

**Alterações químicas
induzidas por coccídeos
galhadores (Coccoidea,
Brachyscelidae) em folhas
de *Rollinia laurifolia* Schdtl.
(Annonaceae)**

Geraldo L.G. Soares¹
Rosy M.S. Isaias²
Samuel J.M.R. Gonçalves²
Jacira C.S. Christiano²

**CHEMICAL CHANGES INDUCED BY
GALL FORMING COCCIDS
(COCCOIDEA, BRACHYSCOLIDAE)
IN LEAVES OF *Rollinia laurifolia*
SCHDTL. (ANNONACEAE)**

ABSTRACT: Gall forming coccids (Coccoidea, Brachyscelidae) attack leaves of *Rollinia laurifolia* SCHDTL. (Annonaceae). Chemical changes due to cecidogenesis are not well known. Plant species of Annonaceae produce several derivatives of chiquimic acid, nevertheless, references on the isolation of flavonoids in this plant family are rare. This study presents the analyses of the ethanolic extracts of leaves of *R. laurifolia* with and without galls by thin layer chromatography (TLC) and high

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, CEP 36.036-330, Juiz de Fora, MG, e-mail: gsoares@icb.ufjf.br

² Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, CP 486, e-mail: rosmary@dedalus.lcc.ufmg.br

performance liquid chromatography (HPLC). The analysis by TLC detected flavonoid derivatives in both extracts. Therefore, the extract of leaves with galls exhibited a larger number of detectable substances. The chromatographic profile (HPLC) of the extracts revealed enormous differences in the chemical pattern of the analysed samples. The extract of healthy leaves presented more polar substances, while the extracts of the leaves with galls exhibited a qualitative increase in less polar derivatives. The present results indicate that flavonoids are good biochemical markers for changes induced by gall forming coccids in *R. laurifolia*.

Key Word: Plant galls, Coccoidea (Brachyscelidae), flavonoids, phenolic derivatives, HPLC, TLC.

INTRODUÇÃO

A associação biológica entre insetos indutores de galhas e plantas não causa benefícios ao vegetal. Pela produção da galha, o inseto indutor, por sua vez, obtém abrigo e nutrição, além de garantir sua dispersão. O valor adaptativo desta complexa inter-relação galhador versus planta têm sido amplamente discutido (MANI 1964; PRICE *et al.*, 1987; ISAIAS, 1998).

Galhas causadas por indutores pertencentes a diferentes grupos taxonômicos apresentam diferentes padrões de formação de metabólitos primários de reserva que podem ser proteínas, lipídios ou mais comumente amido. Os gradientes formados são resultado das interações entre as condições citológicas e químicas das células e o fluxo de açúcares da planta hospedeira. A planta hospedeira supre substâncias para a galha, que funciona como um dreno, para o qual o fluxo de assimilados é direcionado, sob influência das conexões vasculares, da distância entre os dois pontos e do tamanho da fonte, sem que haja controle algum por parte dos tecidos da fonte sobre o destino dos assimilados que produzem (HARTLEY, 1998).

Além dos metabólitos primários, nitidamente relacionados à nutrição do indutor, as galhas apresentam variações nos compostos originados do metabolismo secundário, dentre

os quais os mais estudados são os derivados fenólicos. A presença destas substâncias é considerada como parte da estratégia de defesa da planta contra o ataque de insetos herbívoros (MANI, 1964; PRICE *et al.*, 1987; PRICE, 1990). Entretanto, o fato de alguns herbívoros utilizarem os metabólitos secundários sequestrados das plantas predadas para deter seus próprios predadores foi ressaltado por diversos autores citados por HERMS & MATTSON (1992).

PRICE *et al.* (1987) chamam a atenção para o fato de que a defesa não é o único papel dessas substâncias. Outras funções incluem a atração de polinizadores, a proteção contra a radiação UV e regulação dos fitormônios. RUBIN & ARTSIKHOVSKAYA (1964), discutindo reações de oxidação em plantas, mostraram a diversidade dos papéis fisiológicos dos derivados fenólicos. Estas substâncias participam das reações de oxi-redução da célula vegetal, e possuem um papel importante no processo de lignificação. Portanto, é possível que mesmo pequenas mudanças no metabolismo dos derivados fenólicos possam interferir em processos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (WHELLER, 1975).

Alterações no metabolismo dos derivados fenólicos do tecido vegetal predado parecem beneficiar o inseto galhador. O aumento na produção dessas substâncias na planta poderia, direta ou indiretamente, proteger esse inseto do ataque de parasitóides e de predadores, além de reduzir a competição por alimento ao inibir o ataque de outros insetos fitófagos não adaptados ao ambiente químico dos tecidos vegetais (JANZEN, 1977; CORNELL, 1983). Essas substâncias também podem favorecer o inseto galhador interferindo no balanço hormonal relacionado ao campo cecidogenético. Já foi comprovado que alguns derivados fenólicos agem sinergicamente com as auxinas no estímulo ao crescimento (TAKAHAMA, 1988). A presença de alguns fenóis pode, por exemplo, inibir as AIA-oxidases, aumentando assim a ação das auxinas envolvidas no processo de hipertrofia celular que ocorre durante a formação da galha (FOSKET, 1994). Além disso, esses derivados fenólicos podem agir como inibidores das reações de hipersensibilidade ao minimizar a resposta aos radicais livres produzidos nos sítios de oviposição (FERNANDES *et al.*, 1998). Portanto, a presença dos fenóis não constitui uma barreira efi-

ciente à oviposição do indutor, nem ao desenvolvimento das galhas.

Sabe-se que muitos insetos picadores-sugadores de plantas produzem enzimas como as polifenol-oxidases (PPO) (MILES, 1968; 1969) e peroxidases (HORI, 1992). As PPOs presentes na saliva desses insetos podem agir para converter derivados fenólicos potencialmente tóxicos em produtos não tóxicos, sendo este o mecanismo provavelmente utilizado pelos indutores de galhas. Supõe-se que existe um balanço delicado na interação fenol-PPO dos insetos e suas plantas hospedeiras, e que este balanço determina se o ataque pelos insetos resultará em necrose ou em galhas. A evidência deste balanço é demonstrado pelo gradiente observado da região de necrose até a hipertrofia circundante dos tecidos, como ocorre em muitas galhas (MILES, 1968). Os complexos papéis dos compostos fenólicos e das fenol-oxidases podem indicar que o sistema fenol-PPO tenha uma atuação mais dramática para a indução da galha do que as auxinas produzidas pela célula vegetal (HORI, 1992).

As alterações químicas associam-se diversos graus de complexidade estrutural, os quais tem sido relacionados aos diferentes grupos de insetos indutores de galhas. Os Homoptera induzem galhas relativamente complexas em estrutura, localizadas predominantemente em folhas, sendo especialmente galhas de cobertura. As galhas de Coccoidea estão entre os três grupos ecológicos de galhas de Homoptera reconhecidos por MANI (1964).

Os coccídeos, que incluem mais de 4000 espécies, são distribuídos por todo o mundo e estão entre as pragas mais destrutivas para as plantas, compreendendo as chamadas cochonilhas. Estes insetos apresentam grande importância por parasitarem plantas de interesse agrícola e ornamental. Dentre as milhares de espécies de coccídeos conhecidas, pouquíssimas são indutoras de galhas (MANI, 1964; MEYER, 1987). Os braquiscelídeos (Coccoidea, Brachyscelidae) constituem um grupo particularmente interessante do ponto de vista cecidogenético, do qual pouco se sabe sobre as galhas que induzem, sua citohistologia ou sua cecidogênese (MEYER, 1987). Existem fortes indícios de que as galhas foliares de *Rollinia laurifolia* SCHDTL. (Annonaceae) sejam induzidas por

um inseto deste grupo. Para a flora brasileira, MAAS & WESTRA (1992) citam a ocorrência de galhas induzidas por um Pseudococcidae (*Pseudotectococcus anonae*) em *Rollinia sylvatica* em material proveniente da Serra do Japi - SP.

As galhas induzidas por Diptera (Cecidomyiidae) e por Cynipidae (Hymenoptera) são bastante estudadas. Recentemente, análises histoquímicas feitas em diferentes espécies de *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae) comprovam o estímulo à produção de derivados fenólicos associada à formação de galhas foliares induzidas por espécies de Cecidomyiidae (Diptera) (ISAIAS, 1998). Em contrapartida, as galhas induzidas por coccídeos e as conseqüentes alterações químicas ocorridas na planta hospedeira são pouco estudadas.

O objetivo do presente estudo é a análise química, através da comparação dos perfis cromatográficos (CLAE) de folhas sadias e de folhas com galhas de *R. laurifolia*. Pretende-se associar as possíveis diferenças encontradas nos padrões cromatográficos à infestação pelo coccídeo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

O espécime de *R. laurifolia* estudado encontra-se na estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus da Pampulha, Belo Horizonte (MG). Uma exsicata de referência do material vegetal estudado encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFMG, sob o registro BHC B 25331.

2. Extração

Para a preparação dos extratos, foi empregada uma abordagem fitoquímica clássica para a obtenção de extratos com riqueza de constituintes polares (HARBORNE, 1984; MATOS, 1997). Folhas de *R. laurifolia* sadias e com galhas foram coletadas e posteriormente secas e liofilizadas. Amostras de 20 g de cada material foram submetidas à extração exaustiva em aparelho de Soxhlet (24h) com hexano P.A. para eliminação dos constituintes com polaridade muito reduzida. Em seguida, foi feita a extração exaustiva com etanol PA (8h). Os

extratos etanólicos de folhas sadias e de folhas com galhas foram posteriormente submetidos a análise cromatográfica.

3. Análise Cromatográfica

Inicialmente, os extratos etanólicos de folhas sadias (EFS) e de folhas com galhas (EFG) foram submetidos à cromatografia de camada delgada (CCD) com gel de sílica, utilizando-se como eluente a mistura acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (100:11:11:27). Os reveladores usados foram: FeCl₃ a 1% em metanol, vapores de amônia e NP/PEG sob luz UV (365nm) (WAGNER *et al.*, 1984). Em seguida, foram elaborados, em condições apropriadas para a análise de flavonóides (MARKHAM, 1982), os perfis cromatográficos do EFS e do EFG. Essa análise foi feita pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se um cromatógrafo Waters equipado com uma coluna de fase reversa RP18 (250x4mm, Φ 5mm) e com um detector UV486. A velocidade de injeção utilizada foi igual a 1ml/min e o eluente escolhido foi acetonitrila-H₂O. A detecção de constituintes do EFS e do EFG foi realizada a 220, 260 e 340 nm (PAIVA, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por cromatografia de camada delgada (CCD) com gel de sílica permitiu detectar a presença de derivados flavonoídicos, tanto no extrato de folhas sadias (EFS) quanto no extrato de folhas com galhas (EFG). Ambos os extratos apresentaram solubilidade e comportamento cromatográfico semelhantes. Entretanto, foi detectado um maior número de substâncias no material proveniente de folhas com galhas (EFG) e tais substâncias mostraram-se menos polares.

Existem poucas referências sobre a produção de flavonóides em espécies de Annonaceae. Entretanto, esta família se destaca pela produção de derivados da via do chiquimato (GOTTLIEB *et al.*, 1995) que é responsável pela produção da maioria dos derivados fenólicos produzidos por plantas. Alguns gêneros de Annonaceae são produtores de flavonóides relativamente pouco polares e com um padrão

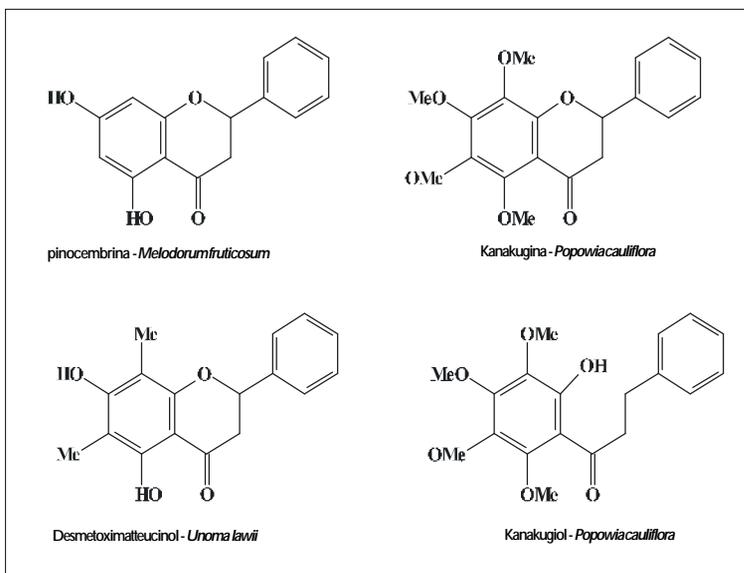


Figura 1 - Flavonóides isolados de espécies de Annonaceae (Harborne, 1988 e 1994).

incomum de substituição (Figura 1), como por exemplo a ausência de oxigenação no anel B (HARBORNE, 1988; HARBORNE, 1994).

A análise dos perfis cromatográficos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 2A-F, Tabelas 1 e 2) é coerente com os resultados obtidos por cromatografia de camada delgada. Foi possível, mais uma vez, se constatar a produção de derivados fenólicos, provavelmente flavonóides, em ambas amostras de folhas de *R. laurifolia*.

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se resumidos os resultados mostrados nos cromatogramas representados na Figura 2 (A-C) e na Figura 2 (D-F), respectivamente. As substâncias detectadas como sinais em cada amostra analisada (EFS e EFG) encontram-se listadas com seu tempo de retenção em minutos e sua área em % da área total do cromatograma. É importante salientar que, devido ao uso de uma coluna de fase reversa (pouco polar), o tempo de retenção das substâncias detectadas é inversamente proporcional a sua polaridade. A área do sinal no cromatograma é proporcional ao teor da substância correspondente na amostra.

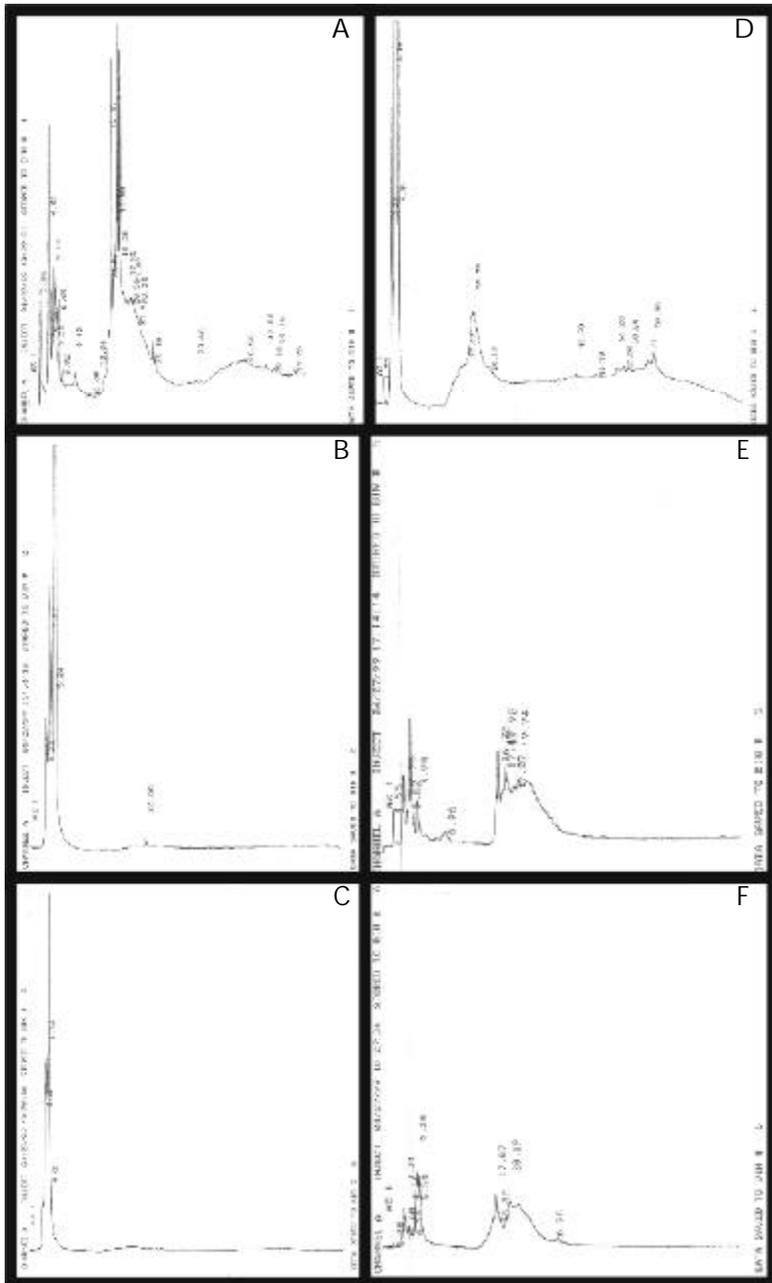


Tabela 1 - Perfil Cromatográfico (CLAE) do extrato de folhas sadias (EFS) de *R. laurifolia*. TR= tempo de retenção; A= área do sinal no cromatograma

SINAL	220nm		260nm		340nm	
	TR (min)	A (%)	TR (min)	A (%)	TR (min)	A (%)
1	2,28	2,26	3,23	8,40	3,55	37,02
2	4,02	7,02	3,87	27,21	4,14	20,17
3	4,60	2,58	5,04	63,95	4,62	42,81
4	5,14	5,06				
5	5,58	1,71				
6	6,08	2,34				
11	16,16	3,42				
12	16,51	8,54				
13	17,47	7,45				
14	17,98	11,56				
15	18,38	42,71				

Obs. Foram eliminados os sinais com A < 1%.

Tabela 2 - Perfil cromatográfico (CLAE) do extrato de folhas com galhas (EFG) de *R. laurifolia*. TR= tempo de retenção; A= área do sinal no cromatograma

SINAL	220nm		260nm		340nm	
	TR (min)	A (%)	TR (min)	A (%)	TR (min)	A (%)
1	3,20	12,55	1,55	2,64	3,34	8,32
2	4,13	34,55	2,96	9,20	3,60	6,63
3	4,81	10,73	3,82	25,88	4,16	4,37
4	19,39	8,69	4,94	8,13	4,54	2,61
5	20,70	23,16	8,96	2,99	5,28	19,21
6	24,19	5,65	16,72	17,41	5,58	26,45
7	57,71	1,00	17,47	8,85	17,87	22,40
8	58,86	2,37	17,90	16,78	18,32	4,57
9	19,07	4,78	20,19	4,61		
10	19,74	3,35				

Obs. Foram eliminados os sinais com A < 1%.

É notável a menor ocorrência de substâncias no extrato de folhas sadias (EFS). Esse extrato apresentou 15 substâncias detectáveis a 220 nm e apenas 3 substâncias detectáveis a 260 nm e a 340 nm (Tabela 1, Figura 2A-C). Duas das 15 substâncias detectadas a 220 nm, referentes ao sinal 14 e ao sinal 15, somam mais de 50% do total identificado nessa faixa de comprimento de onda. Os tempos de retenção mais baixos indicam que os constituintes detectados no EFS são relativamente mais polares. De maneira geral, a amostra proveniente de folhas com galhas (EFG) se mostrou mais rica em constituintes detectáveis (Tabela 2, Figuras 2D-F). A análise dos perfis cromatográficos permite verificar que os tempos de retenção das substâncias detectadas no EFG são sensivelmente maiores que os tempos de retenção das substâncias detectadas no EFS (Tabelas 1 e 2). Este fato indica uma polaridade relativamente menor das substâncias do extrato de folhas com galhas.

Uma estratégia metabólica de proteção do núcleo flavonoídico contra a degradação oxidativa é a proteção das hidroxilas fenólicas (SOARES, 1996). Em espécies de Annonaceae podemos observar frequentemente a produção de derivados no qual essa proteção é feita formação de éteres metílicos (substituição do tipo O-metila) como é o caso das substâncias kanakugina

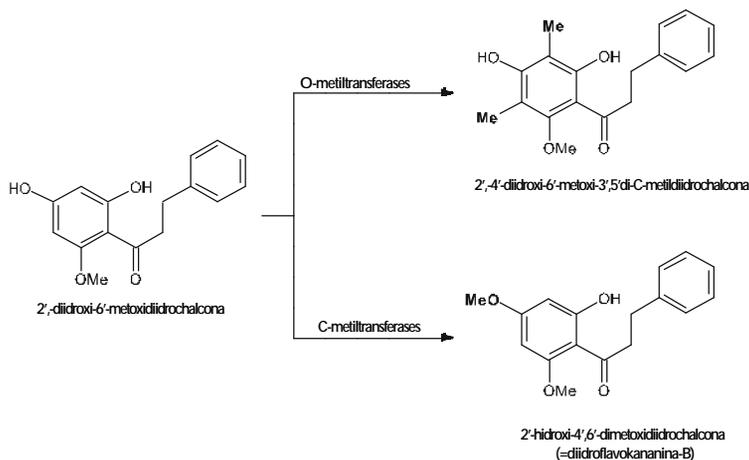


Figura 3 - Formação derivados flavonóides menos polares a partir de um mesmo precursor biossintético. Os flavonóides exemplificados foram isolados de *Uvaria angolensis* (Annonaceae).

e kanakugiol (Figura 1) (HUFFORD & OGUNTIMEN, 1980; 1982). Importante salientar que a formação de esteres metílicos provoca redução da polaridade da substância formada quando esta é comparada ao seu precursor imediato.

Em outra espécie de *Annonaceae*, *Uvaria angolensis*, é verificada a biossíntese de derivados flavonoídicos menos polares tanto pela produção de esteres metílicos quanto pela metilação direta do anel fenólico, o que resulta em uma nova ligação carbono-carbono (Figura 3). (HUFFORD & OGUNTIMEN, 1980; 1982). Outros derivados flavonoídicos incomuns produzidos por *U. angolensis* são os C-benzilados (MUHAMMAD & WATERMAN, 1985). Este tipo de substância reforça mais uma vez a tendência das espécies de *Annonaceae* em produzir flavonóides menos polares.

A capacidade de formar derivados pela metilação das hidroxilas fenólicas ou pela metilação de carbonos do anel fenólico, já observada em outras espécies da família *Annonaceae*, pode ter relação com a redução de polaridade das substâncias detectadas em folhas com galhas de *R. laurifolia*. O ataque do galhador pode estar estimulando enzimas responsáveis por essas transformações biossintéticas.

Os metabólitos secundários, especialmente os derivados fenólicos (flavonóides, derivados dos ácidos cinâmico e gálico), são citados como potentes antioxidantes (GOTTLIEB *et al.*, 1996; KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994). Apesar de não ser efetivo na proteção de *R. laurifolia* contra o ataque do coccídeo, a maior produção de flavonóides no extrato de folhas com galhas pode ser uma resposta ao estresse oxidativo que ocorre durante a cecidogênese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Folhas sadias e folhas com galhas de *R. laurifolia* são quimicamente distintas como indicam os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de folhas sadias e de folhas com galhas. A presença de galhas em folhas desta espécie vegetal é acompanhada por alterações no metabolismo de derivados flavonoídicos.

Muito embora os derivados fenólicos sejam comumente relacionados à defesa das plantas contra a herbivoria, a pre-

sença dessas substâncias não impediu a oviposição do indutor, nem o desenvolvimento das galhas.

É possível que o aumento na produção de derivados flavonoídicos seja uma resposta a um estresse oxidativo provocado pelo processo cecidogênico. A diminuição da polaridade das substâncias detectadas em folhas com galhas de *R. laurifolia* reforça essa hipótese.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos agradecer ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG nas pessoas do professor Délio Raslan, pela sessão da aparelhagem utilizada no presente trabalho, e da Técnica Ângela Cristina Assumpção pelo valioso apoio nas análises químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORNELL, H.V. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae (Hymenoptera): why and how? **Am. Midl. Nat.** **110**(2):225-234.
- FERNANDES, G.W.; T.G. CORNELISSEN; R.M.S. ISAIAS & A.T.F. LARA. 2000. Plants combat against galls: hypersensitivity. **Ciência e Cultura** (no prelo).
- FOSKET, D.E. 1994. **Plant growth and development. A molecular approach.** Academic Press, London, 580p.
- GOTTLIEB, O.R.; M.R.M.B. BORIN & M.A.C. KAPLAN. 1995. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. **Phytochemistry** **40**(1): 99-113.
- GOTTLIEB, O.R.; M.A.C. KAPLAN & M.R.M.B. BORIN. 1996. **Biodiversidade. Um Enfoque Químico-Biológico.** Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 267p.
- HARBORNE, J.B. 1984. **Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** 2nd Edition, Chapman & Hall, London, 288p.
- HARBORNE, J.B. 1988. **The Flavonoids - Advances in Research Since 1980.** Chapman & Hall, London, 697p.
- HARBORNE, J.B. 1994. **The Flavonoids - Advances in Research**

- Since 1986.** Chapman & Hall, London, 703p.
- HARTLEY, S.E. 1998. The chemical composition of plant galls: are level of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former ? **Oecologia** **113**:492-501.
- HERMS, D.A. & W.J. MATTSON. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. **The Quart. Rev. Biol.** **67**(3):283-335.
- HORI, K. 1992. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans, p. 157-170. *In*: SHORTHOUSE, J.D. & O. ROHFRIETSCH. **Biology of insect-induced galls**. Oxford University Press, New York. 296p.
- HUFFORD, C.D. & B.O. OGUNTMEIN. 1980. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. **Phytochemistry** **19**(9) 2036-2038.
- HUFFORD, C.D. & B.O. OGUNTMEIN. 1982. New dihydrochalcones and flavanones from *Uvaria angolensis*. **J. Nat. Prod.** **45**(3) 337-342.
- ISAIAS, R.M.S. 1998. **Galhas em Machaerium (Leguminosae – Papilionoideae): Anatomia e histoquímica**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 220p.
- JANZEN, D.H. 1977. Why fruits rot, seeds mold and meat spoils. **Am. Nat.** **111**:691-713.
- KANDASWAMI, C. & E. MIDDLETON Jr. 1994. Free Radicals Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids, p. 351-376 *In*: ARMSTRONG, D. (Ed.) **Free Radicals in Diagnostic Medicine**. Plenum Press, New York, 750p.
- MAAS, P.J.M. & L.Y.Th. WESTRA. 1992. **Flora neotropica. Rollinia**. Mon. 57. 188p.
- MANI, M.S. 1964. **Ecology of plant galls**. The Hague. Dr. W. Junk. Publishers, 434p.
- MARKHAN, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, 113 p.
- MATOS, F.J.A. (1997) **Introdução à Fitoquímica Experimental**. UFC Edições, Fortaleza, 141p.
- MEYER, J. 1987. **Plant galls and gall inducers**. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 291p.
- MILES, P.W. 1968. Insect secretion in plants. **Ann. Rev. Phytopathol.** **6**:137-164.
- MILES, P.W. 1969. Effect of plant and insect hormones on the formation of the goldenrod gall. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**

31:487-491.

- MUHAMMAD, I. & WATWRMAN, P.G. 1985. Chemistry of Annonaceae.18. Benzylated indoles and dihydrochalcones in *Uvaria angolensis* from Tanzania. **J. Nat. Prod.** **48**(4) 571-580.
- PAIVA, S.R. 1999. **Aspectos da Biologia Celular e Molecular de Espécies de Plumbaginaceae**. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 102p.
- PRICE, P.W.; G.W. FERNANDES & G.L. WARING. 1987. Adaptive nature of insect galls. **Environ. Entomol.** **16**:15-24.
- PRICE, P.W. 1990. Evaluating the role of natural enemies in latent and eruptive species. New approaches in life table constructions. 221-232p. *In*: WATT, A.D.; LEATHER, S.R.; HUNTER, M.D. & KIDD, M.A. **Population dynamics of forest insects**. Intercept, Undover, Hampshire. 424p.
- RUBIN, B.A. & E.V. ARTSIKHOVSKAYA. 1964. Biochemistry of pathological darkening of plant tissues. **Ann. Rev. Phytopathology** 2:157-178.
- SOARES, G.L.G. 1996. **Polarizações da Química Flavonoídica em Linhagens Vegetais**. Tese de Doutorado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 133p.
- TAKAHAMA, U. 1988. Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in epidermal and guard cells of *Tradescantia virginiana* L. **Plant Cell Physiol.** **29**:433-438.
- WAGNER, H.; S. BLADT. & E.M. ZGAINSKI. 1984. **Plant Drug Analysis**. Springer-Verlag, Berlin. 394p.
- WHEELER, H. 1975. **Plant pathogenesis**. Springer-Verlag, Berlin. 106p.