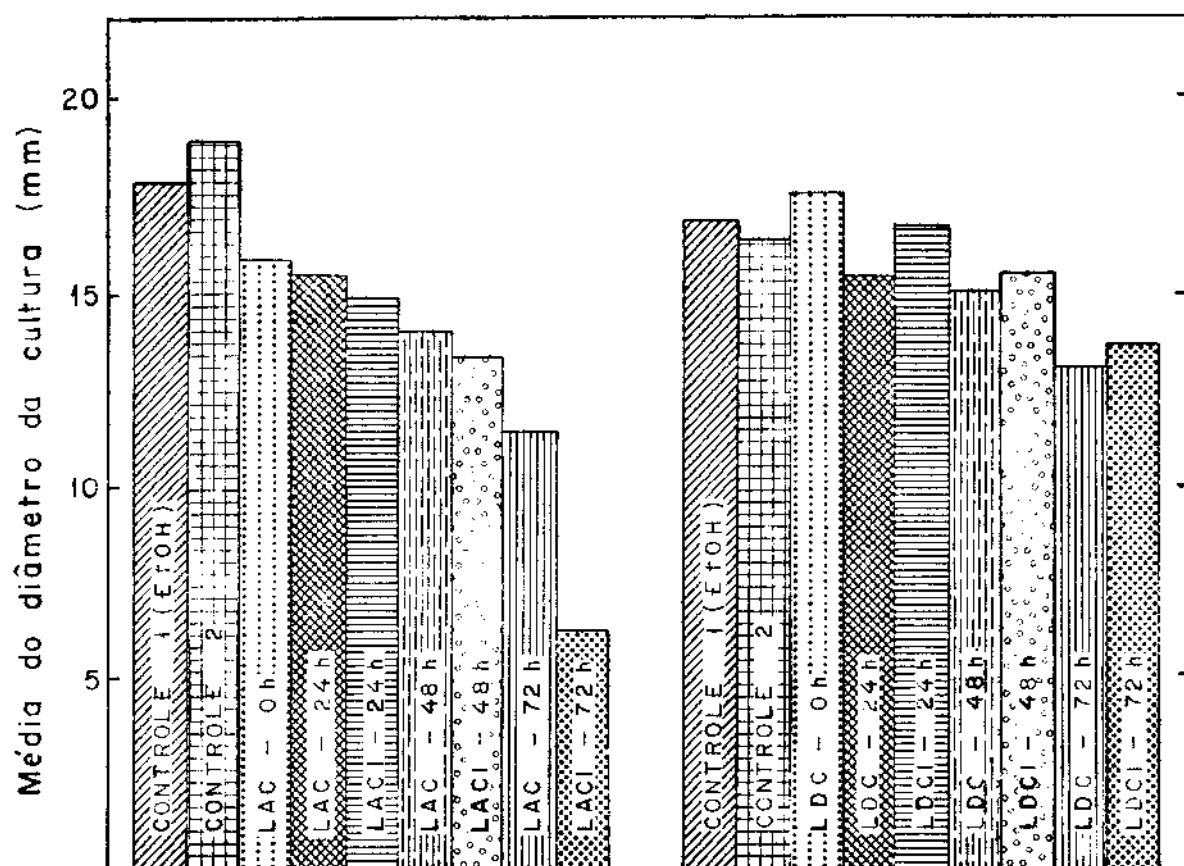


Fig.12 - Efeito dos extratos de cascas de laranja azeda (LA) e laranja doce (LD) no crescimento de *P. citrophthora*.

Os extratos de ramos de LA inoculados com P. citrophthora (72 h) inibiram o crescimento micelial desse fungo em relação ao crescimento nos extratos de ramos de LA não inoculados -0 h. Embora com ação inibidora menor, também os extratos de ramos inoculados (72 h) de LD inibiram o crescimento micelial de P.citrophthora (Tabela IV e Figuras 11 e 13).

Os bioensaios com substâncias da casca inoculada de LA, separadas por cromatografia em sílica gel, mostraram que das 10 faixas da cromatofolha, as faixas 1, 2 e 3, possuem substâncias com ação fungitóxica sobre P.citrophthora (Tabela V e Figuras 14 e 15).

Alíquotas dos eluídos das faixas 1, 2 e 3 foram aplicadas em papel Whatmann nº1 e submetidas a cromatografia bidirecional utilizando-se o sistema de solventes BAoA e AoA. O exame dos cromatogramas ao UV mostrou que a faixa 1 contém quatro substâncias fluorescentes (Rfs 0,10; 0,35; 0,75 e 0,92 em AoA); a faixa 2 contém três substâncias fluorescentes (Rfs 0,10; 0,35; 0,60 em BAoA além do C₁ (Rf 0,66 em 15% AoA). A faixa 3 apresentou apenas, o C₁.

Eluídos das faixas 1 e 3 das cromatofolhas com extratos de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) foram comparadas, por espectrofotometria de absorção ao UV e cromatografia dupla em BAoA e AoA, com os eluídos das faixas 1 e 3 da cromatofolha com extrato de casca de LA inoculada (LACI-72 h).

O espectro de absorção ao UV dos eluídos da faixa 1 mostrou picos de absorção em 280nm para o eluído da cromatofolha do extrato de LAC-0 h e, em 215 e 280nm para os extratos de LAC-72 h e LACI-72 h. A densidade ótica foi maior para o eluído da cromatofolha do extrato de tecido inocula

Tabela IV. Ação, no crescimento micelial de P. citrophthora, dos extratos de ramos (R) de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD) não inoculadas e inoculadas (I) com P. citrophthora.

EXTRATOS	Diâmetro médio da cultura em mm [*]			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	M ^{**}
LAR-0 h	18,7	20,1	15,6	18,1
LAR-24 h	15,0	14,0	12,8	13,9
LAR-48 h	13,1	14,0	10,5	12,5
LAR-72 h	13,0	13,9	11,1	12,7
LARI-24 h	13,4	13,3	11,5	12,7
LARI-48 h	11,3	12,3	7,1	10,2
LARI-72 h	1,0	12,5	6,5	6,7
Controle 1	18,4	19,6	17,5	18,5
LDR-0 h	20,6	20,3	22,5	21,1
LDR-24 h	21,4	20,0	22,1	21,2
LDR-48 h	17,9	17,6	21,5	19,0
LDR-72 h	17,8	18,1	19,5	18,4
LDRI-24 h	18,9	18,2	21,5	18,9
LDRI-48 h	15,8	14,1	6,6	12,2
LDRI-72 h	10,6	10,3	8,3	9,7
Controle 1	18,7	21,5	18,8	19,6

* Média do crescimento em 4 repetições, por experimento.

** Média dos experimentos 1, 2 e 3.

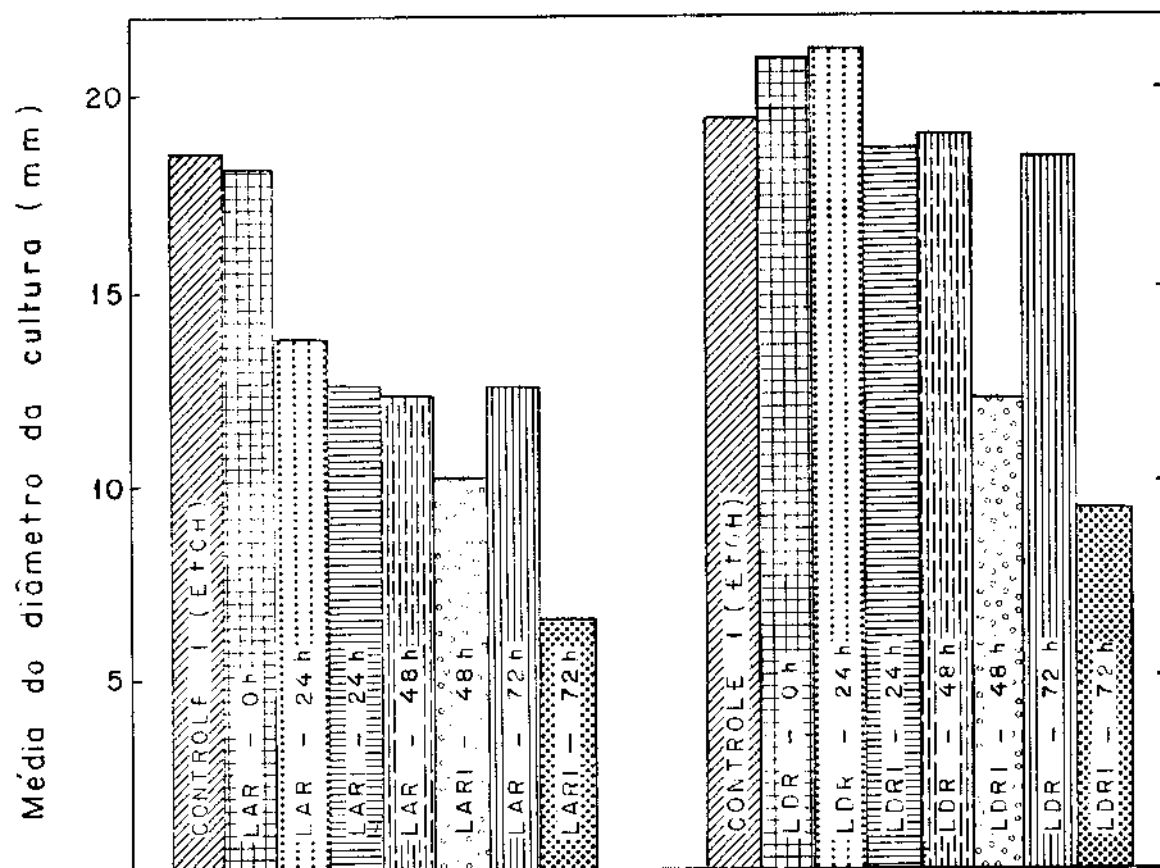


Fig.13 - Efeito dos extratos de ramos de laranja azeda (LA) e laranja doce (LD) no crescimento de P. citrophthora.

Tabela V. Ação das substâncias do extrato de casca (C) de laranjeira azeda inoculada (LACI-72 h), separadas por cromatografia em sílica, no crescimento micelial de P.citrophthora.

FAIXAS DA CROMATOFOLHA	Diâmetro médio da cultura em mm [*]		
	Exp.1	Exp.2	M ^{**}
1	0,0	0,0	0,0
2	6,5	0,0	3,2
3 ^{***}	0,0	0,0	0,0
4	10,9	10,0	10,5
5	14,6	15,3	15,0
6	15,9	17,3	16,6
7	13,5	14,3	13,9
8	10,4	12,9	11,7
9	12,1	14,3	13,2
10	12,6	12,5	12,7
Controle ^{****}	13,4	14,6	14,0

* Média do crescimento em 4 repetições, por experimento.

** Média dos experimentos 1 e 2.

*** Composto 1 (C₁).

**** 10 µl EtOH.

Fig.14 - Crescimento de P.citrophthora nos eluídos da cromatofolha com extrato de cascas de laranjeira azeda (LACI) e nos eluídos das cromatofolhas com extratos de ramos de laranjeira azeda (LARI) e laranjeira doce (LDRI).

1-10 - Faixas da cromatofolha de sílica com substâncias dos extratos.

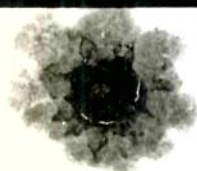
11 - Controle (EtOH).

LACI



11

10



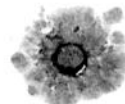
1



2



3



4



5

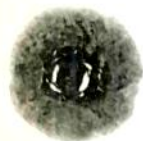


11

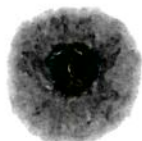


10

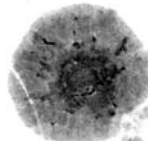
LARI



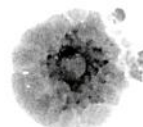
6



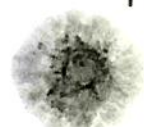
7



8



9



10



1



2



3



4



5

LDRI



6



7



8



9



10



11

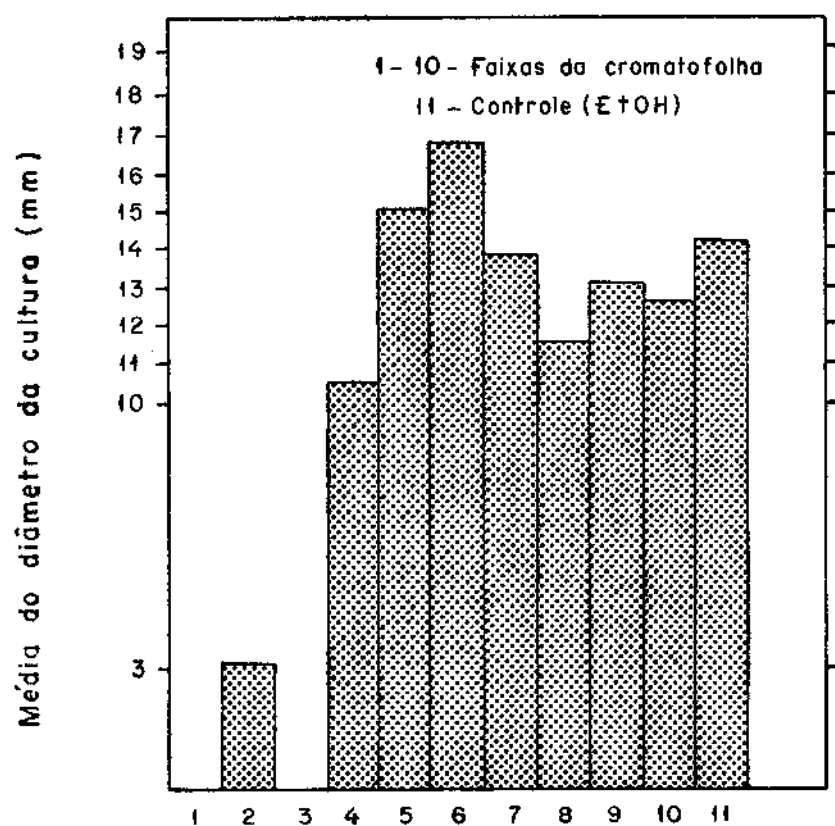


Fig.15 - Ação das substâncias do extrato de casca de laranja azeda inoculada (72 h), separadas pela cromatografia em placas de sílica, no crescimento micelial de P.citrophthora.

do (LACI-72 h) (Figura 16). O exame dos cromatogramas ao UV mostrou que na faixa 1 foram detectados os mesmos compostos nos extratos de LAC-0 h, LAC-72 h e LACI-72 h, ocorrendo maior fluorescência dos compostos nos cromatogramas do eluído da cromatofolha do extrato de LACI-72 h.

No exame dos cromatogramas ao UV dos eluídos da faixa 3 não foi detectado o C_1 nos extratos de LAC-0 h. Este composto foi pouco visível no cromatograma dos extratos de LAC-72 h. A faixa 3 do extrato de LACI-72 h apresentou um espectro de absorção característico com picos máximos de absorção em 225, 294 e 325nm, que não ocorreu em LAC-0 h e LAC-72 h (Figura 17).

Os bioensaios com substâncias do extrato de ramos inoculados de LA separadas por cromatografia em sílica gel mostraram que, das 10 faixas da cromatofolha, as faixas 3 e 4 possuem substâncias com moderada ação inibidora no crescimento de P.citrophthora (Tabela VI e Figura 18). Os bioensaios com substâncias do extrato de ramos inoculados de LD separadas, por cromatografia em sílica gel, mostraram que apenas a faixa 4 possui substâncias com ação inibidora no crescimento de P.citrophthora (Tabela VII e Figuras 14 e 18).

Alíquotas dos eluídos da faixa 3 e da faixa 4 de LARI-72h e LDRI-72 h foram aplicadas em papel Whatmann nº 1 e cromatografadas bidirecionalmente, no sistema de solventes BAa e Aa. O exame dos cromatogramas ao UV mostrou que a faixa 3 de LARI contém dois compostos fluorescentes (Rfs 0,50 e 0,66 (C_1) em Aa). A faixa 3 de LDRI contém o C_2 (Rf 0,48 em Aa). A faixa 4 de LARI contém o C_1 e dois compostos fluorescentes (Rfs 0,50 e 0,09). A faixa 4 de LDRI contém o C_2 e dois compostos fluorescentes (Rfs 0,60 e 0,09).

A dose efetiva de inibição (DE_{50}) do C_1 no crescimento mi-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

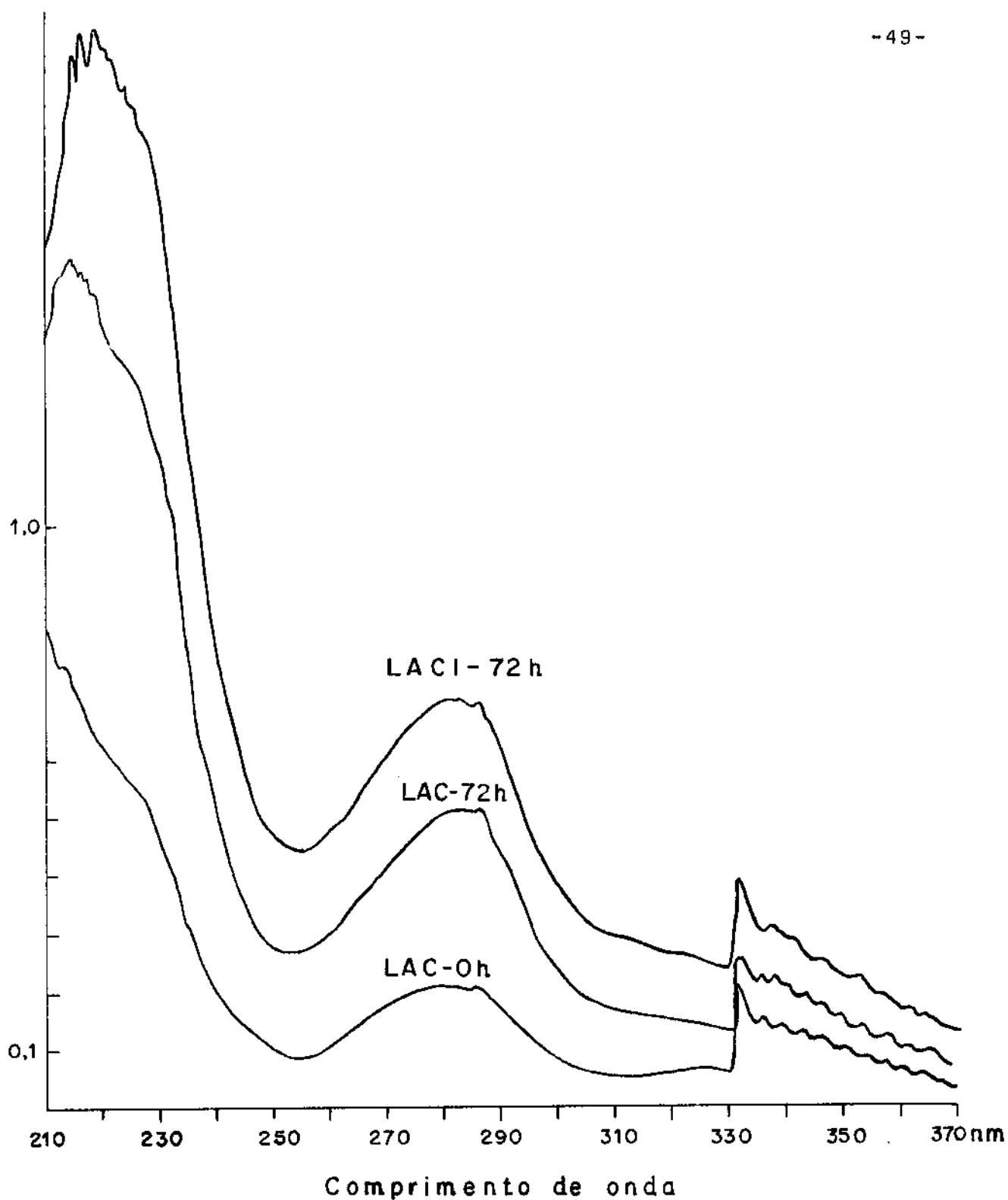


Fig.16 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos eluídos da faixa 1 das cromatofolhas com extratos de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h).

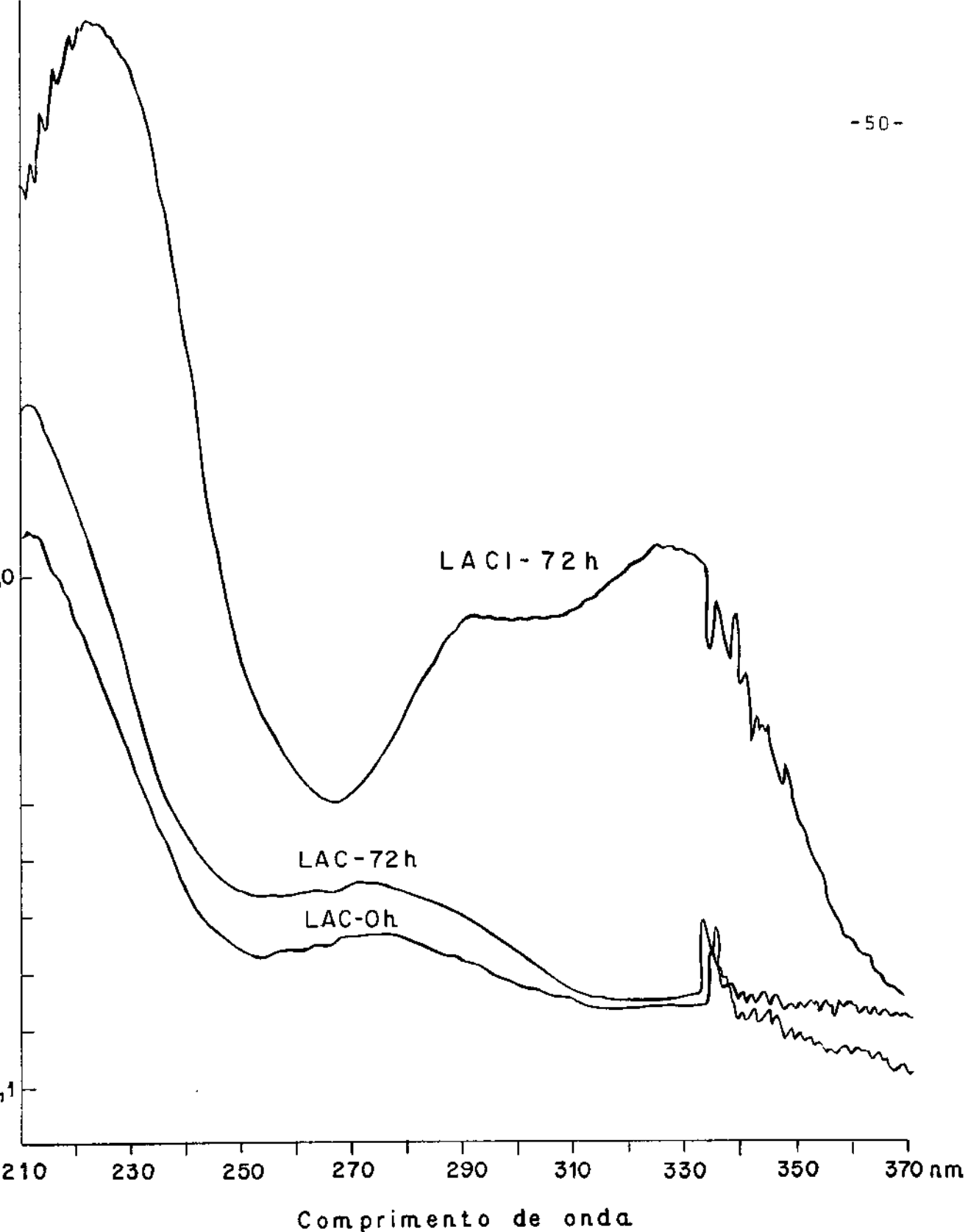


Fig.17 - Espectro de absorção ao ultravioleta dos eluídos da faixa 3 das cromatofolhas com extratos de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h) e inoculadas (LACI-72 h).

Tabela VI. Ação das substâncias do extrato de ramos de laranjeira azeda inoculada (LARI-72 h), separadas por cromatografia em sílica, no crescimento micelial de P.citrophthora.

FAIXAS DA CROMATOFOLHA	Diâmetro médio da cultura em mm [*]		
	Exp.1	Exp.2	M ^{**}
1	19,1	26,0	22,6
2	14,8	16,0	15,4
3 ^{***}	7,1	9,6	8,4
4	11,8	11,7	11,7
5	13,2	15,5	14,4
6	15,4	21,3	18,4
7	14,0	20,4	17,2
8	19,3	19,9	19,6
9	15,9	20,5	18,2
10	16,9	18,6	17,8
Controle ^{****}	16,3	17,3	16,8

* Média do crescimento em 4 repetições, por experimento.

** Média dos experimentos 1 e 2.

*** Composto 1 (C₁).

**** 10 µl de EtOH.

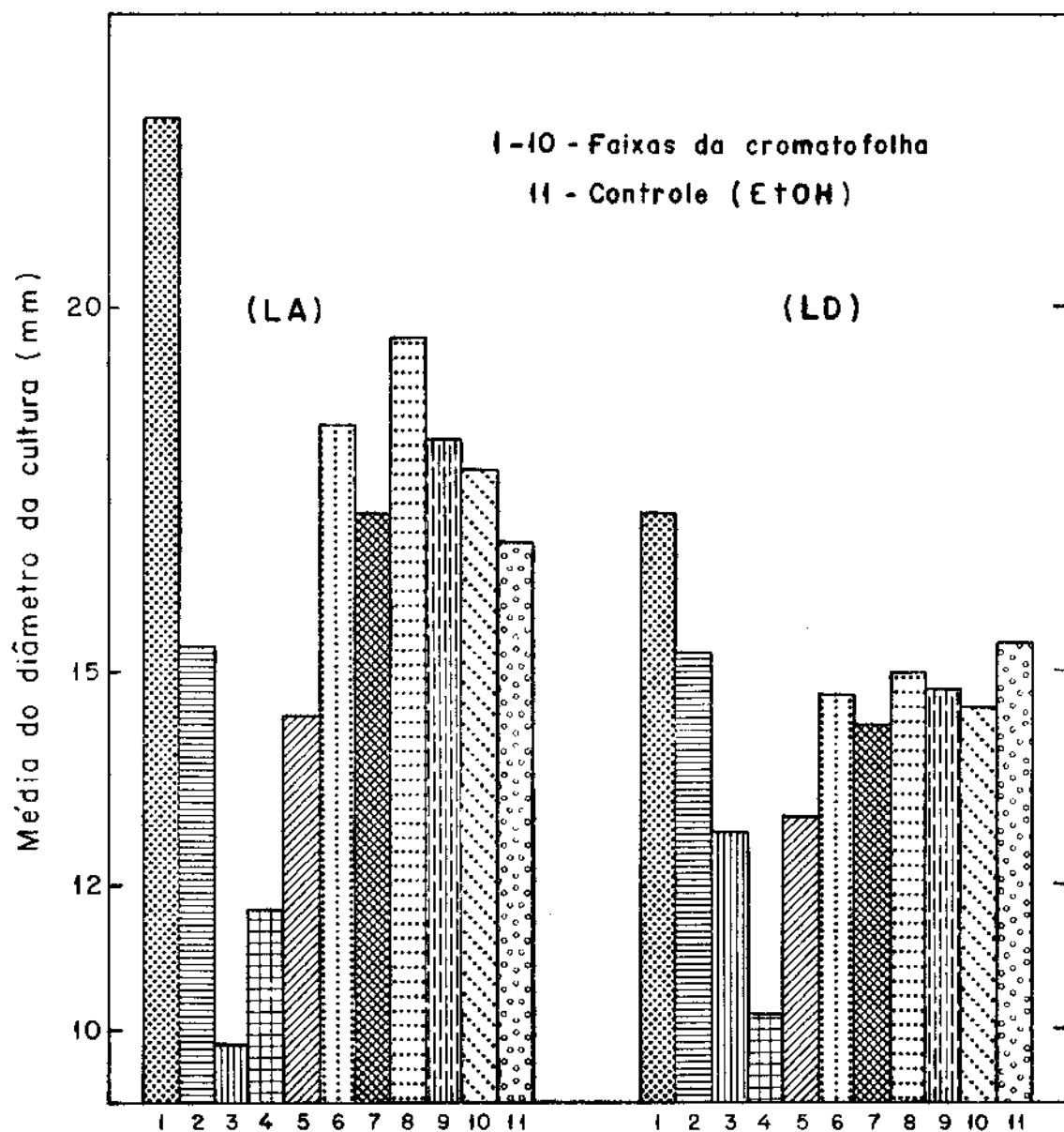


Fig.18 - Ação das substâncias dos extratos de ramos inoculados de laranjeira azeda (LA) e laranjeira doce (LD), separadas pela cromatografia em sílica, no crescimento micelial de P.citrophthora.

Tabela VII. Ação das substâncias do extrato de ramos de la ranjeira doce inoculada (LDRI-72 h) ,separadas por cromatografia em sílica, no crescimento mi celial de P.citrophthora.

FAIXAS DA CROMATOFOLHA	Diâmetro médio da cultura em mm [*]		
	Exp.1	Exp.2	M ^{**}
1	17,3	17,1	17,2
2	15,0	15,6	15,3
3	12,5	13,0	12,8
4	9,8	10,5	10,2
5	13,5	12,5	13,0
6	15,9	13,5	14,7
7	13,5	15,0	14,3
8	13,3	16,8	15,0
9	12,6	17,0	14,8
10	13,3	15,7	14,5
Controle ^{***}	15,4	15,5	15,4

* Média do crescimento em 4 repetições, por experimento.

** Média dos experimentos 1 e 2.

*** 10 µl de EtOH.

celial de P.citrophthora, calculada pela transformação dos dados em probitos (FINNEY, 1952) correspondeu a 75mg/10 µl em base de peso fresco (Tabela VIII).

4.10 - Bioensaios com outros fungos patogênicos e não patogênicos.

O crescimento do fungo nas substâncias presentes nas faixas 1 e 3 da cromatofolha de LACI-72 h foi comparado com o crescimento nos controles com EtOH.

O crescimento de P.parasitica, P.cinnamomi e H. carbonum foi inibido pelas substâncias do eluído da faixa 1 da cromatofolha do extrato de LACI-72 h. Essas substâncias inibiram, parcialmente, o crescimento de P.infestans e C.lindemuthianum, não alterando o crescimento de Pythium sp. Uma moderada ação estimuladora do crescimento foi verificada com C.scoparium (Tabela IX e Figura 19).

O C₁ inibiu o crescimento micelial de P.parasitica, P.cinnamomi, P.infestans e Pythium sp.. Verificou-se uma moderada ação estimuladora no crescimento de C.scoparium (Tabela IX e Figura 19).

4.11 - Características do C₁

Os valores de Rf do C₁, nos diversos sistemas de solventes, foram comparados com valores de Rf do ácido cafeico (ACf), ácido 3,4 dimetoxicinâmico (A 3,4-DMC) e do ácido clorogênico (ACl). Verificou-se que o C₁ apresentou, em quatro dos solventes empregados, valores de Rf iguais ao do A 3,4-DMC e ao do ACf (Tabela X).

Após hidrólise ácida não foram reveladas substâncias cor-

Tabela VIII. Efeito de diferentes concentrações do composto 1 (C₁) no crescimento micelial de P. citrophthóra.

CONCENTRAÇÕES DO C ₁ mg/10 µl *	Média do diâmetro da cultura em mm *
	M **
800,00	0,00
400,00	0,00
200,00	0,00
100,00	4,00
50,00	14,60
25,00	17,20
12,50	17,10
6,25	17,20
0,00	14,60

* Peso fresco do tecido.

** Média de 4 repetições.

Tabela IX. Ação das substâncias do extrato de casca (C) de laranjeira azeda inoculada (LACI-72 h) no crescimento micelial de fungos patogênicos e não patogênicos.

FUNGOS	Média do diâmetro da cultura em mm [*]			
	Faixa 1	Controle ^{**}	Composto 1	Controle ^{**}
<u>C.scoparium</u>	11,0	8,0	12,0	10,0
<u>C.lindemuthianum</u>	8,0	15,0	11,6	13,6
<u>H.carbonum</u>	0,0	17,8	15,1	17,0
<u>Pythium</u> sp	25,8	34,1	2,0	34,1
<u>P.cinnamomi</u> ***	0,0	19,1	0,0	16,6
<u>P.infestans</u>	3,5	18,0	0,0	18,0
<u>P.parasitica</u> ***	0,0	16,5	0,0	14,2

* Média de 3 repetições.

** 10 µl de EtOH.

*** Fungos patogênicos.

Fig.19 - Crescimento micelial de C.scoparium (Cs), C.lin-
demuthianum (Cl), H.carbonum (Hc), Pythium sp
(Psp), P.cinnamomi (P.cina), P.infestans (Pi) e
P.parasitica (Pp) nos eluídos da faixa 1 e faixa
3 (Composto 1) da cromatofolha com extrato de
LACI-72 h.

- A 1 = Faixa 1
 2 = Controle (EtOH)

- B 1 = Faixa 3 (Composto 1)
 2 = Controle (EtOH)

A CL



1



2

A Cs



1

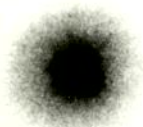


2

A Hc



1



2

A Psp



1



2

A Pcina



1



2

A Pi



1



2

A Pp



1



2

B CL



1



2

B Cs

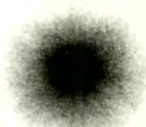


1



2

B Hc



1



2

B Psp



1



2

B Pcina



1



2

B Pi



1



2

B Pp



1



2

Tabela X. Valores de Rf do "composto 1" (C₁), ácido cafeico (ACf), ácido clorogênico (ACl) e ácido 3,4 di metoxycinâmico (A 3,4-DMC).

SOLVENTES	ACf	ACl	A 3,4-DMC	C ₁
BAcA (4:1:1)	0,80	0,63	0,90	0,90
AcA (15:85)	0,50	-	0,72	0,65
iPAmA (8:1:1)	0,50	0,70	0,77	0,80
AcAcA (11:2:2)	0,99	0,84	0,99	0,99
FA (73:27)	0,74	0,88	0,90	0,99
TAcA (4:1:5)	0,00	-	0,00	0,00
BE (80:20)	0,00	0,00	0,16	0,30
A	0,62	0,86	0,78	0,60
CACM (50:5:45)	0,99	-	0,99	0,99

respondentes a açúcares no cromatograma da fração aquosa pulverizado com anilina difenilamina. Na fração orgânica do hidrolisado, cromatografada em BAcA, detectou-se o C_1 pelo exame ao UV.

O teste de Molisch foi negativo na fração aquosa do hidrolisado alcalino. A fração orgânica, cromatografada em AcA, mostrou ao UV uma mancha amarela com R_f 0,50.

A espectrofotometria de absorção do C_1 ao UV mostrou picos máximos de absorção em 258, 296 e 325nm (Figura 20).

O C_1 deu reação positiva com ácido sulfanílico (laranja), tricloreto férrico/ferrocianeto de potássio (azul) e tri cloreto de antimonio (cinza). O C_1 não deu reação com tricloreto férrico, Folin-Denis, anilina difenilamina e ácido sulfúrico 2%.

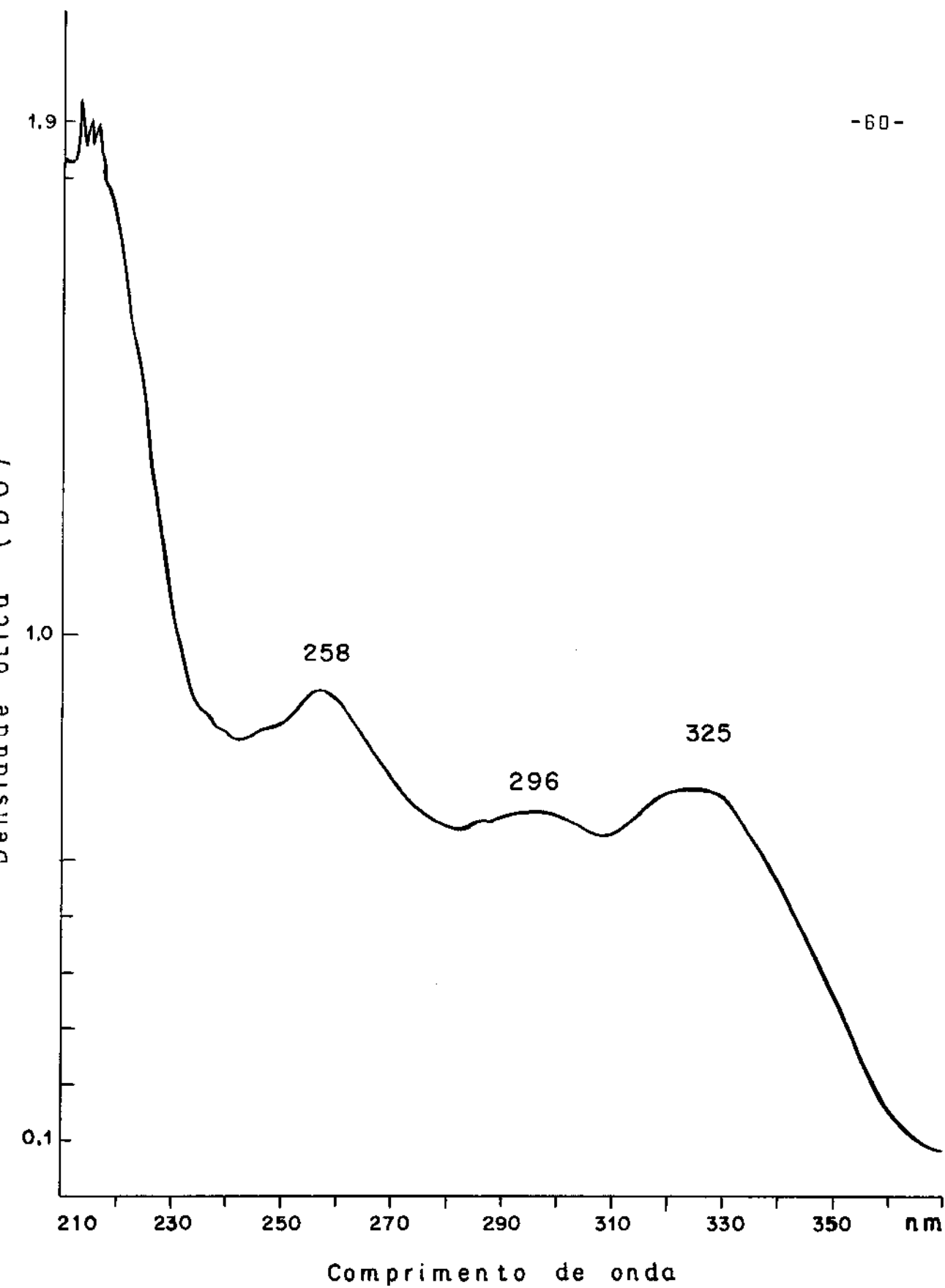


Fig.20 - Espectro de absorção do "composto 1" (C₁) ao ultra violeta.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos bioensaios mostraram que os tecidos de LA inoculados com P.citrophthora e extraídos após um período de incubação de 72 h inibiram o crescimento micelial deste fungo (Tabelas III e IV). Nos extratos de cascas e ramos de LA cromatografados e examinados ao UV verificou-se que, desde o período de 24 h de incubação com o patógeno, os tecidos de LA desenvolveram uma substância (C_1) em resposta à inoculação. O bioensaio com substâncias do extrato de cascas inoculadas de LA separadas pela cromatografia, mostrou que o C_1 possui ação fungitóxica sobre P.citrophthora, inibindo totalmente o crescimento do fungo (Tabela V). Quando as substâncias dos extratos de LARI-72 h foram separadas pela cromatografia e ensaiadas verificou-se ser o C_1 o responsável pela inibição que os extratos de LARI-72 h exerceram no crescimento micelial de P.citrophthora (Tabela VI). O C_1 não foi detectado nos cromatogramas de LD após inoculação com o patógeno.

Alguns autores relataram a produção de fitoalexinas por hospedeiros resistentes e suscetíveis após inoculação com fungos patogênicos. Assim, PIERRE e BATEMAN (1967) verificaram a produção de duas fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro suscetíveis a Rhizoctonia solani, após a infecção com este patógeno. MUSSELL e STAPLES (1971) verificaram que em decorrência da inoculação com Phytophthora fragariae dois compostos, inibidores "in vitro" desse fungo, foram detectados no hospedeiro resistente, sendo que um deles foi comum aos dois hospedeiros e produzido pela variedade suscetível somente cinco dias após a inoculação. Os resultados que obtivemos nos bioensaios e nas cromatografias sugerem que um composto semelhante a uma

fitoalexina (C_1) foi desenvolvido apenas pelos tecidos de LA, hospedeiro resistente após inoculação com o patógeno P.citrophthora. KLARMAN e GEDERMAN (1963) demonstraram que apenas as folhas de soja de uma variedade resistente a Phytophthora sojae produziam a FASEOLINA, após inoculação com o patógeno. TOMIYAMA et al. (1968b) relataram o desenvolvimento da RISHITINA apenas em tubérculos de batata incompatíveis a todas as raças de P.infestans. Assim, os resultados obtidos em Citrus são semelhantes àqueles obtidos por KLARMAN e GEDERMAN na soja e por TOMIYAMA na batata.

Os extratos de ramos de LD, hospedeiro suscetível, inoculados com P.citrophthora e extraídos após 72 h também inibiram o crescimento de P.citrophthora no bioensaio (Tabela IV). Nos cromatogramas de ramos e cascas de LD, examinados ao UV, verificou-se a presença de um composto (C_2) detectado após a inoculação nos tecidos incubados por 48 h com o patógeno. No bioensaio com substâncias dos extratos de ramos de LD, separadas pela cromatografia, verificou-se que a faixa 4 apresentou ação inibidora no crescimento de P.citrophthora (Tabela VII). Essa faixa contém o C_2 que foi também detectado nos extratos de ramos destacados de LA e inoculados segundo a técnica 2, sendo a presença desta substância limitada aos tecidos onde ocorreu o desenvolvimento do fungo. Embora o fungo P.citrophthora tenha tido seu desenvolvimento inibido nos bioensaios com extratos de ramos do hospedeiro suscetível ele se desenvolveu nos ramos inoculados desse hospedeiro. O composto desenvolvido deveria apresentar nos ramos uma ação inibidora suficiente para impedir o desenvolvimento do patógeno no tecido. O C_2 foi detectado nos cromatogramas dos tecidos extraídos após 48 h da inoculação e poderia ser considerado como uma resposta do tecido dos dois hospedei

ros ao fungo ou um produto do metabolismo do fungo nos tecidos inoculados. Segundo KUC' (1968) não é apenas a capacidade de desenvolver a substância inibidora que confere resistência ao tecido. A quantidade e a rapidez com que essa substância é sintetizada são fatores críticos em uma efetiva resposta de resistência.

Foi necessária uma concentração do C_1 correspondente a 100 mg em 10 μ l em base do peso fresco do tecido, para inibir completamente o crescimento micelial de P.citrophthora (Tabela VIII). A dose média efetiva de inibição (DE_{50}) foi de 75mg/10 μ l (Tabela VIII). Esses dados de inibição são menores quando comparados com os valores apresentados para outras fitoalexinas. THOMAS e ALLEN (1969) relataram para o SAFINOL, composto fungitóxico produzido pelo açafrão após inoculação com P.drescheleri, uma DE_{50} de 12 μ g. CONDON e KUC' (1960) verificaram que na concentração de 1×10^{-3} M a ISOCUMARINA inibiu o crescimento do C.fimbriata. BELL (1967) observou que a concentração de GOSSIPOL necessária para inibir o V.albo-atrum foi de 31 μ M. TOMIYAMA et al. (1968b) e ISHIZAKA et al. (1969) relataram que a dose média efetiva de RISHITINA sobre o crescimento dos tubos germinativos de raças de P.infestans foi de $2,1 \times 10^{-4}$ M. Os resultados sugerem que o C_1 , produzido pelos tecidos de LA em resposta a inoculação com P.citrophthora, possui atividade fungitóxica menor que a das fitoalexinas relatadas por esses autores.

A produção de compostos fungitóxicos tem sido relatada como independente da patogenicidade do fungo utilizado. A produção da FASEOLINA pelos tecidos de feijoeiro foi constatada tanto após a inoculação com fungos patogênicos, quanto com os não patogênicos. CRUICKSHANK e PERRIN (1969) isolaram a FASEOLINA de vagens destacadas de feijoeiro após

a inoculação com o não patógeno Monilinia fructicola. PIERRE e BATEMAN (1967) verificaram a produção desse mesmo composto nas vagens do feijoeiro após inoculação com o patógeno R.solani, enquanto que RAHE et al. (1969) isolaram a FASEOLINA após inoculação com o patógeno C.lindemuthianum. Em tubérculos de batata, a produção de RISHITINA e FITUBERINA foi verificada por VARNS et al. (1971) após inoculação com o patógeno P.infestans e com os não patógenos C.fimbriata e H.carbonum. Nos ramos e cascas de LA verificamos a produção de C_1 após a inoculação com os patógenos P.citrophthora, P.cinnamomi e P.parasitica, não ocorrendo desenvolvimento do C_1 quando esses tecidos foram inoculados com os não patógenos C.paradoxa e P.infestans, diferindo, assim, nossos resultados dos relatados pela grande maioria dos autores. Segundo KUC' (1964) após a inoculação com um fungo, a qualidade da resposta é dependente do tecido inoculado, e o fungo determinaria a quantidade da fitoalexina produzida. Os resultados que obtivemos sugerem que nos ramos e cascas de LA ocorreu uma resposta específica a inoculação (C_1) com os fungos patogênicos P.citrophthora, P.parasitica e P.cinnamomi, ou ainda que o potencial de inóculo dos fungos não patogênicos não foi suficiente para estimular uma resposta do tecido.

Parece-nos pouco provável que o C_1 seja um produto do metabolismo do fungo ou parte inerente do micélio deste, uma vez que este composto não foi detectado, cromatograficamente, nos extratos de tecidos inoculados do hospedeiro suscetível, onde o crescimento do fungo foi maior. A evidência de uma interação parasita-hospedeiro ficou comprovada nos experimentos com tecidos mortos (ramos autoclavados), onde não ocorreu a produção do C_1 . Segundo a observação ao UV dos extratos cromatografados o C_1 foi detectado, somente, nos cromatogramas provenientes de tecidos vivos inoculados com fun

go não autoclavado.

A análise do conteúdo de fenóis mostrou que a quantidade total de compostos fenólicos aumentou nos tecidos inoculados de LA e LD em resposta à inoculação e, em consequência da lesão mecânica nos tecidos não inoculados (Figura 9). Nos extratos de ramos de LA e LD inoculados e extraídos após 48 h determinou-se, em comparação aos extratos de 0 h, o maior aumento do total de fenóis, havendo um decréscimo nos extratos de ramos dos dois hospedeiros inoculados e extraídos após 72 h. Esse decréscimo poderia ser explicado pela presença de fenóis oxidados. Nos ramos de LA inoculados com P.citrophthora verificou-se, 24 h após a inoculação, em certos pontos do lenho o início da reação de hipersensibilidade. Essa reação é caracterizada pelo escurecimento do tecido resistente inoculado e é consequência da transformação oxidativa dos fenóis simples em fenóis oxidados, sendo que, a união destes origina as quinonas. Estas são tóxicas aos microrganismos e, seu desenvolvimento nos tecidos inoculados de LA poderia, também, explicar o menor crescimento do fungo nos mesmos e nos extratos bioensaiados (Tabela IV e Figura 11). Esta suposição é apoiada por trabalhos como os de LE TOURNEAU et al. (1957) que constatarem o efeito fungitóxico das quinonas no crescimento "in vitro" do V. alboatrum. Também OKU (1960) verificou que o catecol oxidado pela polifenoloxidase produzida pelo fungo Cochliobolus miyabeanus foi altamente fungitóxico à germinação e ao crescimento micelial desse fungo. Reação de hipersensibilidade menos intensa (Figura 2) foi também verificada nos ramos de LD inoculados, indicando a presença de fenóis oxidados e quinonas, que poderiam explicar a ação inibidora que os extratos do hospedeiro suscetível apresentaram no bioensaio (Tabela IV e Figura 11).

A reação de hipersensibilidade foi menos visível nas cascas

de LA inoculadas e incubadas por 72 h comparando-se ao es-
curecimento apresentado pelos ramos inoculados desse hos-
pedeiro. O total de fenóis nas cascas inoculadas de LA
também foi menor que o obtido nos extratos de ramos. En-
tretanto, maior inibição no crescimento micelial de P.cit-
trophthora no bioensaio, foi verificada com C_1 eluído das
cromatofolhas de extratos de cascas inoculadas de LA (Ta-
belas V e VI). Esse resultado parece ressaltar a impor-
tância da ação fungitóxica do C_1 nos tecidos do hospedei-
ro resistente.

Outro indício do aumento de fenóis nos ramos inoculados
de LA e LD foi constatado pela espectroscopia de absorção
ao UV dos extratos, verificando-se um aumento de DO na
região do espectro correspondente a absorção apresentada
pelos anéis fenólicos. A lesão mecânica também induziu o
aumento de fenóis nos ramos de LA e LD, pois, os tecidos
dos dois hospedeiros, não inoculados e incubados por 72 h,
apresentaram absorção maior que os extratos de zero hora,
demonstrando que os tecidos do hospedeiro resistente e do
suscetível responderam à invasão pelo fungo e ao dano
mecânico, sendo essas respostas mais acentuadas para a
LA (Figuras 4 e 5).

Nos extratos de cascas de LA verificou-se um deslocamento
do pico máximo de absorção do extrato de LACI-72 h, auge-
rindo uma possível síntese de substâncias com caracterís-
ticas diversas às das substâncias dos extratos de cascas
não inoculadas de LA (Figura 6). Nos extratos de cascas
de LD observou-se ausência do pico menor de absorção em
325nm nos extratos de tecidos inoculados e nos que foram
submetidos à lesão mecânica, quando comparados aos extra-
tos de zero hora. Esta observação sugere degradação ou
oxidação de alguma substância do extrato de LD 0 h por le-

são mecânica e pelo estabelecimento do patógeno nos tecidos deste hospedeiro (Figura 7).

Quando as plantas foram inoculadas verificou-se, pelo exame dos cromatogramas ao UV, que os tecidos de LA não desenvolveram o C_1 após a inoculação com P.citrophthora. Diversos autores utilizaram órgãos destacados das plantas para o estudo dos fenômenos verificados após a inoculação e comprovaram que as mesmas alterações são constatadas nas plantas inoculadas. BELL (1967, 1968) verificou a produção de GOSSIPOL nos ramos destacados de plantas de algodoeiro, obtendo a mesma resposta com plantas intactas. Esses resultados diferem dos que obtivemos, uma vez que o C_1 foi desenvolvido pelos ramos e cascas de LA somente nos experimentos de inoculação com o órgão destacado da planta. Entretanto, técnicas diferentes foram utilizadas para inoculação nos tecidos destacados e nas plantas: a técnica 1 e a técnica 2, respectivamente. Utilizando-se as duas técnicas na inoculação de ramos destacados das plantas, verificou-se que o C_1 é detectado somente nos tecidos inoculados segundo a técnica 1, demonstrando que a técnica empregada na inoculação é importante no desenvolvimento do C_1 pelos tecidos inoculados. Todavia, essa técnica não reproduz a infecção natural. Na natureza, o fungo penetraria através de pequenos ferimentos na casca, ou por um contacto prolongado com a mesma. Na técnica 1 é a face interna da casca que fica em contacto direto com o patógeno. Provavelmente, devido a grande área do tecido que é exposta à inoculação, ocorre interação de um maior número de células do hospedeiro com a suspensão micelial provocando uma resposta drástica do tecido em condições totalmente diversas da infecção natural. Também CRUICKSHANK e PERRIN (1960, 1961) adotaram na ervilha uma técnica de inoculação "in vitro" diferindo da infecção natural, uti-

lizando vagens destacadas e inoculando M.fructicola e A. pisi na parte interna das mesmas. A PISATINA foi constatada nesses experimentos "in vitro" e também quando os autores inocularam as vagens nas plantas de ervilhas "in vivo".

Separando-se casca e lenho, a fim de se utilizar isoladamente essas duas partes do ramo, provocou-se intensa lesão mecânica ao tecido. Conforme a observação dos cromatogramas ao UV o tecido de casca de LA não inoculado e incubado por 72 h também produziu o C_1 . Esse resultado mostra que a lesão mecânica pode levar à produção pelas cascas de LA do mesmo composto que foi desenvolvido em resposta a inoculação com o patógeno. O espectro de absorção ao UV dos eluídos da faixa 3 da cromatofolha com extratos de cascas de LA não inoculadas e extraídas após 72 h (LAC-72 h), mostrou que houve maior produção do C_1 em consequência da inoculação (Figura 17). Esse dado é semelhante aos relatados por KUC' (1964) que estabeleceu que fenóis e fitoalexinas podem ser também produzidos em concentração menor, em resposta à lesão mecânica ou após tratamento dos tecidos com substâncias químicas. CONDON e KUC' (1962) verificaram que discos de raiz de cenoura, parcialmente imersos na água, produziram a ISOCUMARINA, embora a quantidade detectada correspondesse a aproximadamente 2% da obtida pela inoculação com C. fimbriata. KUC' (1964) observou que 72 h após a inoculação da raiz da cenoura com C. fimbriata, através da casca e não em uma superfície cortada (discos), o nível da ISOCUMARINA na camada de células mais externa da raiz foi de 1 a 2×10^{-2} M. Esse método de inoculação é idêntico ao encontrado na infecção natural, e a resposta observada é ao fungo e não à lesão mecânica.

Além do C_1 , verificou-se no bioensaio com substâncias se

paradas pela cromatografia do extrato de cascas de LA, inoculadas e extraídas após 72 h (LACI-72 h), que o eluído da faixa 1 da cromatofolha contém inibidores do crescimento micelial de P.citrophthora. O eluído dessa faixa desenvolvido em cromatografia dupla e o cromatograma examinado ao UV mostrou uma fluorescência maior das manchas em comparação com os cromatogramas de extrato de cascas de LA não inoculadas (LAC-0 h e LAC-72 h), sugerindo que a produção dos compostos aumentou após a inoculação. A reação de cor ao UV e os Rfs em BE sugerem compostos relacionados com ácidos fenólicos, como ácido cafeico, clorogênico, ferúlico e cumárico. KUC' (1968) relatou para uma grande variedade de hospedeiros o acúmulo do ácido clorogênico e do ácido cafeico, ao redor dos lugares de infecção e de lesão física dos tecidos. Segundo KUC' (1968) a síntese de compostos mais específicos, como as fitoalexinas, parece ser limitado a uma pequena faixa de hospedeiros, como a ISOCUMARINA na cenoura, a FASEOLINA no feijoeiro, a PISATINA na ervilha, etc. Conforme os resultados que obtivemos ocorreria nos tecidos de LA, hospedeiro resistente, um acúmulo de ácidos fenólicos e a síntese de um novo composto (C_1) em resposta à inoculação com o patógeno P.citrophthora. Em menor intensidade as mesmas respostas foram obtidas pelas cascas de Azeda ao dano físico.

Em experimentos de campo, KLOTZ et al. (1968) verificaram que porta-enxertos de Trifoliata não adquiriram gomose em solos altamente infestados com Phytophthora spp. porém, se tornavam infectados após retirada da casca e inoculação direta do fungo no cambio. Esses autores sugeriram que as camadas da casca eram importantes para a resistência. Quando utilizamos casca e lenho separadamente para a inoculação com P.citrophthora, verificamos, pe-

lo exame dos extratos cromatografados ao UV, que é a casca, o órgão responsável pela produção do C_1 . A habilidade da casca do hospedeiro resistente em produzir um composto inibidor do crescimento "in vitro" de P.citrophthora parece-nos, como já sugerido por KLOTZ et al. (1968), uma evidência do papel deste tecido na resistência à doença.

A ação das substâncias da faixa 1 e do C_1 , no crescimento micelial de fungos patogênicos e não patogênicos (Tabela IX e Figura 19), mostrou que há um grau de especificidade na sensibilidade dos fungos ensaiados aos compostos produzidos pelos tecidos inoculados de LA. Segundo KUC' (1964), a produção de diversos inibidores pela planta em resposta à infecção é uma medida adicional de proteção da mesma ao ataque por diversos microrganismos. Segundo a própria definição de fitoalexinas enunciada por MULLER (1956), estas são "compostos não específicos em sua ação sobre os fungos". Normalmente, fungos não patogênicos à planta produtora de fitoalexinas são mais sensíveis a esta que os patógenos. Nossos resultados mostram que o C_1 inibe igualmente o crescimento de fungos patogênicos como o P.citrophthora, P.parasitica, P.cinnamomi e dos não patógenos P.infestans e Pythium sp, todos do grupo dos Ficomícetos. Os fungos não patogênicos como H.carbonum, C.lindemuthianum e C.scoparium não tiveram seu crescimento modificado pelo C_1 . A ação dessa substância parece, portanto, ser específica para os patógenos e não patógenos pertencentes ao grupo dos Ficomícetos.

ROSSETTI e BITANCOURT (1952) mostraram a importância da tiamina na espessura do talo das hifas de P.citrophthora e admitiram a possibilidade de substâncias, produzindo o

mesmo efeito da tiamina, presentes nas cascas de LD. MUMSMECI et al. (1970) verificaram que a adsorção de extratos metanólicos de cascas de LA e LD pelo carvão e a eluição dos compostos com diferentes solventes orgânicos, separou substâncias com ação inibidora ao crescimento de P.citrophthora. Todavia, os resultados obtidos nestes bioensaios com extratos de tecidos inoculados e não inoculados de LA e LD, sugerem que a resistência e a suscetibilidade destas espécies cítricas à gomose, não está baseada em substâncias fungitóxicas pré-existentes no hospedeiro resistente, ou no conteúdo de nutrientes do hospedeiro suscetível. Verificou-se que o fungo P. citrophthora se desenvolveu igualmente nos extratos de tecidos sadios dos dois hospedeiros, porém, os extratos provenientes de tecidos inoculados inibiram o crescimento do fungo, indicando que substâncias fungitóxicas desenvolvidas após a infecção estão envolvidas na resistência a P.citrophthora (Tabelas III, IV e Figura 11).

Os resultados obtidos nos experimentos de inoculação "in vitro", na análise cromatográfica dos extratos, nos bioensaios, na espectrofotometria de absorção ao UV mostram que o C_1 , produzido pelos tecidos de LA em resposta a inoculação com P.citrophthora preenche as características de uma fitoalexina segundo a definição de MULLER e BORGER (1940) e transcritas por CRUICKSHANK (1963), pois, o composto C_1 :

- i) se desenvolveu nos tecidos do hospedeiro resistente quando as células deste ficaram em contacto com as células do fungo;
- ii) a resposta ocorreu somente nas células vivas do hospedeiro;

iii) possui ação fungitóxica sobre o patógeno e uma toxidez não específica sobre os outros fungos;

iv) possui propriedades que tornaram óbvia sua natureza como um composto químico.

Todavia, os resultados obtidos com os tecidos destacados das plantas não podem ser extrapolados para uma situação "in vivo", uma vez que a técnica empregada para inoculação é importante na produção do C_1 pelos tecidos de LA.

Os resultados de alguns bioensaios de extratos de ramos inoculados dos dois hospedeiros, mostrou que ocorre inibição no crescimento micelial de P.citrophthora com extratos provenientes de tecido do hospedeiro suscetível, demonstrando que, embora tardia, uma resposta ocorre na laranjeira doce em consequência da inoculação e da invasão de seus tecidos pelo patógeno. Investigações devem ser feitas em torno deste problema, utilizando-se outras variedades de Citrus sinensis Osbeck.

Considerações sobre a natureza química do C_1

Os experimentos realizados com reveladores, hidrólises e espectrofotometria ao UV não são suficientes para a identificação do C_1 , permitindo, apenas, algumas considerações sobre a sua estrutura química.

O C_1 reagiu positivamente com reveladores comumente empregados para identificação de fenóis como o ácido sulfanílico e o cloreto férrico/ferrocianeto de potássio. Segundo SEIKEL (1964) esses reveladores reagem com a maioria dos compostos fenólicos, não sendo específicos para um determinado grupo de fenóis. Por outro lado, o C_1

apresentou fluorescência azul ao UV intensificada com vapores de amônia. Ainda, de acordo com SEIKEL (1964) essa reação é apresentada pelos ácidos cinâmicos e derivados. Segundo MABRY et al. (1970), essa mesma reação se verifica para isoflavonas nas quais falta a hidroxila livre na posição 5. GEISSMAN (1955) relata que ácidos cinâmicos como o cafeíco, ferúlico e o ácido 3,4-dimetoxicinâmico apresentam essa reação ao UV. Essas observações nos levaram a comparar os Rfs do ácido cafeíco, e do 3,4-dimetoxicinâmico com os Rfs do C₁ em uma série de solventes (Tabela X). Todavia, os Rfs do C₁ e do ácido 3,4-dimetoxicinâmico foram iguais em apenas 4 dos 9 solventes empregados e com o ácido cafeíco apenas em 3 solventes houve coincidência de Rfs.

Ainda em relação aos reveladores, o tricloreto de antimônio é empregado, segundo RANDERATH (1966), na revelação de fenóis, terpenos e esteroides. Assim, a reação positiva do C₁ com esses reveladores sugeriria uma substância que poderia conter, além do anel fenólico, grupos terpênicos e/ou esteroides em sua molécula.

Após a hidrólise ácida e alcalina não foram positivas as reações para açúcares no hidrolisado. Este resultado parece-nos indicar que o C₁ é uma aglicona e não um glicosídeo, embora, segundo HARBONE (1964), alguns glicosídeos fenólicos são estáveis, durante horas, à hidrólise ácida.

Dados acerca da pureza do composto devem, ainda, ser obtidos para a identificação do mesmo através de análises ao infra-vermelho, espectrofotometria ao UV e espectroscopia de massa.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. Um composto com características de uma fitoalexina foi desenvolvido pelos tecidos do hospedeiro resistente, laranja azeda, após inoculação "in vitro" com o patógeno P.citrophthora.
2. Nos tecidos dos dois hospedeiros (laranja azeda e laranja doce), houve acúmulo de fenóis em consequência da inoculação, sendo esse acúmulo maior nos tecidos do hospedeiro resistente..
3. Reação de hipersensibilidade foi visível nos ramos inoculados do hospedeiro resistente (laranja azeda) e, em menor intensidade, nos ramos do hospedeiro suscetível, demonstrando a ocorrência de fenóis oxidados.
4. Os resultados sugerem que o mecanismo bioquímico de resistência da laranja azeda à Phytophthora citrophthora, poderia ser, em parte, explicado pelo desenvolvimento de compostos fungitóxicos sintetizados ou acumulados após a penetração do patógeno.

7. RESUMO

O desenvolvimento de compostos neo-sintetizados e acumulados após inoculação com Phytophthora citrophthora foi verificado em tecidos de duas espécies cítricas - Citrus aurantium L. (laranjeira azeda) e Citrus sinensis Osbeck (laranjeira doce), respectivamente resistente e suscetível a esse fungo. Casca, lenho e ramos dos dois hospedeiros foram colocados em placas de Petri e inoculados com uma suspensão micelial do fungo. Em diferentes períodos após a inoculação os tecidos foram extraídos com Etanol 95% à quente e os extratos concentrados foram cromatografados e bioensaiados.

O exame à luz ultra-violeta detectou nos cromatogramas de extratos de cascas e ramos de laranjeira azeda inoculada, um composto fluorescente com Rf 0,30 em Benzeno : Éter (80:20). Esse composto foi denominado "composto 1" (C_1) e é sintetizado pelos tecidos do hospedeiro resistente 24 horas após a inoculação. A região do ramo importante para a síntese desse composto foi a casca, não se observando o desenvolvimento do C_1 nos tecidos do lenho. O C_1 foi desenvolvido também em resposta à lesão mecânica nos tecidos de casca não inoculados e incubados por 72 horas.

O C_1 foi produzido pelos tecidos de laranjeira azeda em resposta à inoculação com os patógenos Phytophthora parasitica e Phytophthora cinnamomi e não foi produzido após a inoculação com os não patógenos Phytophthora infestans e Ceratocystis paradoxa.

Os tecidos de laranjeira doce não desenvolveram o C_1 em resposta à inoculação com o patógeno. Os extratos de ra

mos e cascas cromatografados mostraram, pela observação dos cromatogramas ao ultravioleta, uma substância com Rf 0,36 em Benzeno:Éter (80:20). Essa substância foi denominada "composto 2" (C₂) e foi determinada nos extratos de 48 e 72 horas após a inoculação com P.citrophthora.

Extratos de tecidos inoculados com P.citrophthora - ramos e cascas de laranjeira azeda e ramos de laranjeira doce (72 h) - inibiram o crescimento micelial de P.citrophthora no bioensaio. Extratos de cascas inoculadas de laranjeira doce (72 h) não alteraram o crescimento micelial de P.citrophthora nos bioensaios. A ação inibidora dos extratos de cascas de laranjeira azeda é consequência do C₁ e de substâncias acumuladas após inoculação situadas na faixa 1 da cromatoplaça do extrato cromatografado em Benzeno:Éter (80:20). No bioensaio com substâncias dos extratos de ramos de laranjeira azeda, separadas pela cromatografia, a inibição foi causada pelo C₁. Nos extratos de laranjeira doce a inibição ocorreu com o eluído da região da cromatofolha que contém o C₂.

O C₁ inibiu o crescimento de P.parasitica, P. cinnamomi e do Pythium sp. As substâncias da faixa 1 inibiram o crescimento de P.parasitica, P.cinnamomi, P.infestans, Helminthosporium carbonum e Colletotrichum lindemuthianum.

A dosagem efetiva do C₁ capaz de inibir em 50% (DE₅₀) o crescimento micelial de P.citrophthora foi de 75mg/10µl.

Não ocorreu produção do C₁ pelos tecidos de LA quando um dos organismos foi autoclavado antes da inoculação.

O C_1 foi eluído de cromatogramas e seu espectro de absorção ao UV apresentou picos máximos em 258, 286 e 325 nm.

O total de fenóis foi analisado por uma modificação do método de Folin-Denis e os resultados expressos como equivalentes de ácido p-cumárico/g de peso fresco do tecido. Nos extratos de casca e ramos do hospedeiro resistente e do hospedeiro suscetível os fenóis aumentaram em consequência da inoculação e também pela lesão mecânica. O aumento de fenóis em consequência da inoculação foi maior nos tecidos do hospedeiro resistente em comparação com o aumento nos tecidos do hospedeiro suscetível, ocorrendo o máximo de acúmulo de fenóis nos tecidos de ramos extraídos após 48 horas da inoculação. Nas cascas do hospedeiro resistente inoculado o maior acúmulo de fenóis foi verificado nos extratos de 72 horas.

Reação de hipersensibilidade foi visível nos ramos dos dois hospedeiros 72 horas após a inoculação, tendo se iniciado nos ramos de laranjeira azeda no período de 24 horas de incubação com o patógeno.

A inoculação nas plantas mostrou que a produção do C_1 pelos tecidos destacados de laranjeira azeda inoculados com P.citrophthora está condicionada a técnica de inoculação, que não reproduz a infecção natural.

Esta pesquisa demonstrou que a inoculação de P.citrophthora, nos ramos destacados de laranjeira azeda e laranjeira doce, acarreta nos tecidos dos dois hospedeiros um acúmulo de substâncias fenólicas e de fenóis oxidados com ação fungitóxica sobre o patógeno "in vitro". No

hospedeiro resistente parece ocorrer a síntese de um neo-composto cujas características são semelhantes às de uma fitoalexina.

A. SUMMARY

The development of newly synthesized compounds which accumulate after inoculation with Phytophthora citrophthora was verified in tissues of two Citrus varieties - Citrus aurantium L (sweet orange) and Citrus sinensis Osbeck (sour orange), respectively resistant and susceptible to this fungus. Detached bark, wood and stems of both hosts were placed in Petri dishes and inoculated with a mycelial suspension of the fungus. At different periods after inoculation the tissues were extracted with hot 95% Ethanol and the concentrated extracts were chromatographed and bioassayed.

A fluorescent compound with Rf 0.30 in Benzene:Ether(80:20) was detected in chromatograms of bark and stems of inoculated sour orange by observation under the ultraviolet light. This compound was named Compound 1 and it was developed in the resistant host tissues 24 hours after inoculation. Compound 1 was detected only in bark extracts when bark and wood were inoculated separately. Compound 1 was also developed after 72 h in response to mechanical injury in incubated and noninoculated bark tissues.

Compound 1 was produced by sour orange in response to inoculation with the pathogens P.parasitica and P.cinnamomi, but not after inoculation with the non-pathogens P.infestans and C.paradoxa.

Sweet orange tissues did not develop Compound 1 in response to inoculation with the pathogen P.citrophthora. Chromatography of extracts from stem and bark tissues showed a compound with Rf 0.36 in Benzene:Ether (80:20) which was visible under the UV light. This compound was named Compound 2 and

was detected in the extracts prepared 48 h and 72 h after inoculation with P.citrophthora.

Extracts of tissues inoculated with P.citrophthora (bark and stem of sour orange and stem of sweet orange) inhibited the mycelial growth of P.citrophthora in the bioassay. Extracts of inoculated sweet orange bark tissues did not modify the mycelial growth of P.citrophthora in the bioassay. An inhibitory action of sour orange bark extracts was caused by Compound 1 and also by substances which accumulated after inoculation. In the bioassay of substances from sour orange stem extracts that were separated by chromatography, inhibition was caused by compound 1. In the sweet orange stem extracts inhibition was produced with the chromatographed zone containing compound 2.

Compound 1 inhibited the growth of P.parasitica, P.cinnamomi and Pythium sp. Substances from zone 1 of the chromatoplate inhibited the growth of P.parasitica, P.infestans, H. carbonum and C.lindemuthianum.

The effective dose (ED_{50}) of Compound 1 that inhibits the mycelial growth of P.citrophthora was 75mg/10 μ l.

There was no production of Compound 1 by the sour orange tissues when one of the organisms was autoclaved before the inoculation.

The ultraviolet absorption spectrum of Compound 1 eluted from chromatograms showed absorption peaks at 258, 296 and 325nm.

The total amount of phenols was analysed by the Folin-Denis method and the results expressed as equivalents of

p-cumaric acid/g of fresh weight tissue. In extracts from the bark and stem of the resistant and susceptible hosts phenols increased as a consequence of inoculation or mechanical injury. The increase due to inoculation was higher in the resistant tissue than in the susceptible, and the maximum amount of phenols was in stem tissues 48 h after inoculation. In the resistant inoculated bark tissue, a high increase in the total amount of phenols was verified in the extracts 72 h after inoculation.

A hypersensitive reaction occurred in the stems of both hosts 72 h after inoculation which was visible in the sour orange stems as flecks 24 h after the incubation with the pathogen P.citrophthora.

This research shows that the inoculation of detached stem tissues of sour and sweet orange by P.citrophthora causes an increase of phenols in the tissues of both hosts with fungitoxic action toward the pathogen. In the resistant host a new compound is synthesized with characteristics of a phytoalexin-like substance.

9. LITERATURA CITADA

- ALDWINCKLE, H. - 1969 - Phytoalexin-like activity in diffusates from saflower leaves inoculated with Phytophthora deschleri. Phytopathology, 59: 1015.
- ANGELL, H.R., J.C. WALKER and K.P. LINK - 1930 - The relation of protocatheic acid to disease resistance in the onion. Phytopathology, 20: 431-448.
- BELL, A. - 1971 - Formation of gossypol in infected or chemically irritated tissues of Gossypium species. Phytopathology, 57: 759-764.
- BELL, A. - 1969 - Phytoalexin production and Verticillium wilt resistance in cotton. Phytopathology, 59: 1119-1127.
- BEN-AZIZ, A. - 1967 - Nobilitin is main fungistat in tangerines resistant to "mal secco". Science, 155: 1026-1027.
- BIEHN, W., J. KUC' and E. WILLIAMS - 1968 - Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. Phytopathology, 58: 1255-1260.
- BIEHN, W., E. WILLIAMS and J. KUC' - 1968 - Fungitoxicity of phenols accumulating in glycine max-fungi interactions. Phytopathology, 58: 1261-1264.
- BROWN, A. and T. SWINBURNE - 1972 - Benzoic acid: an antifungal compound formed in Bramley's seedling apple fruits following infection by Nectria galligena Bres. Physiological Plant Pathology, 1: 469-475.

- CARDOSO, CAIO D. NOGUEIRA - 1971 - Accumulation of phenols and phytoalexins in hypocotyls of bean infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Snyder and Hans. These Ph.D., Universidade Ohio, Ohio, U.S.A.
- CONDON, P. and J. KUC' - 1960 - Isolation of a fungitoxic compound from carrot tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 50: 267-270.
- CONDON, P. and J. KUC' - 1962 - Confirmation of the identity of a fungitoxic compound produced by carrot tissue. *Phytopathology*, 52: 182-183.
- CONDON, P., J. KUC' and H. DRAUDT - 1963 - Production of 3-methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin by carrot tissue. *Phytopathology*, 53: 1244-1250.
- CRUICKSHANK, I.A.M. and D. R. PERRIN - 1960 - Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*, 187: 799-800.
- CRUICKSHANK, I.A.M. and D. R. PERRIN - 1961 - Studies on phytoalexins. III. The isolation, assay and general properties of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Aust. J. Biol. Sci.*, 14: 336-348.
- CRUICKSHANK, I.A.M. - 1962 - Studies on phytoalexins. IV. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Aust. J. Biol. Sci.*, 15: 147-159.
- CRUICKSHANK, I.A.M. - 1963 - Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1: 351-374.
- CRUICKSHANK, I.A.M. and D. PERRIN - 1963a - Studies on

phytoalexins.VI. The effect of some factors on its formation in Pisum sativum L. and the significance of pisatin in disease resistance. Aust. J. Biol. Sci., 16: 111-128.

CRUICKSHANK, I.A.M. and D. PERRIN - 1963b - Phytoalexins of the leguminosae. Phaseollin from Phaseolus vulgaris L. Life Sci., 2: 680-682.

CRUICKSHANK, I.A.M. and D. PERRIN - 1965 - Studies on phytoalexins.IX. Pisatin formation by cultivars of Pisum sativum L. and other Pisum species. Aust. J. Biol. Sci., 18: 817-828.

DEVERALL, B. - 1967 - Biochemical changes in infection droplets containing spores of Botrytis spp. incubated in the seed cavities of pods of bean (Vicia faba L.). Ann. Appl. Biol., 59: 375-387.

DEVERALL, B. and J. VESSEY - 1969 - Role of a phytoalexin in controlling lesion development in leaves of Vicia faba after infection by Botrytis spp. Ann. Appl. Biol., 63: 449-458.

DE WIT-ELSHOVE, A. - 1968 - Breakdown of pisatin by some fungi pathogenic to Pisum sativum. Neth. J. Plant Pathol., 74: 44-47.

DE WIT-ELSHOVE, A. - 1969 - The role of pisatin in the resistance of pea plants. Some further experiments on the breakdown of pisatin. Neth. J. Plant Pathol., 75: 164-168.

DE WIT-ELSHOVE, A. and A. FUCHS - 1971 - The influence

of the carbohydrate source on pisatin breakdown by fungi pathogenic to pea (Pisum sativum L.). *Physiol. Plant Pathol.*, 1: 17-24.

FAWCETT, C.H., D.M. SPENCER, R.L. WAIN, A.G. FALLIS, E. R.H. JONES, M. LeQUAN, C.B. PAGE, V. THALLER, D.C. SHUBROOK, P.M. WHITHAM - 1968 - Natural acetylenes Part XXVIII. An antifungal acetylenic furanoid keto-ester (wyerone) from shoots of the broad bean (Vicia faba L, Fam. Papilionacea). *J. Chem. Soc. (c)*:2455-2462.

FINNEY, D.J. - 1952 - Probit analysis. 2nd ed., 29 Cambridge University Press.

GALLI, F., H. TOKESHI, P. CARVALHO, E. BALMER, H.KIMATI, C. CARDOSO, C. SALGADO - 1968 - Gomose (Podridão do colo, Podridão do pé) - Phytophthora spp. In: Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas e seu Controle. 640 p. Ed. Agron. "Ceres" Ltda.

GAUMANN, E., R. BRAUN und B. BAZZIGHER - 1950 - Über induzierte abwehrreaktionen bei Orchideen. *Phytopath. Z.*, 17: 36-62.

GAUMANN, E. und H. KERN - 1959 - Über chemische abwehrreaktionen bei Orchideen. *Phytopath. Z.*, 36: 1-26.

GAUMANN, E., J. NUESCH und R. H. RIMPAU - 1960 - Weitere untersuchungen über die chemischen abwehrreaktionen der Orchideen. *Phytopath. Z.*, 38: 274-308.

GEISMANN, T.A. - 1955 - Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments. In:

Modern Methods of Plant Analysis. Vol.III: 450-517.
Ed. K. Paech and M.V. Tracey. Springer-Verlag,
Berlin.

HARBONE, J.B. - 1964 - Phenolic glycosides and their natural distribution. In: Biochemistry of Phenolic Compounds, 129-166. Ed. J.B. Harbone, Academic Press, London and New York.

HERNDON, B.A., J. KUC' and E.B. WILLIAMS - 1966 - The role of 3-methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin in the resistance of carrot root to Ceratomyces fimbriata. Phytopathology, 56: 187-191.

HIGGINS, V. e R. MILLAR - 1968 - Phytoalexin production by alfafa in response to infection by Colletotrichum phomoides, Helminthosporium turcicum, Stemphyllium loti and S.botryosum. Phytopathology, 58: 1377-1383.

HIGGINS, V. and R. MILLAR - 1969 - Comparative abilities of Stemphyllium botryosum and Helminthosporium turcicum to induce and degrade a phytoalexin from alfafa. Phytopathology, 59: 1493-1499.

HIGGINS, V. and R. MILLAR - 1970 - Degradation of alfafa phytoalexin by Stemphyllium loti and Colletotrichum phomoides. Phytopathology, 60: 269-271.

HIURA, M. - 1943 - Studies in storage and rot of sweet potato. Sci. Rept. Gifu Coll. Agr., 50: 1-5.

ISHIZAKA, N., K.TOMIYAMA, N.KATSUI, A.MURAI and T.MASAMUNE - 1969 - Biological activities of rishitin, and antifungal compound isolated from diseased potato

- tubers and its derivatives. *Plant Cell Physiol.*, 10: 183-192.
- KLARMAN, W. and J. GEDERMANN - 1963 - Resistance of soybean to three Phytophthora species due to the production of a phytoalexin. *Phytopathology*, 53: 1317-1320.
- KEEN, N., J. SIMS, D. ERWIN, E. RICE and J. PARTRIDGE - 1971 - 6 a-hydroxyphaseollin: an antifungal chemical induced in soybean hypocotyls by Phytophthora megasperma var. sojae. *Phytopathology*, 61: 1084-1089.
- KLOTZ, J.L., W.P. BITTERS, T.A. DE WOLFE and M.J. GARBER - 1968 - Some factors in resistance of citrus to Phytophthora spp. *Plant Dis. Rep.*, 12: 952-955.
- KUC', J. - 1964 - Phenolic compounds and disease resistance in plants. In: Phenolics in Normal and Diseased Fruits and Vegetables, Ed. V.C. Runeckles, Ap. 63-81.
- KUC', J. - 1968 - Biochemical control of disease resistance in plants. *World Review of Pest Control*, 7: 42-55.
- KUC', J. - 1972 - Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopathology*, 10: 207-232.
- LETCHER, R., B. WIDDOWSON, B. DEVERALL and J. MANSFIELD - 1971 - Identification and activity of wyerone acid, as a phytoalexin in broad bean (Vicia faba) after infection by Botrytis. *Phytochem.*, 9: 249-252.
- LE TOURNEAU, D.J., J.G. McLEAN and J.W. GUTHRIE - 1957 - Effect of some phenols and quinones on growth in vitro

of Verticillium albo-atrum. Phytopathology, 47: 602-606.

LIM, S., HOOKER, A. and J. PAXTON - 1970 - Isolation of phytoalexins from corn with monogenic resistance to Helminthosporium turcicum. Phytopathology, 60: 1071-1075.

LINK, K.P., H.R. ANGELL and J.C. WALKER - 1929 - Isolation of protocatechic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. J. Biol. Chem., 81: 369-375.

LINK, K.P. and J.C. WALKER - 1933 - The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. J. Biol. Chem., 100: 379-383.

MABRY, T.J., K.R. MARKHAM and M.B. THOMAS - 1970 - The systemic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, Berlin.

MULLER, K.O., M. KLINKOWSKI und G. MEYER - 1939 - Physiologisch-genetische untersuchungen über die resistenz der kartoffel gegenüber Phytophthora infestans. Naturwissenschaften, 27: 765-768.

MULLER, L.O. und H. BORGER - 1939 - Studien über den "Mechanismus" der Phytophthora-resistenz der kartoffel. Landwirtsch. Jahrb., Berlin, 87: 609.

MULLER, L.O. und H. BORGER - 1940 - Experimentelle untersuchungen über die Phytophthora-resistenz der kartoffel. Arb. Biol. Reichsanstalt. Land-u.

Follstwirtschaft, Berlin, 23: 189-231.

MULLER, K. - 1956 - Einige einfache versuchenzum nachweis von phytoalexinen. Phytopath. Z., 27: 237-254.

MUSUMECI, M. RAPHAELA, ADELAIDE A. GROHMANN e V. ROSSETTI - 1970 - Resultados preliminares do estudo do mecanismo de resistência de variedades cítricas à gomose (Phytophthora citrophthora Sm e Sm Leoniam). Arq. Inst. Biol., 37: 137-142.

MUSUMECI, M. RAPHAELA e M.B. FIGUEIREDO - 1974 - Micro-técnica para ensaios biológicos com substâncias inibidoras do crescimento de fungos. VII Cong. Soc. Bras. de Fitopatologia, Brasília, DF.

MUSSELL, H. and R. STAPLES - 1971 - Phytoalexin-like compounds apparently involved in strawberry resistance to Phytophthora fragariae. Phytopathology, 61: 515-517.

OKU, H. - 1960 - Biochemical studies on Cochliobolus miyabeanus. IV. Fungicidal action of polyphenols and the role of polyphenoloxidase of the fungus. Phytopath. Z., 38: 342-354.

PIERRE, R. and D. BATEMAN - 1967 - Induction and distribution of phytoalexin in Rhizoctonia-infected bean hypocotyls. Phytopathology, 57: 1154-1160.

PINKAS, J., D. RAVIE and MATHILDA CHORIN - 1968 - Fungistatic constituents in Citrus varieties resistant to the "mal secco" disease. Phytochemistry, 7: 169-174.

- PROCHAZKA, Z. - 1963 - Phenole. In: Handbuch der Papier chromatographie. Vol. I: 275-285, Ed. I.M. Hais und K. Macek. Fisher Verlag, Jena.
- PURKAYASTHA, R. and B. DEVERALL - 1964 - A phytoalexin type of reaction in the Botrytis infection on leaves of bean (Vicia faba L.). Nature, 201: 938-939.
- PURKAYASTHA, R. and B. DEVERALL - 1965 - The growth of Botrytis fabae and B.cinerea into leaves of bean (Vicia faba L.). Ann. Appl. Biol., 56: 139-147.
- RAHE, J., J. KUC', C. CHUANG and E. WILLIAMS - 1969 - Induced resistance in Phaseolus vulgaris to bean anthracnose. Phytopathology, 59: 1641-1645.
- RANDERATH, K. - 1966 - Thin-Layer Chromatography. Verlag Chemie. Acad. Press, New York.
- ROSSETTI, VICTORIA - 1947 - Estudo sobre a "gomose de Phytophthora" dos citros. I. Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de "Phytophthora". Arq. Inst. Biol., 18: 97-124.
- ROSSETTI, VICTORIA e A.A. BITANCOURT - 1952 - Thiamin and the growth substances for Phytophthora in the bark of Citrus trees. Science, 115: 205-206.
- SEIKEL, MARGARET K. - 1964 - Identification of phenolic compounds. In: Biochemistry of phenolic compounds, 33-76, Ed. J.B. Harbone, Academic Press, London and New York.
- SONDHEIMER, E. - 1957 - The isolation of 3-methyl-6-me-

thoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin from carrots.
J. Ann. Chem. Soc., 79: 5036-5039.

SWAIN, T. and W.E. HILLIS - 1959 - The phenolic constituents of Prunus domestica I-The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric., 10: 63-68.

TASTALDI, H. - 1955 - Prática de Química Biológica, 1a. parte. Bioquímica Analítica Quantitativa, 5a. ed., Universidade de São Paulo, 117p.

TOMIYAMA, K., T. SAKUMA, N. ISHIZAKA, N. SATO, N. KATSUI, M. TAKASUGI and T. MASAMUNE - 1968a - A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens. Phytopathology, 58: 115-116.

TOMIYAMA, K., T. SAKUMA, N. ISHIZAKA, N. SATO, N. KATSUI, M. TAKASUGI and T. MASAMUNE - 1968b - "Rishitin", A phytoalexin-like substance. Its role in the defense reaction of potato tubers to infection. Biochemical regulation in diseased plants or injury. Phytopathological Soc. Japan, Tokyo, 287-292.

THOMAS, C.A. and E.H. ALLEN - 1970 - An antifungal polyacetylene compound from Phitophthora-infected safflower. Phytopathology, 60: 261-263.

TUITE, J. - 1969 - Media and nutrient solutions. In: Plant Pathological Methods. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 239 p.

UEHARA, K. - 1958 - On the phytoalexin production of the

- soybean pod in reaction to Fusarium sp. the causal fungus of pod blight. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 225-229.
- URITANI, I., T. AKAZAWA and M. URITANI - 1954 - Increase in respiratory rate in sweet potato tissue infected with black rot. Nature, 174: 1060.
- URITANI, I. and T. AKAZAWA - 1955 - Antibiotic effect on Ceratostomella fimbriata of ipomeamarone, an abnormal metabolite in black rot of sweet potato. Science, 121: 216-217.
- VARNS, J. - 1970 - Biochemical response and its control in the Irish potato tuber (Solanum tuberosum L.) - Phytophthora infestans interactions. Ph.D. Thesis, Purdue University Lafayette, 148 p.
- VARNS, J., W. CURRIER and J. KUC' - 1971 - Specificity of rishitin and phytuberin accumulation by potato. Phytopathology, 61: 968-971.
- WAIN, R., D. SPENCER and C. FAWCETT - 1961 - Antifungal compounds in seedlings of Vicia faba. Fungicides in Agriculture and Horticulture. Soc. Chem. Ind. Monograph., 15: 109-131.
- WALKER, J.C. - 1923 - Disease resistance to onion smudge. J. Agric. Res., 24: 1019-1039.