

DEFESAS QUÍMICAS DE PLANTAS: FITOALEXINAS

Márcia Regina Braga¹
Sonia M.C. Dietrich²

Recebido em 26.12.86. Aceito em 30.12.86.

RESUMO – A resistência de plantas ao ataque de microorganismos causadores de doenças relaciona-se à presença de barreiras físicas e químicas de defesa. Dentre as barreiras químicas destacam-se as fitoalexinas, substâncias fungitóxicas sintetizadas *de novo* pelas plantas principalmente após a invasão ou o contato de seus tecidos com microorganismos. Essas substâncias englobam vários grupos compostos naturais tais como terpenos, isoflavonóides e poliacetilenos e seu acúmulo pode ser induzido por organismos vivos, seus produtos (eliciadores) ou ainda agentes químicos, como sais de metais pesados, ou físicos (congelamento, luz U.U.).

Alguns aspectos abordados nesta revisão são: a ocorrência de fitoalexinas em angiospermas, a relação entre sua natureza química e o grupo taxonômico das plantas que as produzem, a sua ação sobre organismos pró e eucarióticos.

São descritas também os fatores que interferem nas respostas das plantas aos agentes indutores e as técnicas usuais para a indução e detecção de fitoalexinas.

O papel dos eliciadores na indução da síntese de fitoalexinas e o mecanismo pelo qual exercem sua função indutora são discutidos.

Nesse contexto está incluída a teoria das oligossacarinas, fragmentos de parede celular que parecem controlar não só a resposta de defesa em plantas mas também outros fenômenos fisiológicos em plantas.

Palavras-chaves: fitoalexinas, defesas e eliciadores.

ABSTRACT: Chemical defense of plants: phytoalexins – This review describes the concept of phytoalexins as a chemical defense of plants against microorganisms as well as a response of plants to chemical or physical agents.

The current information on phytoalexins is presented, regarding the following aspects: occurrence in angiosperms; relationships between chemical composition and taxonomy; toxicity; factors affecting plant response; techniques for induction and detection of phytoalexins; role of elicitors and mechanisms of action. The latter includes the oligosaccharins-fragments of cell wall polysaccharides which seem to control the defense response as well as other physiological phenomena in plants.

Key-words: Phytoalexin, defense, elicitors.

Introdução

A seleção e o melhoramento genético de plantas de interesse econômico têm determinado um acréscimo considerável na produtividade mas, por outro lado, tem ocasionado o aumento na suscetibilidade destas plantas ao ataque de microorganismos causadores de doenças (HARBORNE, 1982).

A resistência a patógenos, como observada em plantas superiores crescidas em seu ambiente natural, relaciona-se à presença de barreiras físicas e químicas que dificultam ou impedem a invasão de tecidos vegetais pelos organismos. Esses dois tipos de defesa são

¹Estagiária da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Bolsista da CAPES.

²Pesquisadora Científica VI, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica. Caixa Postal 4005. CEP 01000 – São Paulo, SP – Brasil.

considerados como constitutivos, caso já estejam presentes antes da infecção ou induzidos, quando resultam da interação hospedeiro-parasita (RODRIGUES Jr., 1980).

As barreiras físicas constitutivas incluem a presença de pelos e de ceras na superfície dos órgãos, a espessura e dureza da cutícula e da parede externa das células epidérmicas, o tamanho e a forma dos estômatos e a presença e distribuição do esclerênquima (ROYLE, 1976).

Esse tipo de resistência é discutível pois acredita-se que as barreiras físicas possam retardar ou dificultar a penetração do patógeno, porém não impedi-la (HARBONE, 1982).

As características estruturais podem operar na resistência ativamente, sendo induzidas pela própria ação do patógeno em penetrar na planta. Desses processos, o mais extensivamente estudado tem sido a lignificação, porém a formação de tiloses nas doenças que envolvem o sistema vascular e as outras alterações de parede por deposição de celulose, calose ou sílica também têm merecido atenção por parte dos fitopatologistas (RODRIGUES Jr., 1980).

A presença de compostos químicos com propriedades antimicrobianas nos tecidos de plantas superiores tem sido verificada em quase todas as plantas, em vários tecidos. INGHAM (1973) propôs a separação das defesas químicas em 2 grupos distintos, o das defesas pré-existentes e o das defesas induzidas. As defesas pré-existentes incluem:

— as proibitinas — compostos inibitórios pré-formados presentes nos tecidos vegetais em concentrações suficientes para conferir certo grau de proteção contra microorganismos. Dentro desse grupo são incluídos os compostos fenólicos (WALKER E STAHMAN, 1955) a saponina avenacina (TURNER, 1961) e as lectinas (URITANI et al., 1976, GOODMAN et al., 1976);

— as inibitinas — compostos que embora constitutivos sofrem, nos tecidos infectados, aumento considerável. Aqui se incluem também compostos fenólicos (BATEMAN e MILLAR, 1966) e proteínas inibidoras de enzimas (ALBERSHEIM & ANDERSON-PROUTY, 1975).

As defesas induzidas incluem:

— as pós-inibitinas — metabolitos inibidores produzidos pelas plantas não só em resposta a infecção, mas também a danos mecânicos e químicos. Sua formação não envolve a ativação de uma rota biossintética, ou seja, as enzimas e substratos envolvidos já estão presentes porém em compartimentos diferentes; os substratos encontram-se sob a forma de substâncias inativas, geralmente glicosídeos, que por ação enzimática liberam a substância inibidora. São incluídos nesta categoria os glicosídeos cianogênicos, as lactonas insaturadas e algumas saponinas (SCHÖNBECK & SCHLOSSER, 1976).

— as fitoalexinas — substâncias sintetizadas *de novo* quando a planta entra em contacto com um agente externo, geralmente um microorganismo parasita. Neste grupo encontram-se numerosos compostos de natureza química diversa, geralmente acompanhando o quimismo natural da planta (INGHAM & HARBORNE, 1976).

STOESSL (1986) agrupa as defesas químicas em passivas e ativas. As primeiras englobam as proibitinas e as pós-inibitinas e as segundas as inibitinas e as fitoalexinas.

As respostas de defesa induzidas nas plantas devido à interação com patógenos são extremamente complexas e mais de um tipo de defesa pode operar simultaneamente. As fitoalexinas, pelas características peculiares de sua indução, parecem exercer papel fundamental em muitos casos de resistência, impedindo que organismos patogênicos se estabeleçam.

O Conceito de Fitoalexinas

MÜLLER e BÖRGER (1940) estudando a resistência de *Solanum tuberosum* à *Phytophthora infestans*, propuseram pela primeira vez o termo fitoalexina. Esses autores as conceituaram como substâncias químicas inibidoras sintetizadas *de novo* pelas células vegetais como resultado da interação hospedeiro-microorganismo, e que se acumulam rapidamente e em altas concentrações no local da infecção.

Estudos posteriores em inúmeras outras plantas, especialmente cultivadas, mostraram que a indução ocorre não só por microorganismos, mas que fatores químicos e físicos podem desencadear a síntese dessas substâncias. Além disso, conhece-se hoje casos de fitoalexinas que têm sido detectadas, embora em quantidades relativamente pequenas, em tecidos de plantas sãs, sendo natural que com o aperfeiçoamento de técnicas, muitas outras venham a ser reveladas no futuro. Com isso, a definição de fitoalexinas passou a ser controversa, uma vez que muitas das substâncias descritas como fitoalexinas, estariam segundo classificação proposta por INGHAM (1973) incluídas entre as inibitinas.

Por essa razão, o conceito de fitoalexinas é atualmente aplicado às substâncias antimicrobianas cujo teor é aumentado como resposta quer a microorganismos quer a agentes físicos e químicos, como resultado da síntese *de novo* de enzimas ou da ativação de um sistema enzimático latente (STOESSL, 1976). A produção dessas substâncias é localizada, ou seja, ocorre apenas nas células infectadas e nas suas imediações (HARBORNE, 1982).

Natureza Química, Ocorrência e Biossíntese de Fitoalexinas

A primeira fitoalexina isolada foi a pisatina, um pterocarpano obtido de *Pisum sativum* inoculado com o fungo *Sclerotinea fructicola* (CRUICKSHANK e PERRIN, 1960).

Atualmente cerca de 270 fitoalexinas já foram descritas, em pelo menos 18 famílias de plantas. Essas substâncias englobam vários grupos de compostos naturais como terpenóides, isoflavonóides, flavonóides, diidrofenantrenos, estilbenos, cumarinas, isocumarinas, furanoacetilenos, poliacetilenos e polienos (BELL, 1981).

A natureza química das fitoalexinas, na maioria dos casos, acompanha o quimismo preponderante na família (HARBORNE, 1982). Assim, na família Leguminosae as fitoalexinas produzidas, são, de um modo geral, isoflavonóides. Nas famílias Solanaceae e Compositae são comuns os poliacetilenos (KÚC, 1982; TIETJEN e MATERN, 1984) e em Gramineae as lactonas (COXON, 1982). Existem, porém, exceções como é o caso de *Vicia* e *Lens*, dois gêneros de Leguminosae cujas fitoalexinas são furanoacetilenos (LETCHER et al., 1970; ROBESON, 1978).

Várias fitoalexinas de natureza e estrutura química diversas têm sido isoladas e identificadas em famílias de mono e dicotiledôneas como: Amaryllidaceae (COXON et al., 1980), Caryophyllaceae (PONCHET et al., 1984), Convolvulaceae (KATO et al., 1983; OBA et al., 1984), Euphorbiaceae (SITTON e WEST, 1975), Linaceae (KEEN e LITTEE-FIELD, 1979), Malvaceae (COXON, 1982; ZERINGUE, 1984), Moraceae (TAKASUGE et al., 1980 e 1984), Orchidaceae (WARD et al., 1975), Rubiaceae (WIJNSMA et al., 1985), Rutaceae (HARTMAN e NEINHUS, 1974), Umbelliferae (HARDING e HEALE, 1980), Vitaceae (LANGCAKE e PRYCE, 1976; LANGCAKE, 1981) e Zingiberaceae (KUMAR et al., 1984). Existem também registros da presença dessas substâncias em gimnospermas pertencentes às famílias Ginkgoaceae (CHRISTENSEN, 1972) e Pinaceae (cf. INGHAM, 1981).

Todas as fitoalexinas são metabolitos secundários derivados predominantemente de duas vias biossintéticas: a via dos fenilpropanóides, que leva à síntese de flavonóides, isoflavonóides, diidrofenantrenos e estilbenos e a via do poliacetato dando origem aos terpenóides, poliacetilenos e isocumarinas (INGHAM, 1981).

Toxicidade das Fitoalexinas

Embora os efeitos mais acentuados sejam observados sobre fungos, as fitoalexinas exibem toxicidade contra organismos procarióticos e eucarióticos, incluindo neste caso as próprias espécies de plantas superiores capazes de sintetizá-las (SMITH, 1982).

Devido a sua grande variedade química e estrutural, acredita-se que as fitoalexinas devam exercer sua atividade inibitória através de mecanismos de ação distintos.

Para avaliação da toxicidade das fitoalexinas são utilizados bioensaios diversos, sendo os mais comuns aqueles em que a substância com atividade inibidora é adicionada ao meio sólido ou líquido, onde o organismo teste irá crescer (SKIPP e BAILEY, 1976, 1977). Subseqüentemente, a variação da razão de crescimento em relação ao controle é medida por diversos parâmetros tais como diâmetro das colônias, porcentagem da germinação de esporos, etc.

Para o caso específico da atividade contra bactérias, o ensaio de antibiograma é o mais empregado (GNANAMANICKMAN e SMITH, 1980).

Apesar da enorme contribuição trazida por estes bioensaios para a compreensão do modo de ação das fitoalexinas, precauções devem ser tomadas, uma vez que, as condições artificiais das culturas podem não refletir exatamente o efeito observado *in vivo* (BAILEY et al., 1976 a, b). Por exemplo, é conhecido o fato de que a incorporação de rosa de bengala ao meio de cultura contendo a fitoalexina pisatina modifica a resposta de vários fungos a esta substância (VANETTEN, 1973).

A maioria dos bioensaios para a determinação da toxicidade das fitoalexinas é realizada com fungos. Inibição do alongamento do tubo germinativo, redução do crescimento radial e do peso seco de micélio, parada do movimento citoplasmático, desorganização da membrana e morte de células apicais de hifas são alguns dos efeitos observados quando fitoalexinas são adicionadas ao meio de cultura de crescimento de fungos (BULL, 1981; SKIPP e BAILEY, 1976).

O tratamento com fitoalexinas às vezes não é fungicida, mas provoca apenas uma parada no crescimento do fungo, que é retomado quando o organismo é transferido para outro meio na ausência da fitoalexina (HARRIS e DENNIS, 1977).

O aspecto mais relevante relacionado aos ensaios de fungitoxicidade realizados com fitoalexinas é que diferentes fungos exigem sensibilidades distintas dependendo da fitoalexina (SMITH, 1982). Segundo INGHAM (1981) o crescimento e desenvolvimento de fungos não patogênicos são rapidamente inibidos pelas fitoalexinas, enquanto muitos fungos patogênicos podem ser insensíveis à elas ou detoxificar esses compostos. A inativação das fitoalexinas pode ser feita por processos tais como remoção de grupos metila, oxidação e hidroxilações não aromáticas (INGHAM, 1976 a; VANETTEN et al., 1975).

Assim como observado para os fungos, a toxicidade das fitoalexinas para bactérias varia de acordo com o tipo de ensaio empregado, com a composição do meio de cultura, com a densidade do inóculo e com o período de incubação (SMITH, 1982).

O modo pelo qual as fitoalexinas agem sobre as bactérias ainda não é totalmente conhecido, porém, GNANAMANICKMAN e MANSFIELD (1981) mostraram que isoflavonóides, flavonóides e furanoacetilenos são seletivamente tóxicos para bactérias Gram-positivas, sendo as Gram-negativas bem menos sensíveis.

Atividade fitotóxica foi observada em várias fitoalexinas, incluindo isoflavonóides, terpenóides e furanoacetilenos (SMITH, 1982). Efeitos tais como a morte de células de tubérculos de batata (ISHIGURI et al., 1978), lise de protoplastos de batata e tomate (LYON e MAYO, 1978) e inibição da germinação de grãos de pólen de *Solanum* sp. (HODGKIN e LYON, 1979) foram observados por ação da fitoalexina "rishtin". Faseolina, por sua vez, causa rápida inibição da respiração, redução do crescimento de células em cultura e morte celular (SKIPP et al., 1977).

HARGREAVES (1980) acredita que os efeitos fitotóxicos causados por fitoalexinas se devem à alterações a nível de membrana celular; KAPLAN et al. (1980), por outro lado, sugerem que essas substâncias agem a nível de transporte de elétrons.

Alguns efeitos sobre animais também são observados quando fitoalexinas estão presentes no alimento, quer através de ingestão de plantas infectadas quer através da adição desses metabolitos às rações de ratos e coelhos. Aglutinação de hemácias de mamíferos, inclusive do homem (BULL, 1981), alterações cutâneas (SCHEEL et al., 1973), e esterilidade em camundongos (BICKOFF et al., 1967) são alguns desses efeitos.

Indução e Detecção de Fitoalexinas

Agentes indutores. Quando a teoria das fitoalexinas foi proposta por MULLER e BORGER (1940), acreditava-se que apenas os fungos eram capazes de induzir a síntese dessas substâncias. Estudos posteriores revelaram que outros microorganismos, agentes químicos e físicos, ou qualquer fator determinante de "stress" bioquímico são capazes de desencadear esse tipo de resposta nas plantas.

Os agentes indutores da síntese de fitoalexinas são agrupados em bióticos e abióticos. Os agentes bióticos são os organismos vivos ou seus produtos, denominados eliciadores. Nesse grupo estão os vírus (BAILEY e BURDEN, 1973; BAILEY et al., 1976b), as bactérias (GNANAMANICKAM e PATIL, 1977; INGHAM et al., 1981), os fungos (CRUICKSHANK e PERRIN, 1960, 1971; ALBERSHEIM e VALENT, 1978; FRAILE et al., 1980; BELL, 1981; BRYAN et al., 1985) e também os nematóides (ABAWI et al., 1971; RICH et al., 1977; VEECH, 1978).

Tem sido demonstrado, através de várias técnicas, que dentre os agentes capazes de causar a síntese de fitoalexinas, os fungos são os mais efetivos. Esses fungos podem ser patógenos para a espécie induzida ou para outras espécies, ou saprófitas (BAILEY, 1982).

Os indutores químicos e físicos são considerados agentes abióticos. Existem registros de indução por sais de metais pesados (PERRIN e CRUICKSHANK, 1965; HARGREAVES, 1979; FRAILE et al., 1980; YOSHIKAWA, 1978), substâncias inibidoras de respiração (CHEEMA e HAARD, 1978), agentes surfactantes (YOSHIKAWA, 1978), fungicidas (OKU et al., 1973), reguladores de crescimento (UEGAKI et al., 1980) e antibióticos (SCHWOCHAU e HADWIGER, 1968). HADWIGER et al. (1974) e SANDER e HADWIGER (1979) têm demonstrado a síntese da fitoalexina pisatina em resposta e tranquilizantes, veneno de cobra e aminoácidos. Dentre os agentes físicos, podem ser citados injúria mecânica (CRUICKSHANK e PERRIN, 1963; LANGCAKE e PRYCE, 1976; UEGAKI et al., 1980; SAKAI et al., 1979), congelamento (RAHE e ARNOLD, 1975; CAIN e PORTER, 1979) e irradiação com luz UV (INGHAM e DEWICK, 1980; INGHAM, 1982).

Técnicas de indução. A técnica da "difusão em gotas" descrita por HIGGINS e MILLAR (1968) é a mais utilizada no estudo das fitoalexinas. Nessa técnica, gotas de suspensão ou solução do agente indutor, usualmente fungo, são aplicadas sobre a superfície de órgãos isolados como folhas e sementes ou em cavidades de frutos. Após incubação por período que varia de 24 a 72 horas, as gotas são recolhidas e analisadas quanto à presença de fitoalexinas. Isso é possível porque, normalmente, as fitoalexinas produzidas difundem-se para as gotas.

A facilidade e rapidez de execução aliada à eliminação de constituintes celulares indesejáveis, como ceras e pigmentos, faz dessa técnica instrumento importante nos estudos de detecção de síntese e isolamento de fitoalexinas.

Apesar das vantagens do uso da técnica da "difusão em gotas", em certas situações ela torna-se inadequada. É o caso, por exemplo, das leguminosas dos gêneros *Vicia* e *Lens* (ROBESON, 1978), em que as fitoalexinas produzidas não podem ser detectadas nas gotas por serem altamente insolúveis.

Além disso, certas espécies apresentam a superfície foliar coberta por pêlos que, ou liberam secreções oleosas interferindo com a retenção das gotas (INGHAM, 1982) ou, juntamente com a cutícula espessa e altamente impregnada de ceras impedem a penetração do agente indutor e consequentemente a síntese de fitoalexinas (cf. INGHAM, 1981).

KEEN (1978) descreve uma técnica alternativa de indução, denominada técnica da difusão facilitada, na qual a suspensão ou solução contendo o agente indutor é vaporizada sobre os órgãos vegetais, ao invés de ser aplicada sob a forma de gotas. Com esse procedimento são eliminados os problemas de permanência das gotas do inóculo sobre o órgão e também o da difusibilidade, uma vez que, a análise da produção de fitoalexinas é feita extraindo-se o próprio órgão induzido.

É importante salientar que a escolha de uma ou de outra técnica de indução está na dependência do material vegetal a ser analisado. Em situações em que ambos procedimentos são impraticáveis pode-se optar pelo uso de agentes físicos de indução, como luz UV ou congelamento.

No caso específico de superfícies impermeáveis à penetração do agente indutor, a injúria superficial do órgão a ser inoculado pode ser um dos meios de facilitar a indução. AYERS et al. (1976) descreveram essa técnica para a indução de gliceolina em cotilédones de soja.

Detecção, extração e isolamento de fitoalexinas. Quando as fitoalexinas produzidas são solúveis em água o procedimento mais rápido e prático para sua detecção é a análise das gotas obtidas pela técnica da "difusão em gotas" (INGHAM, 1981). Os difusatos resultantes da indução usualmente são submetidos à cromatografia em camada delgada, em placas de sílica-tel, com sistemas de solventes orgânicos que variam de acordo com a classe de substâncias analisada. O organismo usado na detecção é denominado revelador e usualmente é um fungo. O bioensaio, denominado bioautografia, consiste na aplicação de uma suspensão do revelador em meio de glicose e sais minerais sobre as placas após o desenvolvimento da cromatografia (HOMANS e FUCHS, 1970). Segue-se incubação da placa por 3 dias, período no qual o organismo revelador cresce por toda sua superfície, exceto nas regiões onde as fitoalexinas e outras substâncias fungitóxicas estejam presentes. A detecção de substâncias com atividade fitoalexínica se dá por comparação com os difusatos de plantas controle nos quais não apareçam as regiões de inibição detectadas no tratado.

Outra maneira pela qual pode-se analisar a presença de fitoalexinas é proceder à extração do tecido vegetal inoculado. INGHAM (1976c) descreve a extração em etanol 95% enquanto KEEN (1978) utiliza etanol a 40% com a mesma finalidade. A segunda técnica apresenta vantagens sobre a outra, especialmente por reduzir a extração de componentes celulares indesejáveis, que podem dificultar a análise cromatográfica dos extratos e a detecção das fitoalexinas pelo organismo revelador.

DIETRICH e colaboradores (1986) desenvolveram um bioensaio de detecção de fitoalexinas que, além de mais rápido e menos elaborado que os anteriores é sensível e permite a análise da presença dessas substâncias em difusatos e tecidos vegetais. Esse ensaio foi projetado tendo como base a técnica de antibiograma usada por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975) para a detecção de produção de celulase por fungos. Usando uma placa contendo suspensão de esporos do fungo revelador em meio de cultura apropriado, faz-se a detecção de atividade fitoalexínica através da aplicação nesse meio, seja de discos de

papel contendo difusato obtido pela técnica da "difusão em gotas", seja de discos do órgão ou tecido induzido pela técnica da difusão facilitada. Após incubação em condições adequadas, observa-se a inibição do crescimento do fungo revelador sob a forma de halos claros ao redor dos discos, que contrastam com as regiões onde o fungo cresce. O diâmetro do halo de inibição é medido e constitui-se numa maneira de avaliar a atividade fitoalexínica.

Os passos seguintes à detecção da produção de fitoalexinas são sua extração e seu isolamento e purificação. Esses dois últimos são normalmente efetuados empregando-se técnicas de separação por diversos tipos de cromatografia (TLC, GLC, HPLC). Os passos de isolamento podem ser acompanhados através do bioensaio das frações. Com a substância purificada procede-se sua caracterização química e estrutural pelos métodos usuais da química de produtos naturais, como o emprego de reveladores químicos, espectroscopia em UV, ressonância magnética nuclear, etc.

Fatores que interferem na Resposta da Planta

A produção de fitoalexinas pode variar de acordo com a espécie analisada com o tecido inoculado, com as condições fisiológicas, do vegetal, com os fatores ambientais e com o agente indutor empregado (BAILEY, 1982).

Essas substâncias têm sido isoladas a partir de folhas e caules (INGHAM, 1976b; 1982), frutos (WARD et al., 1976), tubérculos (BARNES et al., 1971), raízes (SUTHERLAND et al., 1980) e flores (INGHAM, 1979). O rendimento maior tem sido obtido através da inoculação de frutos e sementes e o menor a partir de folhas, embora esse órgão seja bastante utilizado. Segundo BAILEY (1982), a quantidade de fitoalexinas produzida pode ser grandemente reduzida quando tecidos senescentes são ensaiados. Órgãos jovens são usualmente mais tenros podendo facilitar a penetração do agente indutor.

Condições ambientais como temperatura, aeração e deficiências hídrica e mineral (LEWIS, 1980) também influenciam as respostas de plantas com relação à síntese de fitoalexinas. Trabalho realizado com 169 espécies de plantas nativas de mata e de cerrado e plantas cultivadas demonstrou que a resposta era fortemente influenciada pela época do ano em que se realizavam os ensaios (BRAGA et al., 1986).

Além desses fatores, a técnica de indução empregada pode influenciar os resultados devido, principalmente, às características estruturais dos tecidos ou órgãos ensaiados (BRAGA et al., 1986).

Apesar de muitas espécies possuírem potencial genético para sintetizar fitoalexinas, a expressão dessa potencialidade pode ou não ocorrer, dependendo do agente indutor. De modo geral, fitoalexinas não são detectadas quando plantas suscetíveis são submetidas aos seus agentes patogênicos (KEEN, 1971). Isso pode ocorrer devido ou à incapacidade do organismo em induzir a resposta na planta ou deste dispor de mecanismos de detoxificação das fitoalexinas sintetizadas, convertendo-as a substâncias inativas (BAILEY, 1982).

Mecanismo de Indução da Síntese de Fitoalexinas: Elicidores

A síntese de fitoalexinas induzida por organismos vivos ocorre normalmente devido à liberação, por parte destes, de moléculas denominadas eliciadores (KEEN, 1975). Isso foi demonstrado através de experimentos nos quais o agente indutor vivo era substituído por um produto dele derivado (CRUICKSHANK e PERRIN, 1968).

Atualmente, o termo eliciador refere-se a qualquer agente que induz nas plantas a síntese de fitoalexinas (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984). Os eliciadores podem ser de origem biótica, quando são derivados de organismos vivos e abiótica quando não o são (HALVERSON e STACEY, 1986).

O primeiro eliciador biótico estudado foi a monilicolina A, um polipeptídeo obtido de micélio do fungo *Monilinia fructicola*, capaz de induzir a síntese de faseolina em *Phaseolus vulgaris* (CRUICKSHANK e PERRIN, 1968).

Trabalhos mais recentes têm revelado inúmeros eliciadores derivados de vários organismos, especialmente fungos. A natureza química é variada, podendo ser peptídeos, glicopeptídeos, polissacarídeos e lipídeos (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984).

Elicidores de natureza glicoprotéica têm sido isolados de *Phytophthora megasperma* (KEEN e LEGRAND, 1980; WADE e ALBERSHEIM, 1979) e de *Rhizopus stolonifer* (LEE e WEST, 1981). Glucanos foram obtidos de *P. megasperma* (ALBERSHEIM e VALENT, 1978), de *Colletotrichum lindemuthianum* (ANDERSON, 1978) e de leveduras (HAHN e ALBERSHEIM, 1978). Lipídeos com atividade eliciadora foram isolados também de parede celular do fungo *P. megasperma* (BOSTECK et al., 1981). Os ácidos araquidônico e eicosapentaenóico obtidos desse fungo induzem o acúmulo de fitoalexinas em tubérculos de batata e parecem estar, de algum modo, relacionados à ação de glucanos que também atuam como eliciadores e que são derivados desse organismo (HALVERSON e STACEY, 1986).

O mecanismo de ação desses eliciadores foi relacionado ao aumento da atividade de várias enzimas, destacando-se a PAL (fenil-alanina-amônia-liase), que tem um papel chave na biossíntese das fitoalexinas originadas a partir de fenilpropanóides (BAILEY, 1982). DIXON e LAMB (1979) estudando o acúmulo de faseolina em suspensão de células de *Phaseolus* verificaram aumento de atividade de PAL devido à sua síntese *de novo*. O mesmo foi observado em *Petroselinum hortense* tratado com o glucano obtido de *P. megasperma* (HAHLBROCK et al., 1981).

Com essas evidências, foi sugerido que os eliciadores, de alguma maneira, agiriam a nível celular determinado a desrepressão gênica, síntese de RNAm e das enzimas responsáveis pela produção de fitoalexinas (BAILEY, 1982).

A síntese e o acúmulo de fitoalexinas ocorrem em diferentes locais. As fitoalexinas acumulam-se nas células diretamente infectadas e que são freqüentemente pigmentadas e mortas, e a síntese ocorre nas células sadias adjacentes ao local da infecção.

YOSHIKAWA (1978) comparando o efeito de eliciadores bióticos e abióticos em *Glycine max* concluiu que estes possuem diferentes modos de ação. Os eliciadores abióticos determinam o acúmulo de fitoalexinas por estimular sua síntese e os eliciadores abióticos por prevenir sua degradação. DIXON e LAMB (1979) e MOESTA e GRISEBACH (1980) reexaminando esses efeitos não conseguiram demonstrar essa diferença no modo de ação dos eliciadores e concluíram que a eliciação em ambos os casos se dá através de um mecanismo comum.

A compreensão do mecanismo atuante na indução da síntese de fitoalexinas torna-se mais difícil quando os agentes indutores são fatores físicos como injúria, irradiação com luz U.V. e congelamento. Nesses casos, não existe molécula eliciadora externa responsável pela indução. HARGREAVES & BAILEY (1978) estudando este tipo de indução demonstraram a presença de eliciadores da síntese de fitoalexinas no extrato de plantas de *Phaseolus* submetidas a congelamento.

Esses eliciadores foram denominados inicialmente de constitutivos (HARGREAVES & BAILEY, 1978) e mais recentemente chamados de eliciadores endógenos por HAHN et al. (1981).

Os eliciadores endógenos foram encontrados em tecidos de ervilha (HARGREAVES, 1979) e em extratos de parede celular de soja, tabaco e milho (HAHN et al., 1981),

entre outros. O eliciador obtido a partir de parede celular de soja é um polissacarídeo pectico capaz de induzir a síntese de gliceolina em cotilédones dessa planta.

A descoberta da existência de eliciadores endógenos contribuiu de maneira decisiva para a compreensão de mecanismo de ação dos eliciadores bióticos e abióticos. Conforme citado por BAILEY (1982), os agentes indutores químicos, físicos ou biológicos, agem causando fitoalexinas, um distúrbio metabólico e a conseqüente determina a liberação na célula infectada de eliciadores endógenos. Essas moléculas, chegariam até as células vizinhas, determinariam a síntese e liberação de altas quantidades de fitoalexinas que se acumulariam nas células infectadas.

O fato de alguns eliciadores terem sido identificados como enzimas, principalmente poligalacturonases (BRUSE & WEST, 1982), aliado ao conhecimento de que os eliciadores endógenos podem ser liberados por hidrólise ácida ou ação de endopoligalacturonases sobre a parede celular de plantas (HAHN et al., 1981) levou o grupo uma nova teoria para explicar a resposta das plantas ao ataque de microorganismos (ALBERSHEIM et al., 1983, ALBERSHEIM & DALVILL, 1985).

Segundo ALBERSHEIM & DARVILL (1985), a interação de plantas com microorganismos estaria associada à liberação por parte destas, de pequenos fragmentos de parede celular, denominados de oligossacarinas. Além da indução de respostas de defesa em plantas, acredita-se que as oligossacarinas estejam envolvidas na indução de inúmeras respostas fisiológicas observadas em vegetais. Esses fragmentos de parede inibem a floração e promovem o crescimento vegetativo em *Lemna gibba* (GOLLIN et al., 1984), inibem o crescimento de segmentos de caule estimulado por 2,4-D (YORK et al., 1984) e controlam a morfogênese de explante de tabaco (TRAN et al., 1985).

Estudos feitos com *Rhizopus stolonifer* e *Erwinia caratova*, demonstraram que os seus eliciadores são enzimas do tipo poligalacturonases, e agem sobre polissacarídeos de parede celular, liberando oligossacarídeos de ácido galacturônico (LEE & WEST, 1981) por sua vez induzem a síntese de fitoalexinas em sementes de mamona (BRUCE & WEST, 1982).

Segundo ALBERSHEIM & DARVILL (1985), as oligossacarinas são moléculas responsáveis pela indução da síntese de fitoalexinas em plantas. Três são os mecanismos pelos quais essas moléculas podem ser liberadas. Em algumas infecções causadas por fungos, a planta produz enzimas que irão agir sobre a parede celular desses organismos liberando oligossacarinas. A segunda possibilidade é que os eliciadores bióticos atuem ou diretamente sobre a parede celular (é o caso dos eliciadores que são enzimas) ou ativando enzimas da própria planta, com a conseqüente liberação dos oligossacarinas. E por último, quando a planta sofre qualquer tipo de injúria ocorre a produção de enzimas que clivam a sua própria parede celular. Nessas três situações as oligossacarinas, presumivelmente, combinam-se com um receptor na planta para formar complexos ativos. Esses complexos, por sua vez, determinariam a transcrição de gens e a síntese de enzimas que catalisam a síntese de várias fitoalexinas.

Além disso, a teoria das oligossacarinas apresenta-se como um novo possível modelo para a interpretação do mecanismo pelo qual os hormônios vegetais exercem sua função reguladora.

Importância e Perspectivas do Estudo de Fitoalexinas

Os processos de defesa de que as plantas dispõem são extremamente complexos e aqui apenas alguns dos aspectos de um dos mecanismos, a síntese de fitoalexinas, foram abordados.

A estimulação da síntese de fitoalexinas, através da ativação dos sistemas de defesa das plantas é considerada uma possibilidade significativa para o futuro quer pelo seu em-

prego em programas de proteção às lavouras quer através do isolamento e determinação da estrutura dessas substâncias, o que possibilitaria a sua síntese química.

Outro aspecto importante a ser considerado é o fato de existir relação entre a natureza química das fitoalexinas e a família à qual essa planta pertence. Dependendo do grupo taxonômico da planta considerada e da presença e natureza química das fitoalexinas formadas, interpretações poderão ser feitas à respeito do processo evolutivo das plantas. As fitoalexinas, podem desse modo, ser utilizadas como marcadores taxonômicos.

Em adição à aplicação biossistemática, existe a possibilidade que a triagem de um grande número de plantas possa indicar espécies que produzam fitoalexinas com alta atividade antifúngica ou possa apontar a existência de caminhos metabólicos novos.

Muitos dos aspectos relativos ao fenômeno de produção de fitoalexinas permaneçam ainda obscuros. A compreensão dos mecanismos de indução da síntese dessas substâncias que operam a nível molecular podem contribuir grandemente para o conhecimento das interações entre plantas, microorganismos e ambiente.

Referências Bibliográficas

- ABAWI, G.S.; VANETTEN, H.D. & MAI, W.F. 1971. Phaseollin production induced by *Pratylenchus penetrans* in *Phaseolus vulgaris*. *J. Nematol.* 3:301.
- ALBERSHEIM, P. & ANDERSON-PROUTY, A. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26:31-52.
- ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. 1985. Oligosaccharins. *Scientific American* 253(3):58-64.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; McNEIL, M.; VALENT, B.S.; SHARP, J.K.; NOTHNAGEL, E.E.; DAVIS, K.R.; YAMAZAKI, N.; GOLLIN, D.J.; YORK, W.S.; DUDMAN, W.F.; DARVILL, J.E. & DELL, A. 1983. Oligosaccharins: naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. p. 293-312. *In: Structure and function of plant genomes.* O Ciferri and L. Dure III (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.
- ALBERSHEIM, P. & VALENT, B.S. 1978. Host-pathogen interactions in plants. Plants When exposed to oligosaccharides of fungal origin defend them selves by accumulating antibiotics. *J. Cell. Biol.* 78:627-643.
- ANDERSON, A.J. 1978. Isolation from three species of *Colletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean. *Phytopathology.* 68:189-194.
- AYERS, A.R.; EBEL, J.; VALENT, B. & ALBERSHEIM, P. 1976. Host-Pathogen Interactions X. Fractionation and Biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57:760-765.
- BAILEY, J.A. 1982. Mechanisms of phytoalexin accumulation. pp.288-317. *In: Phytoalexins.* J.A. BAILEY; J.W. MANSFIELD (ed.), Blackie, London.
- BAILEY, J. & BURDEN, R.S. 1973. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused tobacco necrosis virus. *Physiol. Plant Pathol.* 3:171-177.
- BAILEY, J.A.; CARTER, G.A. & SKIPP, R.A. 1976a. The use and interpretation of bioassays for fungitoxicity of phytoalexins in agar media. *Physiol. Plant Pathol.* 8:189-194.
- BAILEY, J.A.; VINCENT, G.G. & BURDEN, R.S. 1976b. The antifungal activity of glutinosome and capsidiol e their accumulation in virus-infected tobacco species. *Physiol. Plant Pathol.* 8:35-41.
- BATEMAN, D.F. & MILLAR, R.L. 1966. Pectec enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathology.* 4:119-146.
- BELL, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:21-81.
- BICKOFF, S.M.; LOPER, G.M.; HANSON, C.H.; GRAHAM, J.H.; WITT, S.C. & SPENGER, R.R. 1967. Effect of common leafspot on coumestans and flavones in alfafa. *Crop. Sci.* 7:259-261.
- BOSTECK, R.M.; KÚC, J. & LAINE, R.A. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in potato. *Science.* 212:67-69.
- BRAGA, M.R.; YOUNG, M.C.M.; PONTE, J.V.A.; DIETRICH, S.M.C.; EMERENCIANO, V.P. & GOTTLEB, O.R. 1986. Phytoalexin Induction in Plants of tropical environment. *Biochem. Syst. Ecol.* 14(5):507-514.
- BRUCE, R.J. & WEST, C.A. 1982. Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean. The role of pectic fragments of the plant cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase. *Plant Physiol.* 69:1181-1188.
- BRYAN, I.B.; RATHMELL, W.G. & FRIEND, J. 1985. The role of lipid and non-lipid components of *Phytophthora infestans* in the elicitation of the hypersensitive response in potato tuber tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 26:331-341.

- BULL, C.A. 1981. *Studies on the fungitoxicity and relevance to disease resistance of the phytoalexin Kievitone* PhD thesis, University of Hull, U.K.
- CAIN, R.O. & PORTER, A.E.A. 1979. Biosynthesis of the phytoalexin wyerove in *Vicia faba*. *Phytochemistry*. 18:322-323.
- CHEEMA, A.S. & HAARD, N.F. 1978. Induction of restritin and lubimin in potato tuber disc by non-specific elicitor and the influence of storage conditions. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 233-240.
- CHRISTENSEN, T.G. 1972. A study of the resistance of *Ginkgo biloba* L. to fungi: phytoalexin production induced by *Batrytis allii* Munn. *Diss. Abstr. Int. B.* 32:4340.
- COXON, D.T. 1982. Phytoalexins from other families. pp.106-129. In: *Phytoalexins*. J.A. Bailey, J.W. Mansfield (ed.), Blackie, London.
- COXON, D.T.; O'NEILL, T.M.; MANSFIELD, J.W. & PORTER, A.E.A. 1980. Identification of three hydroxyflavan phytoalexins from daffodil bulbs. *Phytochemistry*. 19:889-891.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. 1960. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*. 187:799-800.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. 1963. Studies on phytoalexins. VI. Pisatin: 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: 111-28.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. 1968. The isolation and partial characterization of monilulin A, a polypeptide with phaseollin - inducing activity from *Manilinia fructicola*. *Life Sci.*, 7: 449-458.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. 1971. Studies on phytoalexins XI. The induction, antimicrobial spectrum and chemical assay of phaseollin. *Phytopath z.* 70: 209-229.
- DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors - A defense Against Microbial Infection in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275.
- DIETRICH, S.M.C.; YOUNG, M.C.M.; NACCACHE, V.M.; BRAGA, M.R. & GOTTLIEB, O.R. 1986. Fitoalexinas. *Ciência e Cultura* (no prelo).
- DIXON, R.A. & LAMB, C.J. 1979. Stimulation of *de novo* synthesis of L-phenylalanine ammonialyase in relation to phytoalexin accumulation in *Calotropichum lindemuthuanum* elicitor-treated cell suspension cultures of french bean. *Bioch. Biophys. Acta.* 586: 453-463.
- FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F. & SAGASTA, E.M. 1980. Phytoalexin accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) after infection with *Botrytis cinerea* and treatment with mercuric chloride. *Physiol. Plant Pathol.* 16:9-18.
- GNANAMANICKAM, S.S. & PATIL, S.S. 1977. Accumulation of antibacterial isoflavonoids in hypersensitively responding bean leaf tissues inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. *Physiol. Plant Pathol.* 10: 159-168.
- GNANAMANICKAM, S.S. & SMITH, D.A. 1980. Selective toxicity of isoflavonoid phytoalexins to Gran-positive bacteria. *Phytopathology*. 894-896.
- GNANAMANICKAM, S.S. & MANSFIELD, J.W. 1981. Selective toxicity of wyerane and other phytoalexins to Gran-positive bacteria. *Phytochemistry*. 20:997-1000.
- GOLLIN, D.J.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Plant cell fragments inhibit flowering and promote vegetative growth in *Lemna gibba* G₃. *Biol. Cell.* 51:275-280.
- GOODMAN, R.N.; HUANG, Pi-Yu; HUANG, J.S. & THAI-PANICH, V. 1976. Induced resistance to bacterial infection. In: *Biochemistry and cytology of plant parasite interaction*. pp.35-42. J.M. Tamijama & I. Daly eds. Kodansha Ltd. Tôquio.
- HADWIGER, L.A.; JAFRI, A.; Von BROEMBSSENS & EDDY, R. Jr. 1974. Mode of pisatin induction. *Plant Physiol.* 53: 52-63.
- HAHLBROCK, K.; LAMB, C.J.; PURWIN, C.; EBEL, J.; FAUTZ E. & SCHAFFER, E. 1981. Rapid response of suspension cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 67: 768-773.
- HAHN, M.G. & ALBERSHEIM, P. 1978. Host-cathogen interactions XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol.* 62: 107-111.
- HAHN, M.G.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen Interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68: 1161-1169.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiological Review*. 50(2):193-225.
- HANKIN, L. & ANAGNOTTAKIS, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 67(3):597-607.
- HARBORNE, J.B. 1982. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 2th edition. Academic Press, London pp.227-264.
- HARDING, V.K. & HEALE, J.B. 1980. Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 277-289.
- HARGREAVES, J.A. 1979. Investigations into the mechanism of mercuric chloride stimulated phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. *Physiol. Plant Pathol.* 15: 279-287.

- HARGREAVES, J.A. 1980. A possible mechanism for the phytotoxicity of the phytoalexin phaseolin. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 351-357.
- HARGREAVES, J.A. & BAILEY, J.A. 1978. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitute metabolites released damaged bean cells. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 89-100.
- HARRIS, J.E. & DENNIS, C. 1977. The effect of post-infectious potato tuber metabolites and surfactants on zoospores of Oomycetes. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 163-169.
- HARTMANN, G. & NIENHAUS, F. 1974. The isolation of xanthoxylin from the bark of *Phytophthora* - and *Hendersonula* infected *Citrus limar* and its fungitoxic effect. *Phytopathol. Z.* 81:97-113.
- HIGGINS, V.J. & MILLAR, R.L. 1968. Phytoalexin production by alfalfa in response to infection by *Colletotrichum phomoides*, *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology.* 58: 1377-1383.
- HODGKIN, T. & LYON, G.D. 1979. Inhibition of *Solanum* pollen germination *in vitro* by phytoalexin reslutin. *Ann. Bot.* 44: 253-255.
- HOMANS, A.L. & FUCHS, A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatog.* 51: 327-329.
- INGHAM, J.L. 1973. Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. *Phytopathol. Z.* 78: 314-335.
- INGHAM, J.L. 1976a. Fungal modification of pterocarpan phytoalexins from *Melilotus alba* and *Trifolium pratense*. *Phytochemistry.* 15: 1489-1495.
- INGHAM, J.L. 1976b. Induced isoflavonoids from fungus-infected stems of pigeon pea (*Cajanus cajan*) *Z. Naturforsch.* 31C:504-508.
- INGHAM, J.L. 1976c. Induced and constitutive isoflavonoids from stems of chickpeas (*Cicer arictinum* L.) inoculated with spores of *Helminthosporium carbonum* Ullstrup. *Phytopath.* Z. 87:353-367.
- INGHAM, J.L. 1979. Phytoalexin production by flowers of garden pea (*Pisum sativum*). *Z. Naturforsch.* 34c: 296-298.
- INGHAM, J.L. 1981. Phytoalexin induction and its taxonomic significance in the Leguminosae (subfamily Papilionoideae). *Proc. Internat. Legume Conf. Kew. 1978.* (Adv. Legume Systematics). 599-626.
- INGHAM, J.L. 1982. Phytoalexin Production by Ononis species. *Bioch. Syst. Ecol.* 10(3):233-237.
- INGHAM, J.L. & DEWICK, P.M. 1980. Sparticarpin: a pterocarpan phytoalexin from *Spartium jun-cum*. *Z. Naturforsch.* 35c:197-200.
- INGHAM, J.L. & HARBORNE, J.B. 1976. Phytoalexin induction as a new dynamic approach to the study of systematic relationships among higher plants. *Nature*, 260: 241-243.
- INGHAM, J.L.; KEEN, N.T.; MARKHAM, K.R. & MULHEIRN, L.J. 1981. Dolichins A and B, two new pterocarpan from bacteria-treated leaves of *Dolichos biflorus*. *Phytochemistry.* 20: 807-809.
- ISHIGURI, J.; TOMIYAMA, K.; MURAI, A.; KATSUI, N. & MASAMUNE, T. 1978. Toxicity of rishitin, rishitin-M-1, and rishitin-M-2 to *Phytophthora infestans* and potato tissue. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 44: 52-56.
- KAPLAN, D.T.; KEEN, N.T. & THOMASON, I.J. 1980. Studies on the mode of action of glyceollin on soybean. Incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 319-325.
- KATO, T.; YAMAGUCHI, Y.; UYEHARA, T.; YOKOYAMA, T.; NAMAI, T. & YAMANAKA, S. 1983. Defense mechanism of the rice plant against rice blast disease. *Naturwissensch* 70: 200-201.
- KEEN, N.T. 1971. Hydroxyphaseolin production by soybeans resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 265-275.
- KEEN, N.T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production determinants of race specificity in pathogens. *Science.* 187: 74-75.
- KEEN, N.T. 1978. Phytoalexins: efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. *Phytopathology.* 68: 1237-1239.
- KEEN, N.T. & LEGRAND, M. 1980. Surface glycoproteins: evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *P. megasperma* sp. *glycenea*. *Physiol. Plant Pathol.* 17: 175-192.
- KEEN, N.T. & LITTLEFIELD, L.J. 1979. The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*. *Physiol. Plant Pathol.* 14: 265-280.
- KÜC, J. 1982. Phytoalexins from the solanaceae pp.81-100. In: *Phytoalexins*. J.A. Bailey, J.W. Mansfield (ed.). Blackie, London.
- KUMAR, S.; SHUKLA, R.S.; SINGH, K.P.; PAXTON, J.D. & HUSAIN, A. 1984. Glycoellin: a phytoalexin in leaf blight of *Costus speciosus*. *Phytopathology.* 74: 1349-1352.
- LANGCAKE, P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, E-veniferin, α-veniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 213-226.
- LANGCAKE, P. & PRYCE, R.J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis venifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86.

- LEE, S.C. & WEST, C.A. 1981. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer* is an elicitor of casbene synthase activity in Castor bean seedlings. *Plant Physiol.* 67:633-639.
- LETCHER, R.M.; WIDDOWSON, D.A.; DEVERALL, B.J. & MANSFIELD, J.W. 1970. Identification and activity of wycorone acid as a phytoalexin in broad bean (*Vicia faba*) after infection by *Botrytis*. *Phytochemistry* 9:249-252.
- LEWIS, D.H. 1980. Are there inter-relations between the metabolic role of baron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen. *New Phytol.* 84:261-270.
- LYON, G.D. & MAYO, M.A. 1978. The phytoalexin rishitin affects the viability to isolated plant protoplasts. *Phytopath.* Z. 92:294-304.
- MOESTA, P. & GRISEBACH, H. 1980. Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexin metabolism in soybean. *Nature.* 286:710-711.
- MÜLLER, K.O. & BÖRGER, H. 1940. Experimentelle untersuchungen über die *Phytophthora* - Resistenz der Kartoffel. *Arb Biol. Anst. Reichsanst (Berl.)* 23:289-231.
- OBA, K.; NAKAMURA, A. & IWAOKAWA, J. 1984. Isolation of furanoterpene - containing partules from *Ceratocystis fimbriata* - infected sweet potato tissue. *J. Biochem.* 96:1951-1954.
- OKU, H.; SHIRAIISHI, T. & OUCHI, S. 1973. Phytoalexin induction by some agricultural fungicides and phytotoxic metabolites of pathogenic fungi. *Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ.* 42:17-20.
- PERRIN, D.R. & CRUICKSHANK, I.A.M. 1965. Studies on phytoalexins VII Chemical stimulation of pisatin formation in *Pisum sativum* L. *Aust. J. Biol. Sci.* 18:803-816.
- PONCHET, M.; MARTIN-TANGUY, J.; MARAIS, A. & POUPET, A. 1984. Dianthramides A and B, two N. benzoylanthranilic acid derivatives from elicited tissues of *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry.* 23:1901-1903.
- RAHE, J.E. & ARNOLD, R.M. 1975. Injury-related phaseollin accumulation in *Phaseolus vulgaris* and its implications with regard to specificity of host parasite interaction. *Can. J. Bot.* 53:921-928.
- RICH, J.R.; KEEN, N.T. & THOMASON, I.J. 1977. Association of coumestans with hypersensitivity of lima roots of *Pratylenchus scribneri*. *Physiol. Plant Pathol.* 12:329-338.
- ROBESON, D.J. 1978. Furanooacetylene and isoflavonoid phytoalexins in *Lens culinaris*. *Phytochemistry.* 17:807-808.
- RODRIGUES, Jr., C.J. 1980. *Resistência das Plantas aos Agentes Patogênicos*. Junta de Investigações científicas do Ultramar-Lisboa, 67p.
- ROYLE, D.J. 1976. Structural Features of Resistance to Plant Diseases. pp.161-190. In: *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships*. J. Fiend & D.R. Trelfall eds. pp.161-190.
- SANDER, C.B. HADWIGER, L.A. 1979. L-phenylalanine ammonia-lyase and pisatin induction by 5-bromodeoxyuridine in *Pisum sativum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 563:278-292.
- SAKAI, S.; TOMIYAMA, K. & DOKEN, 1979. Synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin rishitin in non-infected tissue from various parts of potato plants immediately after slicing. *Ann Phytopath. Soc. Japan.* 45:705-711.
- SCHEEL, L.D.; PERONE, V.B.; LARKIN, R.L. & KUPEL, R.E. 1963. The isolation and characterization of two phytotoxic furanocoumarins (psoralens) from diseased celery. *Biochemistry.* 2:1127-1131.
- SCHONBECK, F. & SCHLOSSER, E. 1976. Preformed substances as potential protectants. pp.653-673. In: *Physiological plant pathology*. ed. R. Heitefuss, P.H. Williams, Springer-Verlag, Berlin.
- SCHWOCHALL, M.E. & HADWIGER, L.A. 1968. Stimulation of pisatin production in *Pisum sativum* by actinomycin D and other compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 126:731-733.
- SKIPP, R.A. & BAILEY, J.A. 1976. The effect of phaseollin on the growth of *Colletotrichum lindemuthianum* in bioassays designed to measure fungitoxicity. *Physiol. Plant Pathol.* 9:253-263.
- SKIPP, R.A. & BAILEY, J.A. 1977. The fungitoxicity of isoflavonoid phytoalexins measured using different types of bioassay. *Physiol. Plant Pathol.* 10:101-112.
- SKIPP, R.A.; SELBY, C. & BAILEY, J.A. 1977. Toxic effects of phaseollin on plant cells. *Physiol. Plant Pathol.* 10:221-227.
- SMITH, D.A. 1982. Toxicity of phytoalexins pp.218-247. In: *Phytoalexins*. J.A. Bailey, J.W. Mansfield (ed). Blackie, London.
- SITTON, D. & WEST, C.A. 1975. Casbene: an antifungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry.* 14:1921-1925.
- STOESSL, A. 1976. Secondary Plant metabolites in plant disease resistance part II. Phytoalexins. *Fitopatol. bras.* 11:25-53.
- SUTHERLAND, O.R.W.; RUSSELL, G.B.; BIGGS, D.R. & LANE, G.A. 1980. Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. *Biochem. Syst. Ecol.* 8:73-75.
- TAKASUGE, M.; ANETAI, M.; MASAMUNET, T.; SHIRATA, A. & TAKAHASHI, K. 1980. Studies on the phytoalexins of the Moraceae 2. Broussonins A and B, new phytoalexins from diseased paper mulberry. *Chem. Lett.* 339-340.
- TAKASUGE, M.; NIINO, N.; MASAKI, A.; MASAMUNE, T.; SHIRATA, A. & TAKAHASHI, K. 1984. Studies on the phytoalexins of the Moraceae. 14. Structure of stress metabolites, spiro broussonins A and B, from diseased paper mulberry. *Chem. Lett.* 693-694.

- TIETJEN, K.G. & MATERN, U. 1984. Induction and suppression of phytoalexin biosynthesis in cultured cells of safflower, *Carthamus tinctorius* L., by metabolites of *Alternaria carthami* Chowdhury. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 136-144.
- TRAN, T. van; TOABART, K.P.; COUSSON, A.; DARVILL, A.G.; GOLLIN, D.J.; CHELF, P. & ALBERSHEIM, P. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* (London). 314: 615-617.
- TURNER, E.M.C. 1961. An enzymic basis for pathogenic specificity in *Ophiobolus graminis*. *J. Exp. Botany*, 12: 169-175.
- UEGAKI, R.; FUJIMORI, T.; KANEKO, H.; KUBO, S. & KATO, K. 1980. Phytuberin and phytuberol, sesquiterpenes from *Nicotiana tabacum* treated with etrel. *Phytochemistry* 19: 1543-1544.
- URITANI, I.; OBA, K.; KOJIMA, M.; KIM, W.K.; OGUNI, I. & SUZUKI, H. 1976. Primary and secondary defense actions of sweet potato in response to infection by *Ceratocystis fimbriata* strains. In: *Biochemistry and Cytology of Plant-parasite interaction*, pp.239-242. Kodansha Ltd., Tokyo.
- VANETTEN, H.D. 1973. Differential sensitivity of fungi to pisatin and to phaseollin. *Phytopathology* 63: 1477-1482.
- VANETTEN, H.D.; PUEPPKE, S.G. & KELSEY, T.C. 1975. 3,6a-dihydroxy-8,9-methylenedroxyptero-carpan as a metabolite of pisatin produced by *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Phytochemistry* 14: 1103-1105.
- VARNIS, J.L.; KÚC, J. & WILLIAMS, E.B. 1971. Terpenoid accumulation as a biochemical response of the potato tuber to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 61: 174-177.
- VEECH, J.A. 1978. An apparent relationship between methoxy substituted terpenoid aldehydes with the resistance of cotton to *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 24: 81-87.
- WADE, M. & ALBERSHEIM, P. 1979. Race specific molecules that protect soybeans from *Phytophthora megasperma* var. sojae. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 4433-4437.
- WALKER, J.C. & STAHAMANN, M.A. 1955. Chemical nature of disease resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 6: 351-366.
- WARD, E.W.B.; UNWIN, C.H.; ROCK, G.L. & STOESSL, A. 1976. Post-infectious inhibitors from plants XXIII. Sesquiterpenoid phytoalexins from fruit capsules of *Datura stramonium*. *Can. J. Bot.* 54: 25-29.
- WARD, E.W.B.; UNWIN, C.H. & STOESSL, A. 1975. Loro-glassol: an archid phytoalexin. *Phytopathology* 65: 632-633.
- WIJNSMA, R.; GO, J.T.K.A.; VAN WEERDEN, I.N.; HARKES, P.A.A.; VERPOORTE, R.; BAIRHEM SUENDSEN, A. 1985. Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Chinchona* species. *Plant Cell Rep.* 4(5):241-244.
- YORK, W.S.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Inhibition of 2,4-D-stimulated elongation of pea and stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant Physiol.* 75: 295-297.
- YOSHIKAWA, M. 1978. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Nature*, 275: 546-547.
- ZERINGUE, H.J. 1984. The accumulation of five fluorescent compounds in the cotton leaf induced by cell-free extracts of *Aspergillus flavus*. *Phytochemistry*, 23: 2501-2503.