

Isolement de linoléate de méthyle, un nouveau composé fongitoxique des feuilles d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) infectées par *Puccinia arachidis* Speg.

P. V. SUBBA RAO (1), J. P. GEIGER (1), J. EINHORN (2), C. MALOSSE (2), B. RIO (1), M. NICOLE (1), S. SAVARY (1) et A. RAVISE (3)

Résumé. — Le linoléate de méthyle a été isolé de feuilles d'arachide infectées naturellement par *Puccinia arachidis*. Ce produit est un composé fongitoxique nouvellement identifié chez l'arachide. Sa purification, sa caractérisation et son activité fongitoxique sont décrites et son rôle dans les réactions de défense de l'hôte contre la rouille est discuté.

INTRODUCTION

La rouille d'arachide, causée par *Puccinia arachidis* Speg. est une maladie foliaire majeure sévissant dans beaucoup de régions arachidières du monde [Subrahmanyam, McDonald, 1983]. On sait [Keen, 1975 ; Keen and Ingham, 1976 ; Ingham, 1976] que l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) produit des phytoalexines de type stilbène dont trois ont été isolées de graines colonisées par leur microflore. Récemment, la medicarpine, une autre phytoalexine, a été mise en évidence dans les folioles d'arachide infectées spontanément par *Cercospora arachidicola* ou par *Phoma arachidis* [Strange et al., 1985].

Dans le cadre d'un programme de recherche sur les interactions hôte-parasite entre *A. hypogaea* et *P. arachidis*, la capacité de l'arachide à produire des phytoalexines a été reconsidérée. Dans cette note sont décrits l'isolement, la purification, la caractérisation et l'activité fongitoxique *in vitro* du linoléate de méthyle, produit en réponse à l'infection. Des phytoalexines appartenant à la même famille chimique ont déjà été mises en évidence chez le riz infecté par *Pyricularia oryzae* [Kato et al., 1983, 1986], chez des variétés de tomate résistantes à *Phytophthora* sp., et à *Verticillium albo-atrum* [Vernenghi et al., 1985], de même que chez de jeunes palmiers à huile infectés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* [Vernenghi et al., 1987]. Cette note rapporte pour la première fois la mise en évidence d'un ester méthylique d'acide gras insaturé en tant que composé fongitoxique chez l'arachide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

400 g de feuilles d'arachide d'une variété locale de type Spanish, soit saines, soit infectées par *P. arachidis* ont été récoltées dans une culture âgée de deux mois environ et située dans les parcelles paysannes entourant le Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, à 20 km à l'ouest d'Abidjan en Côte d'Ivoire.

Extraction.

Des extraits de feuilles saines et infectées ont été préparés par broyage dans du méthanol (MeOH) : H₂O (50 : 50 v/v ; 7,5 ml/g tissu frais) avec un broyeur Sorvall (Omni-Mixer-230, U.S.A.). Les extraits méthanoliques ont été mis à macérer à la température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures puis filtrés sur verre fritté n° 1. Les filtrats ont été réduits au quart de leur volume par évaporation à 40 °C (Évaporateur-Büchi, Suisse), centrifugés (10 min. à 12 000 t/min. ; centrifugeuse - Sorvall RC 2-B, U.S.A.), puis extraits trois fois en n-hexane (phase Hx). La phase aqueuse a été ensuite extraite trois fois à l'acétate d'éthyle (phase EtOAc). Le linoléate de méthyle a été détecté après séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice (60 F₂₅₄, 0,25 mm d'épaisseur) dans le système hexane : acétate d'éthyle : méthanol (Hx : Ae : MeOH) dans les proportions 50 : 50 : 05 (v/v), ou le

(1) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, B.P. V-51, Abidjan (Côte d'Ivoire).
(2) Laboratoire INRA-CNRS des Médiateurs Chimiques, domaine de Brouessy, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse (France).
(3) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, 72, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

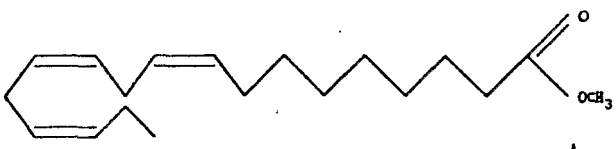


FIG. 1. — Linoléate de méthyle (*Methyl linolenate*).

26 AVR. 1990
ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 27.991 ex 1
Cote : D

système chloroforme : méthanol (Clf : MeOH) dans les proportions 50 : 02 (v/v). La révélation a été réalisée par chauffage de la plaque sur laquelle on a préalablement pulvérisé une solution de $SbCl_3$ dans du chloroforme (120 °C, 10 min.). A chaque étape de la purification, l'activité fongitoxique a été contrôlée par le « test *Cladosporium* » (voir ci-dessous).

Purification et caractérisation.

La phase EtOAc a été concentrée à 5 ml environ dont 2 ml ont été déposés sur une colonne de silice [60 × 1,5 cm ; élution par le système Hx : EtOAc : MeOH 50 : 50 : 05 (v/v)] travaillant sous pression atmosphérique. La fraction contenant l'activité fongitoxique a été ensuite purifiée par CLHP sur une colonne de silice [5 μ ; 30 × 0,63 cm, élution : Hx : EtOAc (65 : 35 ; v/v), débit : 2 ml/min.]. La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur en UV et d'un réfractomètre. La purification a été achevée par une seconde chromatographie en CLHP sur une colonne de silice greffée en C_{18} [5 μ ; 30 × 0,63 cm, élution : en gradient de méthanol (MeOH : H₂O : CH₃COOH-50 : 50 : 01 à 99 : 0 : 01 (v/v) établi en 20 min. ; débit : 1 ml/min.]. La fraction ainsi purifiée a été soumise à une chromatographie en phase gazeuse [(CG, Carlo Erba Fractovap 2 900) ; WC OT colonne capillaire, 25 m × 0,22 mm ID ; HP 5 (Hewlett-Packard), à température variant entre 180 °C à 250 °C à raison de 2 °C/min.] ou une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) (Nermag RIO-10C piloté par ordinateur) (Conditions de CG : colonne capillaire, 25 m × 0,32 mm ID CP Wax 57 CB WC OT ; température variant de 140 °C à 250 °C à raison de 10 °C/min.).

TESTS *IN VITRO* DE L'ACTIVITÉ FONGITOXIQUE

1. Test au *Cladosporium*.

Ce test est réalisé sur les plaques de silice après séparation par CCM. Les plaques sont pulvérisées avec une suspension de spores de *Cladosporium cladosporoides*, puis avec une solution de PDA (Potato dextrose agar en solution) à 40 °C. Après incubation 48 heures à 28 °C, l'emplacement des composés fongitoxiques est matérialisé sous la forme de taches blanches sur fond vert sombre (dû à l'intense sporulation du champignon alors qu'au niveau des composés toxiques le champignon ne s'est pas développé laissant apparaître la silice blanche).

2. Inhibition de la germination des spores de *P. arachidis*.

La fongitoxicité du linoléate de méthyle commercial (Sigma, U.S.A.) a été évaluée, *in vitro*, en mesurant le pourcentage d'inhibition de la germination de spores causé par la présence du produit en solution éthanolique. Le test est réalisé en utilisant des lames à concavité. La suspension de spores contenant une quantité déterminée du composé à tester, est incubée 3 heures à l'obscurité, à 25 °C, les lames étant placées dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre humidifié. Le taux de germination est comparé à celui de suspensions de spores ne contenant que la quantité d'éthanol équivalente à celle présente dans l'essai. Une solution de saccharose à 2 p. 100 a été utilisée comme milieu de germination. Des concentrations de linoléate de méthyle variant entre 25 et 300 μg/ml ont ainsi été testées.

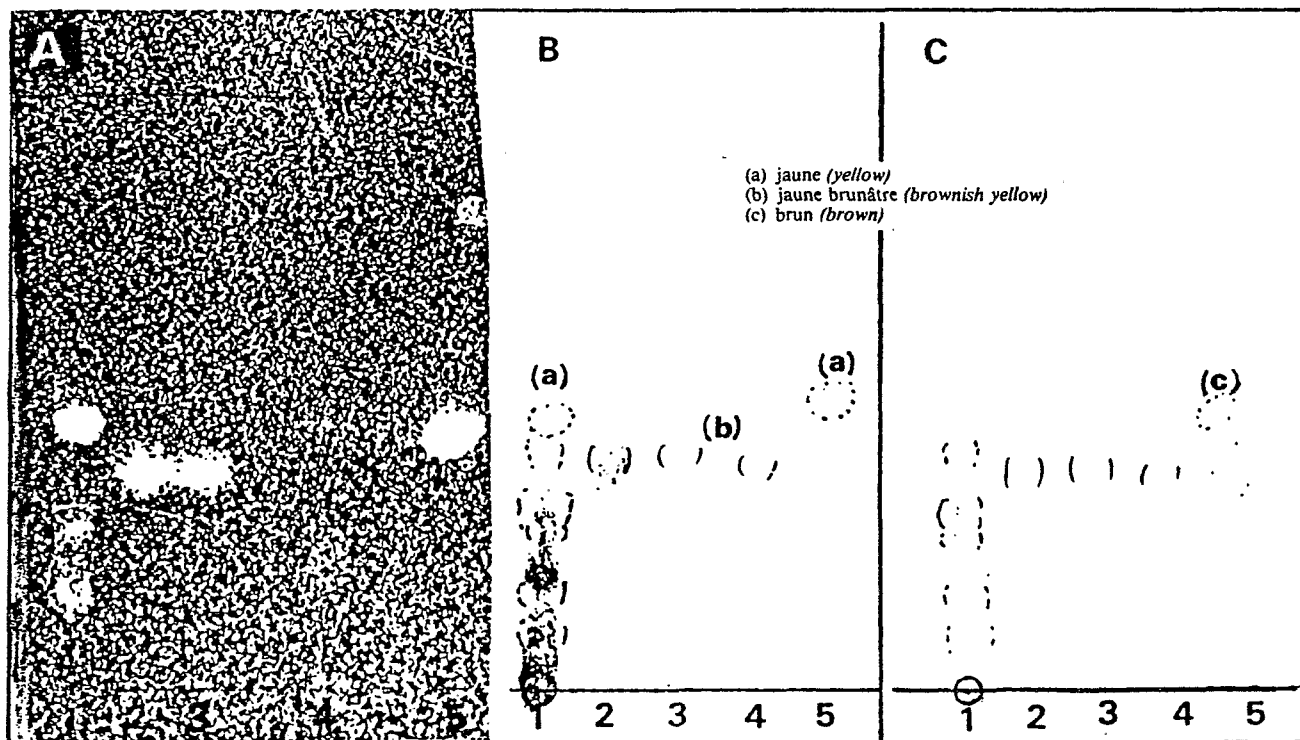


FIG. 2. — Activité fongitoxique et la révélation par les tests de coloration en CCM de différentes fractions (1 à 5) des composés fongitoxiques, à l'étape finale de la purification. La fraction numérotée 5 a été ultérieurement identifiée comme le linoléate de méthyle. La séparation des fractions a été réalisée sur une colonne de silice greffée en C_{18} en CLHP [30 × 0,63 cm ; élution par un gradient de méthanol c'est-à-dire MeOH : H₂O : CH₃COOH-50 : 50 : 01 (v/v) à 99 : 0 : 01 (v/v) en 20 min. ; détection UV à 280 nm ; débit : 1 ml/min.]. Les plaques en CCM sont développées dans le système chloroforme : méthanol (50 : 02 ; v/v) et utilisées pour le test au *Cladosporium cladosporoides* [A], paranitroaniline diazotée [B] et le chlorure d'antimoine [C].

(The antifungal activity and colouring reactions on TLC plates of different fractions (1-5) of the antifungal extract at the final step of its purification process. Fraction 5 was later identified as methyl linolenate. These fractions were separated on a HPLC column [Silica- C_{18} ; 30 × 0,63 cm ; eluted by MeOH : H₂O : CH₃COOH-50 : 50 : 01 (v/v) to 99 : 0 : 01 (v/v) in 20 min. ; UV detection : 280 nm ; flow rate : 1 ml/min.]. These chromatograms were developed in chloroform : methanol (50 : 02 ; v/v) and were used to test with *Cladosporium cladosporoides* [A], diazotized paranitroaniline [B] and antimony chloride [C].

Environ 600 spores ont été observées pour chaque suspension à chaque concentration, sauf à la concentration 25 µg/ml, pour laquelle seulement 300 spores ont été observées (Tabl. I).

TABLEAU I. — Inhibition *in vitro* de la germination des urédospores de *P. arachidis* en fonction des concentrations croissantes de linoléate de méthyle. (In vitro inhibition of urediniospore germination of *P. arachidis* by methyl linolenate at increasing concentration)

Concentration de linoléate de méthyle (of methyl linolenate) (g/ml)	Inhibition de la germination des urédospores (of urediniospore germination) (%)
25	32
50	64
100	78
200	85
300	91

RÉSULTATS

Le linoléate de méthyle n'a été détecté que dans les extraits de feuilles infectées. A chaque étape du processus de purification, la pureté des fractions a été contrôlée par CCM sur plaque de silice en utilisant deux systèmes d'élu-tion et le test « *Cladosporium* » jusqu'à l'étape finale indiquée dans la figure 2. Le composé numéroté 5 a été isolé avec un degré de pureté satisfaisant. Ses caractéristiques en CCM sont : $R_f = 0,90$ dans le système Hx : Ae : MeOH (50 : 50 : 05 ; v/v) et $R_f = 0,44$ dans le système Clf : MeOH (50 : 02 ; v/v), une coloration brune avec le réactif au $SbCl_3$ et jaune avec le réactif au paranitroaniline. Son temps de rétention en CLPH sur une colonne de silice greffée en C_{18} ($30 \times 0,63$ cm) est 15,2 min.

Ce produit ne présente pas de fluorescence sous éclair-ement UV à 254 nm et 350 nm. Le spectre UV dans le méthanol indique un pic d'absorption à 230 nm et à 286 nm tandis que le spectre différentiel en solution alcaline ne révèle qu'un seul pic d'absorption à 285 nm.

Le linoléate de méthyle a été d'abord identifié au spec-tromètre de masse par le mode d'impact d'électrons : M^+ 292 ; m/z 261, 236, 108, 93, 79, 74, 67, 59, 55.

Le poids moléculaire et la position du système homocon-jugué insaturé ont été confirmés en utilisant les conditions CI-NO [Brauner *et al.* 1982] : ions diagnostiques sont à m/z 322 ou $(M + NO)^+$, 236, 108. Le temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse est identique à celui du produit de synthèse (Sigma, U.S.A.).

Les tests d'inhibition de la germination de spores de *P. arachidis* par le produit de synthèse indiquent que sa capa-cité d'inhibition varie entre 32 p. 100 pour une concentra-tion de 25 µl/ml et plus de 90 p. 100 pour 300 µg/ml, ce qui suggère une forte activité fongitoxique du linoléate de méthyle.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les dérivés d'acides gras hydroxylés insaturés tels que les alcools diéniques ou leurs époxydes mono éthyléniques iso-lées à partir de plantes de Tomate infectée par *Phytoph-thora parasitica* Dast, sont d'efficaces inhibiteurs de la croissance fongique *in vitro* [Vernenghi *et al.*, 1985]. Les 9-hydroxy et 13-hydroxy octadecadiène-oates de méthyle s'accumulent différemment dans les tissus de jeunes palmiers à huile infectés par *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* en fonction de l'origine génétique des plantes testées [Ver-nenghi *et al.*, 1987], et leur accumulation peut être modu-lée par l'application d'éliciteurs fongiques ou synthétiques variés [Subba Rao, 1985]. Dans le cas de l'arachide, la toxicité *in vitro* du linoléate de méthyle à l'égard de *P. arachidis*, et son accumulation en réponse à l'infection par l'agent pathogène de la rouille suggèrent que ce composé peut être classé dans le groupe de phytoalexines et qu'il pourrait de ce fait avoir un rôle important dans la résis-tance de l'hôte à la rouille. Le linoléate de méthyle fait partie d'un groupe d'au moins six produits fongitoxiques détectés dans des extraits de feuilles d'arachide infectées [Subba Rao *et al.*, non publié]. On sait que dans l'interac-tion entre le palmier à huile - *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*, il y a de considérables effets de synergie, en termes d'acti-vité fongitoxique, entre les alcools diéniques et les phytoalexines de type phénolique [Vernenghi *et al.*, 1987]. De ce fait, des expériences devraient être entreprises pour véri-fier, puis exploiter ce phénomène dans les interactions *A. hypogaea* - *P. arachidis*. Il serait également d'un intérêt majeur de montrer expérimentalement que la production de ce composé est fonction du niveau de résistance des génotypes, afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans sa synthèse.

RÉFÉRENCES

- [1] AGUAMAH G. E., LANGACAKE P., LEWORTHY D. P., PRYCE J. A. and STRANGE R. N. (1981). — Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, 20, p. 1381-1383.
- [2] BRAUNER A., BUDZIKIEWICZ H. and BOLAND W. (1982). — Studies in chemical ionisation mass spectrometry. V - Localization of homoconjugated triene and tetraene units in aliphatic compounds. *Org. Mass Spectrom.*, 17, p. 161-164.
- [3] INGHAM J. L. (1976). — 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, 15, p. 1791-1793.
- [4] KATO T., YAMAGUCHI Y., UYEHARA T. *et al.* (1983). — Self defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Tetra-hedron Letters* 24 (43), p. 4715-4718.
- [5] KATO T., YAMAGUCHI Y., OHNUMA S. *et al.* (1986). — Structural elucidation of 11-hydroxy-12,13-epoxyoctadeca-(9Z,15Z) dienic acids from rice plants suffering from rice blast disease. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 743-744.

- [6] KEEN N. T. (1975). — The isolation of Phytoalexins from Germinating Seeds of *Cicer arietinum*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogaea*, and Other Plants. *Phytopathology*, 65, p. 91-92.
- [7] KEEN N. T. and INGHAM J. L. (1976). — New stilbene phytoalexins from American cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, 15, p. 1794-1795.
- [8] STRANGE R. N., INGHAM J. L., COLE D. L., CAVILL M. E., EDWARDS C., COOKSEY C. J. and GARATT P. J. (1985). — Isolation of the Phytoalexin Medicarpin from leaflets of *Arachis hypogaea* and related species of the tribe Aeschynomeneae. *Z. Naturforsch.*, 40c, p. 313-316.
- [9] SUBBA RAO P. V. (1985). — Etude comparative chez le Palmier à huile de l'aptitude de lignées issues de graines et de clones provenant de multiplication végétative à élaborer des facteurs de résistance à la fusariose. *Mémoire de D.E.A. de Phytopathologie*, Univ. Paris-Sud, Centre d'Orsay, France, 10 pp.
- [10] SUBRAHMANYAM P. and McDONALD D. (1983). — Rust Disease of Groundnut. *Information Bulletin* No. 13. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru P.O., Andhra Pradesh 502 324 (India).
- [11] VERNENGI A., EINHORN J., KUNESCH G., MALOSSE C., RAMIANDRASOA F. et RAVISE A. (1985). — Propriétés inhibitrices *in vitro* de dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés élaborés chez le *Lycopersicon esculantum* Mill. en réaction à l'infection par le *Phytophthora parasitica* Dast. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 301, Série III, n° 65, 743-748.
- [12] VERNENGI A., TAQUET B., RENARD J. L. et RAVISE A. (1987). — Détection chez le palmier à huile de dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques toxiques pour le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*; variation de leur accumulation selon les croisements et les modalités de traitements. *Oléagineux*, 42 N° 1, p. 1-10.

SUMMARY

Isolation of methyl linolenate, a new antifungal compound from *Arachis hypogaea* L. leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg.

P. V. SUBBA RAO, J. P. GEIGER, J. EINHORN, C. MALOSSE, B. RIO, M. NICOLE, S. SAVARY and A. RAVISE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 4, p. 173-177.

Methyl linolenate has been isolated as a new antifungal compound from *Arachis hypogaea* L. leaves naturally infected with *Puccinia arachidis* Speg. Purification, characterization and antifungal activity of this compound are described and its role in host defense mechanisms against rust infection is discussed.

RESUMEN

Aislamiento de linolenato de metilo, un nuevo compuesto fungitóxico de las hojas de maní (*Arachis hypogaea* L.) infectadas por *Puccinia arachidis* Speg.

P. V. SUBBA RAO, J. P. GEIGER, J. EINHORN, C. MALOSSE, B. RIO, M. NICOLE, S. SAVARY y A. RAVISE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 4, p. 173-177.

A partir de hojas de maní infectadas naturalmente por *Puccinia arachidis*, se logró aislar linolenato de metilo, un compuesto fungitóxico que acaba de identificarse en el maní. El artículo describe su purificación, su caracterización y su actividad fungitóxico, como también su papel en las reacciones de defensa del hospedero contra la roya.

Isolation of methyl linolenate, a new antifungal compound from *Arachis hypogaea* L. leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg.

P. V. SUBBA RAO (1), J. P. GEIGER (1), J. EINHORN (2), C. MALOSSE (2), B. RIO (1), M. NICOLE (1), S. SAVARY (1) and A. RAVISE (3).

INTRODUCTION

Groundnut rust, caused by *Puccinia arachidis* Speg. is a major foliar disease in many important groundnut producing regions in the world [Subrahmanyam and McDonald, 1983]. *Arachis hypogaea* L. is known to accumulate phytoalexins against natural microflora [Keen, 1975; Keen and Ingham, 1976; Ingham, 1976]. Agumamah *et al.* [1981] isolated three stilbene phytoalexins from microflora proliferated groundnut seeds. Recently, medicarpin, another phytoalexin, was isolated from groundnut leaflets naturally infected by either *Cercospora arachidicola* or *Phoma arachidis* [Strange *et al.*, 1985].

As a part of a study of the plant-pathogen interactions between rust disease and groundnut, the phytoalexin producing capacity of the groundnut plant was reinvestigated. In this paper, the isolation, purification, characterization and *in vitro* toxicity of the rust induced antifungal compound, methyl linolenate, are described. Phytoalexins belonging to the same group of compounds have

already been isolated from rice plants infected by blast disease [Kato *et al.*, 1983 and 1986], tomato plants resistant to *Phytophthora* sp., and to *Verticillium albo-atrum* [Vernenghi *et al.*, 1985] and from young oil palms infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* [Vernenghi *et al.*, 1987]. This is the first reported isolation of an unsaturated fatty acid methyl ester as an antifungal compound from the groundnut plant.

MATERIAL AND METHODS

Groundnut leaves of a local Spanish variety (400 g), both healthy and naturally infected with *P. arachidis*, were collected from a two month-old crop from farmers' fields surrounding the ORSTOM Research Station, Adiopodoumé, 20 Kms West of Abidjan (Côte d'Ivoire).

Extraction.

Leaf extracts were obtained by grinding healthy or rust-infected leaves in methanol : water (50 : 50 v/v ; 7.5 ml/g fresh tissue) using a Sorvall grinder (Omni-Mixer 230, U.S.A.). The methanol (MeOH) extracts were left to soak in the dark at room-temperature for approximately 48 h then filtered through a No. 1 glass filter. Filtered extracts were concentrated to 1/4 of their

(1) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, B.P. V-51, Abidjan (Côte d'Ivoire).

(2) Laboratoire INRA-CNRS des Médiateurs Chimiques, domaine de Brouessy, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse (France).

(3) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, 72, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

volume using a rotative evaporator (Büchi, Switzerland) at 40 °C. The concentrated extracts were centrifuged (10 min. at 12,000 rpm.) using a Sorvall RC 2-B centrifuge (U.S.A.) and were extracted three times with n-hexane (Hx. Phase). The aqueous phase was further extracted three times with ethyl acetate (EtOAc. Phase). Methyl linolenate was detected by thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm thick silica gel 60 F₂₅₄ plates, using hexane : ethyl acetate : methanol (50 : 50 : 05 ; v/v) or chloroform : methanol (Clf : MeOH) 50 : 02 (v/v) as eluants. Presence of this compound was revealed by spraying TLC plates with a saturated solution of SbCl₃ in chloroform and heating at 120 °C during 10 minutes. At each step of the purification, antifungal activity was tested for using the *Cladosporium* test (see below).

Purification and characterization.

EtOAc phase was concentrated to approximately 5 ml and about 2 ml of this was chromatographed on an atmospheric column [Silice - 60 × 1.5 cm ; elution : Hx : EtOAc : MeOH (50 : 50 : 05 ; v/v)]. The fraction containing antifungal compound was later chromatographed on a HPLC column [Silica-5 μ ; 30 × 0.63 cm, elution : Hx : EtOAc (65 : 35 ; v/v), flow rate : 2 ml/min.] with ultra-violet and refractometric detectors. Further purification was achieved by a second chromatography on another HPLC column (Silica C₁₈, 5 μ ; 30 × 0.63 cm ; elution : MeOH : H₂O : CH₃ COOH from 50 : 50 : 01 to 99 : 0 : 01 (v/v) in 20 min. ; flow rate : 1 ml/min.).

The fraction thus purified was subjected to either gas chromatography (GC) [Carlo Erba Fractovap 2 900 ; WC OT capillary column, 0.25 m × 0.22 mm ID, HP 5 (Hewlett-Packard), temperature ranging from 180 °C to 250 °C at 2 °C/min.] or to gas chromatography - mass spectrometry (GC - MS) (Nermag RIO-10 C equipment under computer control), (GC conditions : 25 m × 0.32 mm ID CP Wax 57 CB WC OT capillary column, 140 °C to 250 °C at 10 °C/min.).

IN VITRO TESTS FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY

1. *Cladosporium* Test.

After development in both the eluting systems, TLC plates were sprayed with a suspension of *Cladosporium cladosporioides* spores followed by a potato dextrose agar (PDA) solution at 40 °C. After incubation at 28 °C for 48 h, fungal growth was inhibited at the R_f of methyl linolenate.

2. Inhibition of rust urediniospore germination.

A test for the *in vitro* antifungal activity of the commercially available methyl linolenate (Sigma grade, Sigma Chemical Company, U.S.A.) was conducted by measuring the percentages of inhibition of rust urediniospore germination (as compared to the control treatments) in cavity slides incubated in the dark, at 25 °C for 3 hrs., in Petri dishes containing damp filter paper. A 2 % saccharose solution was used as the germinating medium. Concentrations ranging from 25 μg/ml to 300 μg/ml were tested. The methyl linolenate used in the treatments was diluted to specified concentrations with ethanol ; control treatments received corresponding amounts of ethanol only. Totals of about 600 spores were counted for each concentration except 25 μg/ml, where only 300 spores were observed (Tabl. I).

RESULTS

This antifungal compound was apparently not detected in the extracts from healthy plants even at concentrations 4 times higher than those from infected plants. At each step, during the purification process, the purity of the fractions was monitored on TLC plates by using different eluting systems and the *Cladosporium* test until the final stage illustrated in Figure 2. Compound No. 5 was isolated with a satisfactory degree of purity. TLC data obtained were as follows : R_f 0.90 in Hx : EtOH : MeOH (50 : 50 : 05 ; v/v) and R_f 0.44 in Clf : MeOH (50 : 02 ; v/v), brown coloration with SbCl₃ and yellow with paranitroaniline reagent. HPLC retention time on a silica C₁₈ grafted column (30 × 0.63 cm) was 15.2 min. (MeOH : H₂O : CH₃ COOH from 50 : 50 : 01 to 99 : 0 : 01 ; v/v ; in 20 min ; flow rate : 1 ml/min.).

The compound exhibited no fluorescence under UV at either 254 or 350 nm. UV spectra in MeOH showed an absorption peak at 239 nm and at 286 nm, while the differential spectrum in the alkaline solution revealed only one peak at 285 nm.

Methyl linolenate was first identified using electron impact ionization as follows : M⁺ 292 ; m/z 261, 236, 108, 93, 79, 74, 67, 59, 55.

The molecular weight and the location of the unsaturated homoconjugated system were confirmed using Cl-NO conditions [Brauner *et al.*, 1982] : diagnostic ions at m/z 322, or (M + NO)⁺, 236, 108. The retention time was studied by GC and was shown to be identical to that of the synthetic compound.

Tests on the *in vitro* inhibition of urediniospore germination of *P. arachidis* by the reference compound showed that its inhibitory capability varies from 32 p. 100 at 25 μg/ml to over 90 p. 100 at 300 μg/ml concentration (Table I). These results demonstrate the antifungal activity of methyl linolenate.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Unsaturated hydroxy fatty acid derivatives such as dienic alcohols or monoethylenic epoxides isolated from tomato plants infected with *Phytophthora parasitica* Dast. are efficient inhibitors of fungal growth *in vitro* [Vernenghi *et al.*, 1985]. Hydroxy-9 and hydroxy-13 methyl octadecadien-oates differentially accumulated in young oil palm tissues infected with *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* depending on the genetic origins of the plants tested [Vernenghi *et al.*, 1987] and their accumulation could be modulated by the application of different fungal or synthetic elicitors [Subba Rao, 1985]. In the case of groundnut, the *in vitro* toxicity of methyl linolenate to *P. arachidis* and its accumulation in response to rust infection suggest that this compound could be classified in the group « phytoalexins » and it might have a significant role in host resistance to rust disease. In fact, methyl linolenate is one of at least 6 antifungal compounds detected in rust-infected groundnut plant extracts (Subba Rao *et al. unpublished*). It has been shown in oil palm - *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* interactions that there is a considerable degree of synergistic effect in terms of antifungal activity between the dienic alcohols and the phenolic phytoalexins (Vernenghi *et al.*, 1987). Hence, experiments should be conducted to verify and eventually exploit this phenomenon in groundnut-rust interactions. It would then be essential to prove experimentally whether this compound accumulates differentially in the host tissues according to their resistance levels. The mechanisms involved in the stimulation of its production and accumulation would be of particular interest in the host-pathogen interaction studies.

INDEX DES ANNONCEURS

ASSURMAFER	p. 180
AMERICAN EXPRESS	couv. p. 4
BANQUE NATIONALE DE PARIS	couv. p. 3
BLOHORN	VII
BRUKER	couv. p. 2
CAP-KEK	II
CIBA-GEIGY	p. 158

EQUIP-QUINCOA	IV
HERSTAL (Ateliers de)	p. 172
OLIER (Sté Nouvelle des Ets)	VIII
RENTEC	II
SPEICHIM	V
STORK	VI
WECKER (Usine de)	III