

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE UN EXUDADO DE SEMILLAS DE *Cedrella fissilis* Vell.

STUDY OF THE ANTIFUNGAL PROPERTIES OF AN EXUDATE FROM SEEDS OF *Cedrella fissilis* Vell.

Teresa Argüelles¹
Juan Pedro Agostini²
Graciela Fernández³

Fecha recepción: Octubre 1999

Fecha aceptación: Agosto 2000

1. Master en Ciencias. Lab. de Investigación de Química Forestal. Fac. C. Ftale. UNaM. Misiones.
2. Ph. D. Laboratorio de Patología Forestal. Fac. C. Ftale. UNaM. Misiones.
3. Doctor en Ciencias Químicas. Lab. de Ciencias Básicas. U. Nac. de Luján. Bs. As.

SUMMARY

Working with *Cedrella fissilis* seed, it was discovered a substance that exuded into the germinating substrate. The efforts were therefore directed to the study of some of the characteristics of the substance, specially regarding its antifungal capability, and the influence over the germination process of the seed that produces it. The results of treating the seed with transcription and translation inhibitors, the isolation and separation of RNA by means of electrophoretic methods and the effect of the inhibitors over the presence of the active metabolite were described.

Key words: Seed, *Cedrella fissilis*, exudate, RNA, antifungal effect.

RESUMEN

En las semillas de *Cedrella fissilis* Vell. se determinó la presencia de una sustancia que lixiviaba al sustrato de germinación. El objetivo de este trabajo fue el estudio de algunas de las características de la sustancia en cuanto a su poder antifúngico, así como su influencia sobre la germinación de las propias semillas que la producen. Se describen también los resultados del tratamiento de las semillas con inhibidores de la transcripción y traducción proteínica, posterior aislamiento y separación electroforética del ARN, y el efecto de los inhibidores sobre la presencia del metabolito activo.

Palabras clave: Semillas, *Cedrella fissilis*, lixiviación, ARN, efecto antifúngico

INTRODUCCIÓN

Cedrella fissilis Vell. (*Cedrella tubiflora*) es un árbol de la familia de las Meliáceas, de madera muy apreciada. Es un componente importante de la selva Paranaense Misionera, parte remanente de la gran Mata Atlántica que desde el Océano Atlántico se adentra en el continente hasta la provincia de Misiones y el este de Paraguay (CLAYTON FERREIRA, L. Ed. 1992).

La bibliografía consultada revela que *Cedrella fissilis* produce ciertos metabolitos secundarios con efectos de interés en el área biomédica y bioquímica. Los extractos acuosos de las hojas poseen actividad antimalaria (MACKINNON, S., et al., 1997); actividad sobre macrófagos y leucocitos polimorfonucleares

(BENENCIA, F., et al. 1996) y actividad inmunomoduladora (BENENCIA, F., et al. 1995).

Durante la germinación *in vitro* de semillas de *Cedrella fissilis* Vell., ARGÜELLES et al., 1996, detectaron una sustancia proveniente de las semillas, que exudaba al medio e inhibía el crecimiento de hongos y bacterias. También inhibía su propia germinación.

Este estudio tuvo como fin cuantificar la capacidad antifúngica de la sustancia encontrada comparándola con fungicidas comerciales, en su acción sobre los hongos patógenos. Los dos hongos empleados para el antibiograma son patógenos de los vegetales. *Cladosporium herbarum* causa berrugosis en *Passiflora edulis*, siendo esta una de las causas del porqué la planta no se puede cultivar para consumir su fruto (AGOSTINI, J.P., y TIMMER L.W. 1992). *Colletotrichum gloeosporioides* es cosmopolita y causa entre otras cosas la caída prematura del fruto de los cítricos y el secado de plantines de *Araucaria angustifolia* en vivero (AGOSTINI, J.P. et al. 1992).

Se trató además de dilucidar el mecanismo por el cual las semillas podían sortear la inhibición a la germinación, que ellas mismas producen. Habiendo comprobado que el exudado solo aparece después de un periodo de imbibición de las semillas, se procedió a alterar químicamente los primeros estadios del proceso germinativo y se estudió si dicha alteración implicaba efectos específicos en el metabolismo del exudado. Los análisis de las fracciones del ARN mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se efectuaron para determinar posibles alteraciones en la síntesis de ARN, y relacionar este

hecho con la aparición del exudado.

MATERIALES Y METODOS

Ensayos de germinación

Frutos de *Cedrella fissilis* Vell. fueron recolectados durante el mes de julio de 1998 en la zona de influencia de la ciudad de Eldorado, a orillas del río Paraná, a los 54° 13' de longitud oeste y 26° 40' de latitud sur, en la provincia de Misiones, Argentina. Los árboles de donde provenían los frutos se encontraban aislados, algunos en la rivera del río, en jardines particulares y como árboles de vereda.

Los frutos se dejaron abrir a la sombra en un ambiente cálido y seco, donde la temperatura no sobrepasó los 30°C, las semillas se extrajeron y mezclaron, eliminando las que aparentaban vanas (vacías) al tacto. A fines de julio, el 98% de los frutos se habían abierto. Hasta su utilización, las semillas se guardaron en bolsa de polietileno a 12°C.

Los sustratos empleados para la germinación de las semillas fueron

- tierra del estrato superior de un bosquecillo cercano a la Facultad de Ciencias Forestales, con la que se llenaron macetas de plástico negro de 25 x 30 cm,
- algodón hidrófilo comercial estéril que se ubicó en placas Petri de 9 cm esterilizadas en autoclave,
- medio de cultivo preparado con la solución de sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MURASHIGE et al. 1968), a 1/2 de su concentración, que se solidificó con 0,8% de Bacto-Agar, y cuyo pH se ajustó a 5,7.

La tierra de las macetas y las placas con algodón se mojaron con agua desionizada utilizándose 30 ml por placa. Las macetas se regaron cada dos días con 50 ml y se mantuvieron bajo techo al aire libre.

Previo a la puesta en germinación, un lote de 600 semillas se lavaron en flujo de agua corriente durante dos horas, después de lo cual fue cortada el ala membranosa que es parte del integumento externo, asegurándose que ambos integumentos habían sido perforados y que no existía impedimento mecánico para la imbibición de la semilla. Mientras duró la operación, las semillas se mantuvieron sumergidas en agua. Las semillas así tratadas se sembraron sobre los tres sustratos a), b) y c).

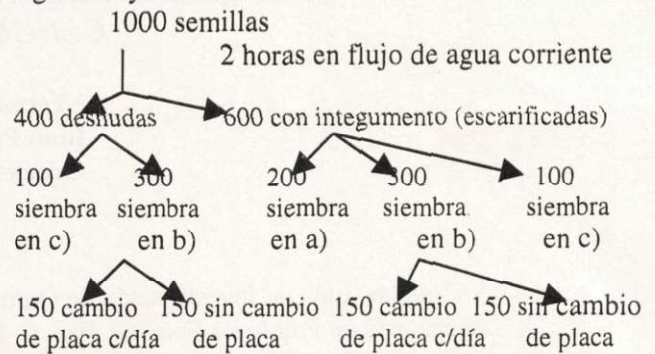
A otro lote de 400 semillas, también mantenidas en flujo de agua por dos horas, se les eliminaron los tegumentos y endosperma remanente, y se sembraron desnudas sobre algodón (sustrato b) y sobre el medio de cultivo (sustrato c) a razón de 12 semillas por recipiente. El número total de semillas ensayadas fue de 1000.

Las placas de Petri con semillas situadas sobre algodón, con integumentos y sin ellos, se dividieron en dos lotes. Las semillas de uno de los lotes se cambiaron cada día a una placa sin usar, de

forma que la sustancia lixiviada no se acumulaba en el algodón que actuaba como sustrato.

Las placas se mantuvieron a 28°C en la penumbra.

El esquema siguiente resume las acciones que se siguieron y las cantidades.



Antibiogramas

Con el fin de comparar el efecto fungicida de la sustancia exudada por las semillas con fungicidas comerciales, dicha sustancia se recogió de la siguiente forma: a los 15 días de la siembra de las semillas desnudas sobre algodón, se extrajo mecánicamente el contenido líquido absorbido por el algodón de una de las placas, se lavó el algodón y la placa con agua desionizada hasta alcanzar los 30 ml originales, esta solución así preparada se empleó para ensayar el efecto antifúngico de la sustancia exudada. Se prepararon placas de Petri con agar-papa glucosado (Merk), que una vez esterilizado se distribuyó en placas estériles de 9 cm (HIRAYAE et al., 1996). Cuando el medio se enfrió hasta los 40°C, se añadieron respectivamente 4 y 10 mg/l de Benlate (DuPond), 8 y 20 mg/l de Lonacol (Bayer), y la solución exudada al 1% y 0,5%. Como control se añadió agua bidestilada.

Se emplearon cultivos puros en placa de *Cladosporium herbarum* y *Colletotrichum gloeosporioides* como inoculo. Mediante un sacabocados se cortaron trozos circulares de 0,3 cm de diámetro que se sembraron en el centro de las placas del antibiograma. Las placas se mantuvieron en la oscuridad a 28°C durante 10 días, al cabo de los cuales se midió el crecimiento del hongo a partir del inoculo (ARRAS, G. 1988).

Tratamiento con inhibidores de la transcripción y traducción proteica.

Semillas del mismo lote fueron puestas bajo flujo de agua corriente durante dos horas, eliminados los integumentos, se dispusieron sobre algodón en las condiciones ya expuestas donde se mantuvieron 4 horas para permitir la activación de los sistemas enzimáticos que inician la germinación, después de lo cual se lavaron con agua y se secaron superficialmente. Se preparó una solución que contenía 0,5 mg/l de Cloramfenicol, y otra con 0,05 mg/l de Actinomicina D, en donde se sumergieron las semillas a razón de 1 ml por semilla (BEN-TAL et al., 1974). Se usaron 100 semillas por tratamiento, se

preparó un control con agua desionizada. Se evitaron cuidadosamente las condiciones de anaerobiosis utilizando recipientes de vidrio, muy amplios y poco profundos, agitando periódicamente. Después de seis horas de tratamiento, las semillas se lavaron 3 veces con agua desionizada y 50 de ellas se pusieron a germinar sobre algodón hidrófilo. Las otras 50 se enrollaron en forma de cilindro largo en una gasa tipo Cambric, se mojaron y se ubicaron en congelador a -24°C . Después de 15 días, las semillas que habían quedado en placas para germinar se recogieron y congelaron como las anteriores. El material congelado se utilizó para la determinación de ARN.

Electroforesis del ARN.

Se realizó en un aparato Sub - Gel GT (Bio - Rad). Para preparar los geles a utilizar con el aparato, se montó un soporte confeccionado con dos láminas de vidrio común de 7 x 12 cm, separadas por dos piezas del mismo vidrio de 1 x 7 x 0,3 cm. La lámina que representaba el frente del soporte tenía una hendidura a 1 cm de un extremo, que se convirtió en el borde superior. La ranura tenía 0,32 cm de ancho y 10 cm de largo y se utilizó para llenar la cámara e introducir cinco piezas de vidrio de 1 x 0,3 cm que funcionaron como dientes de peine para permitir que en el gel se formaran los espacios destinados a la siembra. La capacidad efectiva del gel quedó reducida a 10 x 5,5 x 0,3 cm. Dicho soporte quedó abierto por la parte superior e inferior, y para la formación del gel ambos extremos se sellaron con membrana de diálisis.

El soporte y todo lo que entró en contacto con el gel fue previamente lavado con agua jabonosa y puesto a secar en estufa a 110°C durante dos horas para inactivar posibles nucleasas presentes. Las partes del aparato Sub - Cell fueron también lavadas con solución jabonosa suave, tratadas durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% y enjuagadas con una solución al 0,1% de dietilpirocarbonato.

El procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos fue el utilizado por LOENING U.E. (1967), modificado por SAULS, J.W., (1972). Cuatro gramos de semillas congeladas fueron extraídas mediante una mezcla de fenol - cresol y precipitadas con 95% etanol frío. El precipitado se disolvió en tampón tris-fosfato pH 7,7 con 0,2% dodecil sulfato de sodio (SDS) y 6% de sacarosa. Se almacenó a -24°C hasta su utilización.

Los geles mixtos de 1,7 % poliacrilamida, 0,5 % agarosa y 5,2 % SDS se prepararon según Gould y Mattheus (GOULD et al., 1976) y se conservaron en heladera en buffer tris-fosfato pH 7.7. Para su utilización el soporte con el gel se introdujeron en el aparato de electroforesis quedando el gel sumergido en el tampón de corrida. Previo a su utilización se los sometió a un periodo de 30 minutos de preelectroforesis, a 50 V para eliminar impurezas. Subsecuentemente 50 microlitros de la solución de

ácido nucleico se sembró en la ranura del gel. La electroforesis se continuó durante 70 a 75 minutos. Un marcador de pironina B en sacarosa al 6% fue sembrado en una ranura del gel 15 minutos antes de las muestras.

Una vez terminada la corrida los geles fueron separados de sus soportes cortados en cuatro bandas en la dirección de la corrida, y cada una de las bandas cortada en trozos de 2 mm de ancho, los que fueron inmediatamente sumergidos en 1 ml de tampón tris -fosfato pH 7,7, contenido en tubos numerados, el gel se disolvió en el tampón con suave agitación. Cuando la banda fue cortada en su totalidad, se procedió a leer la absorbancia de cada tubo a 260 nm en un espectrofotómetro CamsPec (R.U.).

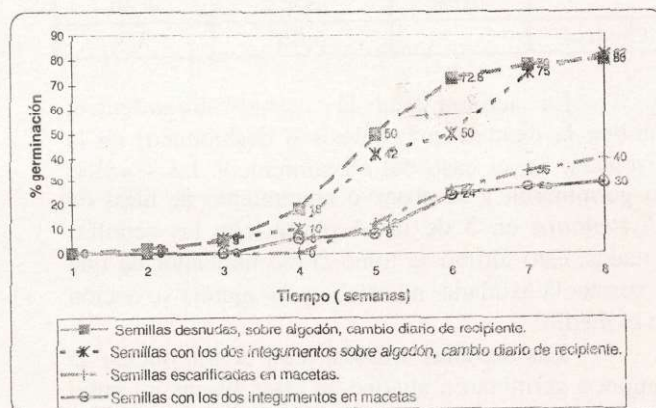
RESULTADOS

Las semillas puestas a germinar sobre medio de cultivo o sobre algodón, sin cambio de recipiente, cuya situación hace que la sustancia exudada se acumule en el medio, no germinaron. Este resultado ha sido consistente todos los años en los que se han sembrado semillas en estas condiciones (ARGÜELLES, T. et al. 1996).

Cuando el sustrato germinativo se cambió diariamente y por lo tanto la sustancia exudada se eliminó, el porcentaje de germinación fue del 82 % (Tabla 1), y en lo concerniente a la germinación no se detectaron diferencias en porcentaje entre las semillas con integumentos perforados y las semillas desnudas (82% y 80%).

En las macetas, el riego actuó como agua de lluvia y lavó la sustancia exudada del entorno de la semilla, el porcentaje de germinación fue del 30 al 40 %. El gráfico n° 1 muestra que las semillas en las macetas germinaron con un desfase de entre 3 y 4 semanas con respecto a las que estuvieron sobre el algodón que se cambiaba. Mientras que *in vitro* se observó que en la quinta semana el 50% de las semillas ya habían germinado, en las macetas durante ese tiempo solo germinó del 8 al 10% (gráfico 1).

Gráfico 1: Germinación de semillas de *Cedrella fissilis* Vell.
Germination of seeds of *Cedrella fissilis* Vell.



Las semillas sembradas sobre el medio de sales inorgánicas de Murashige y Skoog no germinaron, pero al cabo de 15 días, la alcalinidad del medio había aumentado a pH 8,0.

Tabla 1: Porcentaje de germinación de semillas de *Cedrella fissilis* en los distintos sustratos después de dos meses de sembradas.

Table 1: Germination percentage of seeds of *Cedrella fissilis* in diferent substrates after two months after being sowed.

Sustratos	Semillas con los dos integumentos		Semillas desnudas	
	% germinación	% mortalidad	% germinación	% mortalidad
Macetas	30	4	40	9
Algodón cambio diario	82	2	80	0
algodón sin cambio	0	0	0	0
medio sintético	0	0	0	0

En la Tabla nº 2 se puede observar que la dosis alta del exudado tuvo una efectividad similar a la que registra Benlate (4 mg/l), el área medida y las fotografías muestran que *Cladosporium* es mas susceptible a la sustancia exudada que *Colletotrichum*

Tabla 2: Promedio de la actividad antifúngica del exudado de semillas de *Cedrella fissilis* medida según el diámetro de la colonia desarrollada sobre el sustrato y comparada con la actividad de dos fungicidas comerciales.

Table 2: Antifungal activity of *Cedrella fissilis* exudate mean of the diameters of the colonies developed on substrates with the active substance.

Sustancia activa	Dosis	<i>C. gloeosporioides</i> (cm)	<i>C. herbarum</i> (cm)
Lonacol	8 mg/l	0	0
	20 mg/l	0	0
Benlate	4 mg/l	1,6	1,36
	10 mg/l	0	0,73
Exudado	0,5%	3,2	1,6
	1,0%	3,1	1,36
Control		5,06	3,3

La actinomicina D y el cloramfenicol inhiben la exudación (síntesis o desbloqueo) de la sustancia. En el caso del cloramfenicol, las semillas no germinaron y se observó crecimiento de hifas de *Phytophthora* en 3 de las 4 placas con las semillas tratadas, esto último se tomó como indicador de que la sustancia exudada no estaba y no ejercía su acción en el medio.

Las semillas tratadas con Actinomicina D tampoco germinaron aunque en estas placas no hubo crecimiento fúngico ni bacteriano. Inoculación

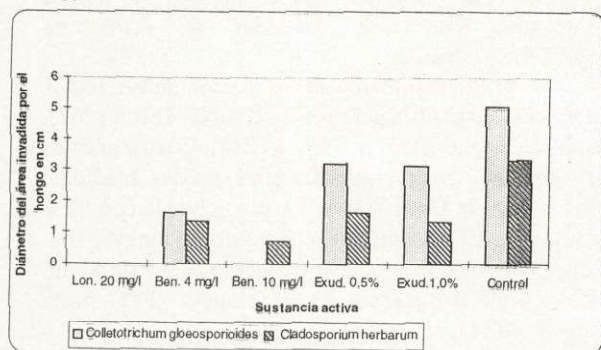
posterior con la misma cepa de *Phytophthora* que contaminaba las semillas tratadas con cloramfenicol, resultó en crecimiento positivo de hifas.

La separación electroforética del ARN de semillas imbibidas durante 8 horas y la que se efectuó en semillas después de 15 días de haberlas puesto en condiciones de germinar, muestran por los picos de absorbancia a 260 nm que las fracciones de ARN están bien representadas. La identificación de los picos se efectuó según Gould y Matthews (GOULD, H. et al., 1976). Una gran cantidad de ARN se observó en las semillas después de 8 horas de imbibición (Gráfico 3.A). Todas las especies de ARN parecen estar presentes al inicio de la germinación. Después de 15 días, las semillas muestran un patrón de ARN mejor definido en cuanto a la existencia de especies de ARN definidas por su absorbancia y separadas unas de otras en el gel mixto de poliacrilamida (Gráfico 3.B), con todas las fracciones de ARN presentes. Sin embargo las semillas no germinaron.

Las semillas tratadas con cloramfenicol (Gráfico 3.C) y con actinomicina D (Gráfico 3.D), presentan un patrón de ARN totalmente alterado con respecto al de las semillas no tratadas. La especie de ARN llamada 18s aparece como la más constante, la 28s, 32s y sobre la de 45s son las que más modificaciones presentaron, ésta última desaparece casi completamente en el tratamiento con cloramfenicol. Las tres fracciones mencionadas parecen además sufrir cambios que las convierten en más livianas, ya que todas presentaron corrimiento hacia la base del gel.

Gráfico 2.- Actividad antifúngica de las sustancias activas ensayadas

Figure 2. The antifungal activity expressed as the diameter of the substrate area invaded by the fungus.



DISCUSION

Los resultados de la germinación de las semillas sugieren que en todos los casos en que semillas de *Cedrella fissilis* fueron puestas a germinar, exudaban una sustancia al medio sólido sobre el que se encontraban. Esa sustancia es la responsable de inhibir la germinación de las propias semillas y también inhibe el crecimiento de los

hongos ensayados en este trabajo así como de los mencionados en ARGÜELLES et al. 1996.

Por los resultados del antibiograma se aprecia cuán potente puede ser la sustancia, ya que se utilizó en pequeña concentración y aparece tan efectiva para los hongos ensayados como el Benlate (Benomil). Lonacol con el 25% de cobre y 49% de propinep (propileno-bisditiocarbamato de Zn) es más efectivo. Que el exudado sea más efectivo para controlar *Cladosporium* que *Colletotrichum* es comprensible ya que el segundo es cosmopolita y por lo tanto sus mecanismos de supervivencia y adaptación deben ser mucho más eficaces.

Los ensayos con antibióticos y la separación electroforética del ARN sugieren que la sustancia exudada se sintetiza *de novo* al comienzo de la germinación, ya que cuando el patrón de ARN se distorsiona y algunas especies de ARN no se evidencian, la semilla no exuda la sustancia como se comprueba por el crecimiento de hifas sobre el sustrato de germinación.

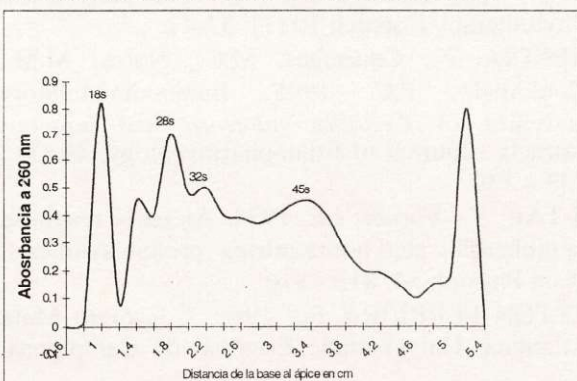
El patrón de electroforesis de ARN de las semillas tratadas con cloramfenicol se alteró de forma tal durante el tratamiento, que no se pudo dilucidar si la síntesis de la sustancia exudada se efectúa bajo la dirección de ARN ya presente en la semilla antes de germinar y por lo tanto heredado de la planta madre o este ARN se copia en el momento de la imbibición. La bibliografía consultada indica que el ARN presente en las semillas después de un periodo de imbibición como el de esta experiencia es el resultado de una síntesis *de novo* (KOEHLER, D., et al. 1973; WALBOT W.M., 1975). Se debe considerar también el hecho posible que la sustancia exudada no sea una sustancia pura, sino una mezcla de varias, como antioxidantes, alcaloides y aminos cuaternarios.

Gráfico 3.- Electroforesis de fracciones de ARN polimérico de semillas de *Cedrella fissilis* Vell., separadas en gel de 1,7% poliacrilamida, 0,5% agarosa y escaneadas a 260 nm

Figure 3: Electrophoresis of RNA fractions of seed of *Cedrella fissilis* in gels of 1,7% polyacrylamide, 0,5% agarose, scanned at 260nm

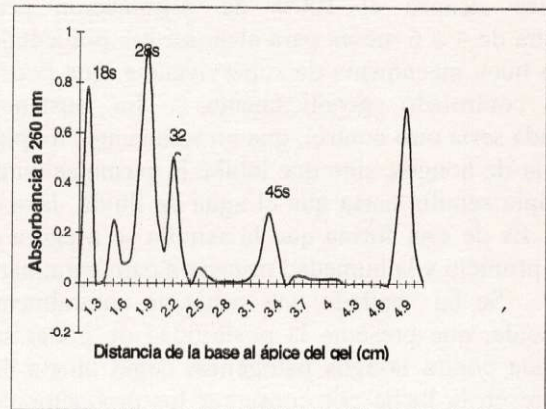
3.A Semillas sin tratamiento con 8 horas de imbibición

3A. Non treated seeds, 8 hours imbibition



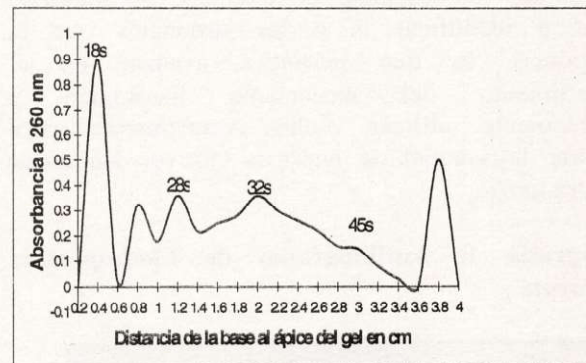
3.B: Semillas sin tratamiento 15 días después de ser puestas en condiciones de germinar

3B: Non treated seeds 15 days after given conditions to germinate



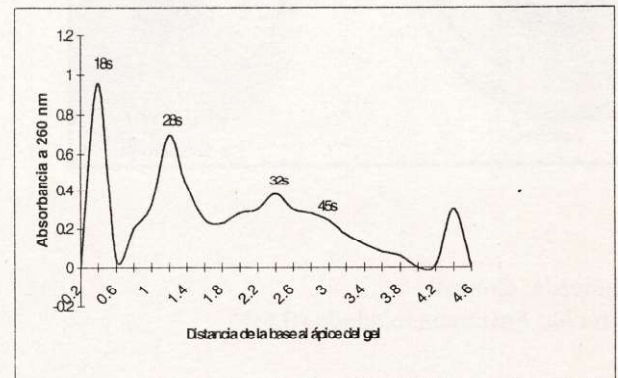
3C: Semillas, 15 días después del tratamiento con 0,5mg/l de Cloramfenicol

3C: Seed, 15 days after treatment with 0,5mg/l chloramphenicol



3D: Semillas, 15 días después del tratamiento con 0,05mg/l de Actinomicina D

3D: Seeds, 15 days after treatment with 0,05 mg/l actinomycin D

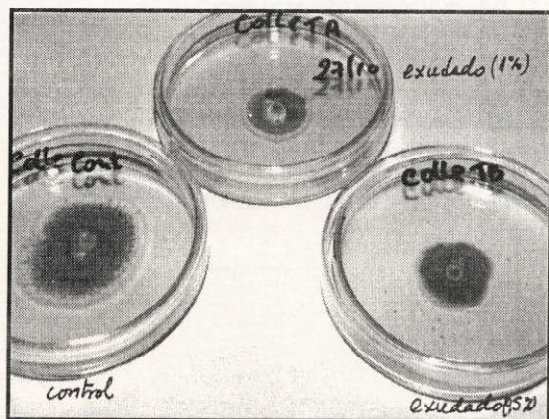


CONCLUSIONES

Las especies no domesticadas de la Selva Paranaense tienden a presentar un amplio intervalo de tiempo durante el cual germinan, mucho más amplio que el de las especies cultivadas. Se observa frecuentemente en el laboratorio, que un lote de semillas alcanza el 100% de germinación pero necesita de 4 a 6 meses para alcanzar ese porcentaje. Es un buen mecanismo de supervivencia, que podría estar controlado genéticamente. La sustancia exudada sería otro control, que no solamente "limpia" el lugar de hongos, sino que inhibe la germinación de la propia semilla hasta que el agua de lluvia lava el lugar. Es de esta forma que la semilla se asegura el lugar propicio y la humedad necesaria para germinar.

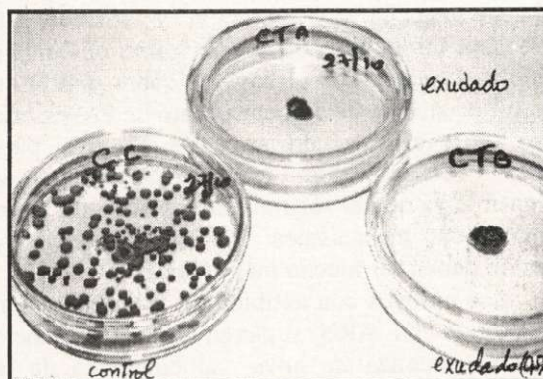
Se ha hallado una sustancia naturalmente producida, que presenta la posibilidad de poder ser utilizada contra hongos patógenos, como aliada del hombre en la lucha por conservar los productos del campo. Dicha sustancia es seguramente mucho menos dañina de usar que los fungicidas actuales a base de metales pesados. Por su efectividad y los aparentemente pocos daños que causa, ya que después de un tiempo de exposición al clima parece degradarse, es por lo que se continuará con su estudio de efectividad a campo, comparando su poder antifúngico con sustancias comerciales. Se tratará de aislar e identificar la o las sustancias que la componen, lo que permitirá avanzar en el conocimiento del mecanismo fisiológico y posiblemente utilizar dicho conocimiento para mejorar la sanidad de nuestros cultivos sin dañar nuestra tierra.

Fotografía 1. Antibiograma de *Cladosporium herbarum*



Izquierda: Control
Derecha: Sustancia exudada (0,5%)

Fotografía 2. Antibiograma de *Colletotrichum gloeosporioides*



Izquierda: Control
Derecha: Sustancia exudada (1%)

BIBLIOGRAFIA

- AGOSTINI, J.P.; Timmer, L.W.; Mitchell, D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Phytopathology* 82: 1377 – 1382.
- AGOSTINI, J.P.; Timmer L.W. 1992. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Plant Dis.* 76: 1176– 1178.
- ARGÜELLES, T.; Lorenzo, E.; Fernández, G. 1996. Potencial citostático (antibiótico) de un exudado de semillas en germinación de *Cedrella fissilis* Will. X Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales. 21 -23 noviembre. La Plata. Argentina. pg 16.
- ARRAS, G. 1988. Antimicrobial activity of various essential oils against some Citrus fruit disease agents. *Proc. of the Sixth Inter. Citrus Congress.* march 6 - 11. Tel Aviv. Israel. pg. 342-348
- BENENCIA, F., Courreges, M.C., Coulombie, F.C. 1996. In vitro activities of *Cedrella tubiflora* leaf aqueous extracts on murine macrophages, polymorphonuclear leukocytes and complement. *Phytotherapy research* 10 (1): 37-41.
- BENENCIA, F., Courreges, M.C., Nores, M.M., Coulombie, F.C. 1995. Immunomodulatory activities of *Cedrella tubiflora* leaf aqueous extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 49 (3) : 133 – 139.
- BEN-TAL, Y., Varner, J.E. 1974. An early response to gibberellic acid not requiring protein synthesis. *Plant Physiol.* 54: 813 - 816.
- CLAYTON FERREIRA Ed. 1992. Consorcio Mata Atlántica. Universidade Estadual de Campinas.

- Reserva da Biósfera da Mata Atlántica. Vol 1, 101 p.
- GOULD, H., Matthews, H.R. 1976. Separation methods for nucleic acids and oligonucleotides, Work & Work Eds. American Elsevier.
- HIRAYAE, K., Hirata, A., Akutsu, K. 1996. In vitro growth inhibition of plant pathogenic fungi, *Botrytis* spp., by *Escherichia coli* transformed with a chitinolytic enzyme gene from a marine bacterium. *Ann. Ohytopathol. Soc. Jpn.* 62: 30 - 36.
- KOEHLER, D., Vagner, J.E. 1973. Hormonal control of orthophosphate incorporation into phospholipids of barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 52: 208 - 214.
- LOENING, U.E. 1967. The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. J.* 102: 251 - 257.
- MACKINNON, S., Durst, T., Arnason, J.T., Angerhofer, C., 1997. *Jour. Of Natural Products.* 60 (4) : 336 - 341°
- MURASHIGE, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 - 497.
- SAULS, J.W. 1972. Studies of seed dormancy of *Prunus persica*. Doctoral dissertation. Univ. of Fla. Gainesville.
- WALBOT, V.M., Clutter, M., Sussex, I. 1975. Effects of abscisic acid on RNA metabolism in germinating seed. *Plant Physiol.* 56: 570 - 574