

JOÃO MARIA DE FIGUEIRÉDO
Engenheiro-Agrônomo

COMPOSTOS FENÓLICOS E FITOALEXINAS EM HIPOCÓTILOS E RAÍZES DE
FEIJOEIRO INOCULADOS COM *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk) Syd. E Hans

Orientador: Caio Octávio Nogueira Cardoso

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo
- 1975 -

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Caio Octavio Nogueira Cardoso, pela dedicação e orientação precisa e compreensiva;
- Ao Professor Dr. Eric Balmer, pelas sugestões e revisão dos originais;
- À Professora Dr.^a Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela ajuda na correção do "Summary";
- Ao Professor Dr. Armando Bergamin Filho, pela revisão dos originais;
- Aos Professores , Colegas e Funcionários do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelo apoio e auxílios concedidos;
- A Eng.^a-Agr.^a Alda Luiza Loureiro dos Santos, pelo apoio e estímulo para a finalização deste trabalho;
- A D.^a Ivone Padovani , pela sua constante dedicação;
- Aos funcionários Luiz Carlos Veríssimo e Eurice Amaral Mello, da Biblioteca Central da E. S. A. "Luiz de Queiroz", pela paciência e presteza de atendimento;
- Ao Instituto Biológico da Bahia, na pessoa do seu Diretor Professor Moacyr Duham de Moura Costa.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pela bolsa concedida;
- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DA DOENÇA	2
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E INTENSIDADE DA DOENÇA	3
PRODUÇÃO DE FENÓIS NA INTERAÇÃO <i>Fusarium</i> /FEIJOEIRO ..	3
VARIAÇÃO QUALITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS NA INTERAÇÃO DE ALGUNS FUNGOS E FEIJOEIRO	4
DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS	6
MÉTODOS DE INOCULAÇÃO	7
BIO-ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTICAS	8
3 - MATERIAL E MÉTODOS	9
VARIAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS EM HIPOCÓTI- LOS E SISTEMAS RADICULARES INOCULADOS E NÃO INOCULADOS COM <i>Fusarium solani</i> f. <i>phaseoli</i> EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A INOCULAÇÃO	13
HIPOCÓTILOS E RAÍZES DE FEIJOEIRO	14
4 - RESULTADOS	16
VARIAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS EM HIPOCÓTI- LOS E RAÍZES INOCULADAS E NÃO INOCULADAS	16

VARIAÇÃO QUALITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM HIPOCÓTILOS E RAÍZES DE FEIJOEIRO INOCULADOS E NÃO INOCULADOS	25
EFEITOS INIBITÓRIOS DE EXTRATOS DE HIPOCÓTILOS E SISTEMAS RADICULARES INOCULADOS E NÃO INOCULADOS ..	31
5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
6 - RESUMO	42
7 - SUMMARY	44
8 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	46
9 - A N E X O S	51

1 - INTRODUÇÃO

O feijão é a mais importante fonte de alimento em diversas partes do mundo. O nosso país figura entre estas como o maior produtor e consumidor, sendo a nossa produção em torno de dois milhões de toneladas anuais, apesar do baixo rendimento por área, o que reflete a falta de pesquisa sobre essa leguminosa.

Entre os fatores que determinam essa baixa produtividade podemos apontar aqueles de ordem fitossanitária e dentre esses as podridões de raízes causadas pelos fungos *Rhizoctonia solani* Kunh , *Thielaviopsis basicola* (Berk e Br) Ferr. e *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Berk) Snyd. e Hans.

Diversos autores têm estudado as relações entre patógenos e esta leguminosa e têm encontrado substâncias de natureza fenólica que possuem a capacidade de inibir "in vitro" aos mais diversos microrganismos.

No levantamento bibliográfico, verificou-se apenas referência aos estudos destas substâncias em hipocótilos, vagens e folhas (4 , 11 , 13 , 16 , 19 , 25) não se encontrando nada que nos fale sobre sistema radicular, apesar deste estar diretamente envolvido, pois os fungos em questão são causadores de podridões de raízes. Em vista disso desenvolvemos o presente estudo de compostos fenólicos e fitoalexinas em hipocótilos e raízes de feijoeiro inoculados com *Fusarium solani* f. *phaseoli*

2 - REVISÃO DE LITERATURA

OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DA DOENÇA

De acordo com PIERRE (19) , a podridão das raízes, causada por *Fusarium solani* f. *phaseoli* , foi primeiramente descrita por BURK HOLDER. Este fungo é patogênico a todas as variedades comerciais de *Phaseolus vulgaris* L. , tendo sido observada uma grande variabilidade no grau de susceptibilidade nas diversas linhagens estudadas. CHATTERJEE (9) , em seu trabalho, menciona que a podridão de raízes, causada por fungos do gênero *Fusarium* , é a principal doença do feijoeiro no Estado de Idaho, e que a sua ocorrência é de tal ordem que se torna quase impossível encontrar plantas saudias. BURKE (5) conclui que a produção é grandemente afetada por este fungo. NASH (18) verificou que 70 a 90% das lesões encontradas em hipocótilos eram causadas por *Fusarium solani* f. *phaseoli* , enquanto nas raízes a porcentagem encontrada foi apenas de 20 a 25% . BURKE (6) concluiu que a influência do fungo foi muito mais importante nas raízes laterais que sobre hipocótilos e raízes principais.

No Brasil, a ocorrência deste fungo foi verificada por Cardoso (informação pessoal), sendo necessário, ainda, um levantamento para se verificar a distribuição e frequência do patógeno nas diversas áreas de cultivo.

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E INTENSIDADE DE DOENÇA

ROMANOWSKI *et alii* (22) concluíram que as diferenças entre as concentrações de seis substâncias fenólicas, tanto nas variedades suscetíveis como nas resistentes, estão diretamente ligadas ao número de lesões existentes e que o aumento ou produção destes compostos resulta da interação parasita/hospedeiro, uma vez que apenas três destes compostos foram encontrados em extratos de plantas sadias.

BARNES e WILLAMS (3) encontraram resultados semelhantes nas interações entre *Venturia inaequalis* e *Podosphaera leucotricha* com macieiras. Esses autores verificaram a formação de fenóis e coumarinas em folhas e cascas de frutos de macieira inoculados. Nas combinações suscetíveis parasita/hospedeiro, as concentrações encontradas foram sempre maiores que nas combinações resistentes. Apesar destes resultados eles supõem que, nas combinações resistentes, a concentração destes compostos por célula seja maior que nas células das combinações suscetíveis. Consideram que a maior concentração verificada nas combinações suscetíveis deva-se talvez ao fato de terem sido feitas extrações de folhas inteiras e que, nestas combinações, o número de lesões por folha era maior que aquele obtido nas combinações resistentes.

PRODUÇÃO DE FENÓIS NA INTERAÇÃO *Fusarium*/FEIJOEIRO

PIERRE (19) estudou as interações entre os fungos *Fusarium solani* f. *phaseoli*, *Cladosporium cladosporioides*, *Thielaviopsis basicola* e *Monilinia fructicola*, com diversas linhagens de feijoei

ro, utilizando-se da técnica da gota de difusão. Observou a formação de compostos fenólicos 24 horas após a gota ter sido colocada sobre o tecido dos hospedeiros e que nas combinações *Fusarium solani* f. *phaseoli* e feijoeiro obtinha-se uma concentração mais elevada de o-dihidroxifenóis que nas demais combinações.

CARDOSO (7) determinou que a concentração de fenóis totais no extrato cru de hipocótilos infectados por *Fusarium solani*, aumenta com o desenvolvimento das lesões, alcançando o máximo 15 dias após a inoculação, o que corresponde a quase seis vezes os teores fenólicos existentes nas plantas sadias. Determinou também que a taxa de produção de fenóis totais em plantas doentes excede à taxa de crescimento da planta do 3º ao 9º dia, sendo superada ao 15º dia em diante após a inoculação. Quando a mesma relação foi feita com tecido de plantas sadias, a taxa de produção de fenóis foi sempre menor que o crescimento da planta.

VARIAÇÃO QUALITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS NA INTERAÇÃO DE ALGUNS FUNGOS E FEIJOEIRO

PIERRE (19) trabalhando com hipocótilos de feijoeiro inoculados com *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium solani* f. *phaseoli*, *Cladosporium cladosporioides* e *Monilinia fructicola*, obteve extratos que foram fracionados com éter de petróleo, os quais foram analisados cromatograficamente. Nesta análise determinou a existência de três substâncias fenólicas, as quais denominou substâncias I, II e III. Através de bioensaios verificou que apenas as substâncias I e II possuíam atividade

antifúngica. O exame espectrofotométrico demonstrou que a substância II possuía espectro de absorção semelhante ao conhecido para phaseollin. Posteriormente PIERRE e BATEMAN (20) estudando combinações *Rhizoctonia solani*/feijoeiro, concluíram que a substância I é que seria o phaseollin, invertendo deste modo a nomenclatura utilizada anteriormente.

VAN ETEN e BATEMAN (26) , utilizando cromatografia de camada fina em suporte de sílica Gel - G (Merk) e como sistema de solvente uma mistura de pentano - éter etílico - ácido acético (75:25:1) , determinaram que o Rf do phaseollin era 0,34 e que o mesmo poderia ser visualizado por fluorescência sob ultra-violeta curta ou com reagentes específicos para fenóis.

HAOWIGER e Von BROEMSEN (12) ; HESS e SCHWOCHAU (13) e HESS et alii (14) usaram uma solução de cloreto férrico a 1% em metanol como reagente específico para phaseollin, pulverizando as placas cromatográficas com esta solução e, após breve aquecimento, observaram a formação de uma coloração avermelhada.

CARDOSO (7) cromatografou extratos de hipocótilos inoculados com *Fusarium solani* f. *phaseoli* utilizando-se do mesmo sistema de cromatografia em camada fina descrita por VAN ETEN e BATEMAN (26), e observou que nos extratos resultantes havia uma substância no Rf 0,35 que fluorescia sob ultra-violeta e uma outra mancha no Rf 0,65 que absorvia U.V. Ambas as substâncias reagiam para as maiores dos reagentes de fenóis, mas no entanto, apenas a substância com Rf 0,65 , apresentou a reação com cloreto férrico em metanol descrito como típico para phaseollin por HESS e outros (12 , 13 , 14) . Esse mesmo autor

purificou a partir de placas de cromatograma ambas as substâncias e determinou o espectro de absorção de cada uma, verificando que a substância no Rf 0,65 possuía o mesmo espectro descrito para o phaseollin, enquanto que a substância encontrada no Rf 0,35 apresentava um espectro diferente.

VAN ETEN e BATEMAN (27) e VAN ETEN (28), estudando extratos de hipocótilos de feijoeiro infectados com *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. *phaseoli*, verificaram diferenças significativas nas substâncias induzidas por cada fungo em particular havendo, apenas, semelhanças no que se refere à produção de phaseollin e phaseollinisoflavan. Nos hipocótilos infectados com *Rhizoctonia*, foi verificada grande produção de uma substância denominada kievitone e que, segundo os autores, aparentemente, é a que parece estar primeiramente envolvida na limitação das lesões, enquanto que nos hipocótilos infectados com *Fusarium* a produção de kievitone foi quase nenhuma.

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS

PIERRE (29) utilizou o método de Arnow para a determinação de fenóis totais, nas diversas linhagens de feijoeiro utilizadas em seu trabalho, embora este método não seja o mais adequado para determinação de todos os fenóis. SWAIN e HILLS (23) concluem que para a determinação quantitativa de fenóis totais, todos os métodos são relativamente empíricos e que o método de Folin-Denis modificado foi o que melhor funcionou para determinar o total de fenóis em *Prunus do-*

mestica L.. CARDOSO (7) observou que este também foi o melhor método para a determinação de fenóis totais em feijoeiro.

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

ARMSTRONG e ARMSTRONG (1) utilizaram, em testes de patogenicidades, fungos da espécie *Fusarium oxysporum* no qual o hospedeiro é cultivado em areia lavada e irrigada com solução nutritiva. Neste método, o inóculo é cultivado na mesma solução usada para irrigação dos hospedeiros verificando-se apenas um aumento na concentração de sais e o acréscimo de 2% de glucose. A inoculação é feita colocando-se um determinado volume da suspensão de inóculo, obtida por homogeneização da cultura em liquidificador, em um sulco escavado ao redor do caule.

WELMAN (29) desenvolveu o método de imersão no qual o sistema radicular das plantinhas foi imerso em uma suspensão de esporos e fragmentos de hifas por um breve período de tempo e efetuado então o transplante.

BALMER (2) determinou que o método de imersão é muito severo para inocular plantas de algodão com *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*. CARDOSO (8), estudando as relações entre feijoeiro e *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*, concluiu que o método de inoculação por imersão era o mais eficiente, diminuindo o número de plantas escapes. Este mesmo autor (7) usou o método de imersão para o estudo das relações entre *Fusarium solani* f. *phaseoli* e feijoeiro.

BIO-ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTICAS

Segundo CARDOSO (7) , MULLER desenvolveu a técnica do bloco de agar, na qual a avaliação pode ser feita verificando-se a porcentagem de esporos germinados e não germinados ou o comprimento do tubo germinativo dos mesmos. CRUICKHANK e PERRIN (11) e PIERRE e BATEMAN (20) estudaram o efeito inibidor do phaseollin utilizando a técnica do crescimento miceliano. PIERRE (19) desenvolveu a técnica da suspensão de esporos em solução nutritiva. MUSUMECI (17) desenvolveu um método de estudos de substâncias inibidoras e microrganismos que consiste na distribuição de uma camada de meio de cultura sobre uma lâmina de vidro. Após a solidificação do meio, abrem-se pequenos orifícios com os diâmetros desejados. As substâncias a serem testadas são então colocadas dentro dos orifícios e, após um certo período de repouso para a difusão das substâncias, colocam-se no interior desses os microrganismos a serem testados.

Em função da revisão de literatura levada a efeito algumas hipóteses de trabalho podem ser levantadas:

- i - As substâncias fenólicas encontradas em hipocótilos e raízes , inoculadas e não inoculadas, podem ser qualitativamente diferentes.
- ii - As quantidades de fenóis totais encontradas em hipocótilos e raízes, inoculadas e não inoculadas, devem também variar.
- iii - Os efeitos inibidores dos diversos extratos de hipocótilos e raízes, inoculadas e não inoculadas, podem também variar .

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os organismos utilizados neste trabalho foram: como planta hospedeira, feijoeiros da variedade Rosinha, cujas sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Como patógeno os isolados 002 e 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli* e como organismos testes nos bio-ensaios, além dos isolados 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli*, já citado, utilizou-se também o isolado 025 de *Fusarium solani* f. *pisi*, o isolado 007 de *Fusarium solani* f. *cucurbitae* e o isolado de *Colletotrichum falcatum*, este último gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. H. Kimati.

Nos ensaios foram usadas plantas de feijoeiro com oito dias de germinadas. Estas plantas foram previamente cultivadas em caixas de madeira com 75 x 25 x 10 cm (comprimento x largura x altura), contendo areia lavada de rio, esterilizada por autoclavagem a 1 atm, durante 30 minutos, sendo as sementes distribuídas em 5 linhas a 2 cm de profundidade numa base de dez sementes por linha. O tratamento superficial das sementes foi feita com Qui-boá (hipoclorito de sódio comercial, contendo 5% de cloro ativo), diluída em água na proporção de 1:3 (v.v) pelo tempo de trinta minutos. Antes do plantio as sementes foram imersas em água por 24 horas.

Culturas com oito dias de cultivo de *Fusarium solani* f. *phaseoli*, usadas para inoculação, foram obtidas paralelamente ao processo de obtenção das mudas de feijoeiro. Usou-se para isto erlenme -

yer de dois litros contendo um litro de meio de ARMSTRONG (1) sendo os mesmos agitados manualmente duas vezes ao dia.

Estas culturas foram homogeneizadas por, aproximadamente, dois minutos em liquidificador e diluídas com água 1:1 (v.v).

Todos os fungos do gênero *Fusarium* foram conservados em solo estéril como descrito por TOUSSOUN e NELSON (24). Sempre que necessários estes fungos partia-se do material conservado em solo, transferindo-se pequenas porções deste para placas de Petri, contendo estas meio de glucose-peptona-agar (GPA) (8) e daí para meios definitivos de cultivo.

A inoculação foi feita mergulhando-se o sistema radicular e a base dos hypocótilos das mudas do feijoeiro obtidas em caixas de madeira, em 200 ml da suspensão homogeneizada e diluída de *Fusarium solani* f. *phaseoli*, por cinco minutos. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para vasos de barro contendo areia lavada de rio, esterilizada por autoclavagem (1 atm.), num total de cinco plantas por vaso. Estas plantas foram em seguida irrigadas com o excesso do inóculo e então irrigadas semanalmente com solução nutritiva de ARMSTRONG (1) e diariamente com água de torneira. A remoção das mudas das caixas de madeira foi feita usando-se um jato contínuo de água para liberar o sistema radicular com o mínimo de perda de raízes.

Em períodos determinados, após a inoculação, as plantas de feijoeiro foram desvasadas pelo mesmo processo de jato contínuo de água. As partes basais de hypocótilos e os sistemas radiculares foram separados, o peso fresco determinado e então armazenados a - 4°C.

Sistemas radiculares e hipocótilos coletados foram extraídos, separadamente, com etanol 95% p.a. numa proporção de 1:4 (peso fresco em grama de tecido: volume de etanol em ml) em liquidificador equipado com copo semimicro-homogeneizador, por dois minutos. Após a homogeneização, a fase líquida era separada da fase sólida por centrifugação a 18.000 g. Recolhida a fase líquida, a fase sólida foi seca por 24 horas a 105-110 °C e seu peso seco determinado. A fase líquida foi evaporada até a secagem completa em evaporador improvisado, no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Figura 1).

No evaporador, a solução etanólica era mantida a uma temperatura de 30 a 40 °C em Kitassato, em banho-maria, e submetida a uma baixa pressão. Para se acelerar a evaporação proporcionou-se uma leve corrente de ar soprando sobre a superfície da solução. O ar com vapores de álcool era passado através de um condensador de serpentina em banho de gelo e o condensado recolhido em um segundo Kitassato ligado a uma bomba de vácuo.

Após a secagem completa dos extratos os resíduos foram redissolvidos em 10 ml de etanol 95% , p.a. , e armazenados a - 4 °C . Ao extrato assim obtido convencionou-se chamar de Extrato Etanólico (EE).

Fez-se a determinação de fenóis totais existentes nos extratos pelo método de Folin-Denis , segundo descrito por SWAIN e HILLS (23) , tendo sempre sido usado um padrão conhecido de ácido clorogênico

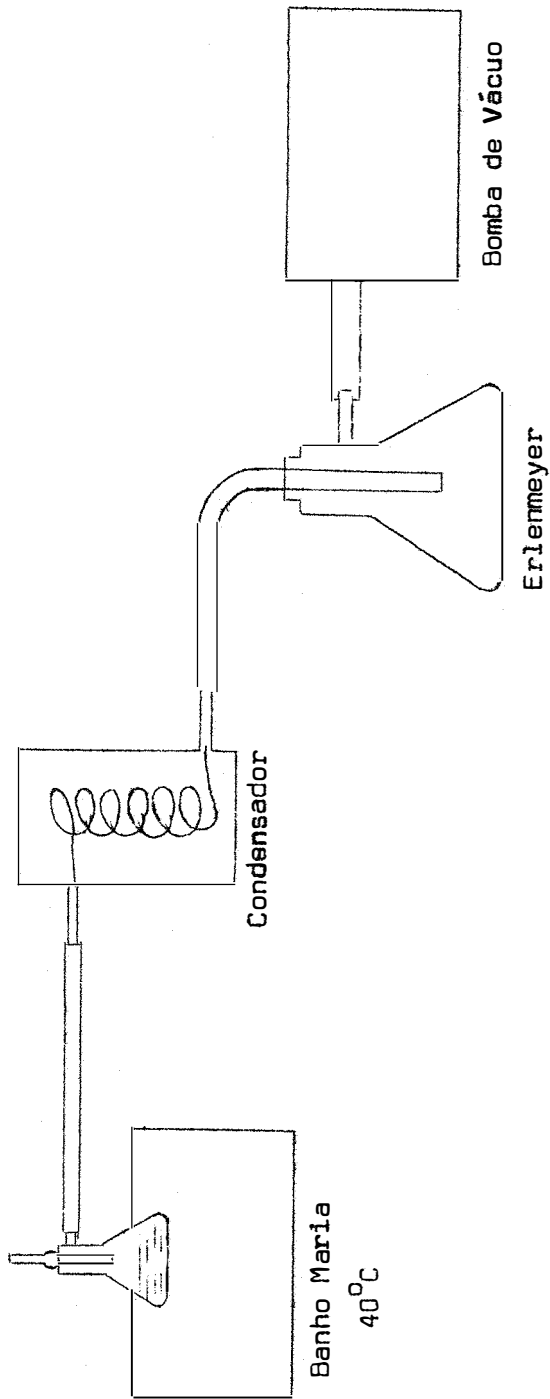


Fig. 1 - Evaporador improvisado no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da U.S.P.

em etanol como referência. Os resultados destas análises foram expressos no extrato por absorbância a 725 nm.

Para análise qualitativa dos extratos utilizou-se o sistema de cromatografia em camada fina (CCF) de Higgs, descrito por VAN ETEN e BATEMAN (26), como adequado para detecção de phaseollin. A visualização das substâncias foi feita sob luz ultra-violeta de comprimento de onda curto e através da reação para fenóis com ferrocianeto + cloreto férrico (volumes iguais a 1% em água) ou com cloreto férrico a 3% em metanol seguidas de breve aquecimento para detecção de phaseollin, segundo HESS e SCHWOCHAU (13), HADWIGER e VON BROEMBSEM (12) e confirmado por CARDOSO (7).

VARIAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM HIPOCÓTILOS E SISTEMAS RADICULARES INOCULADOS E NÃO INOCULADOS COM *Fusarium solani* f. *phaseoli* EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A INOCULAÇÃO

Este experimento foi esquematizado em blocos casualizados, com três repetições, com a finalidade de se determinar a curva de produção de fenóis e as diferenças qualitativas destas substâncias em hipocótilos e raízes de plantas inoculadas e não inoculadas.

As plantas de feijão foram inoculadas com *Fusarium solani* f. *phaseoli*, isolados 002 e 003, e como testemunha utilizou-se plantas de feijoeiro cujo sistema radicular e base de hipocótilos foram mergulhados em solução nutritiva antes de serem transplantados para os vasos.

A coleta do material para a avaliação foi feita em treze períodos subsequentes ao transplante das mudas para os vasos. O primeiro período foi de 48 horas após o transplante das plantas e o mesmo tempo foi mantido entre períodos consecutivos de coleta.

Para cada parcela, em separado, foi feita a determinação de fenóis totais nos extratos etanólicos e posteriormente os mesmos extratos foram cromatografados para comparações qualitativas.

EFEITO ANTI-FUNGICO DE EXTRATO DE TECIDOS DOENTES E SADIOS DE HIPOCÓTILOS E RAÍZES DE FEIJOEIRO

Este ensaio foi realizado para determinar se os extratos obtidos tinham capacidade inibidora sobre fungos patogênicos e não patogênicos ao feijoeiro.

Os extratos usados nestes ensaios foram obtidos de noventa plantas inoculadas com *Fusarium solani* f. *phaseoli*, isolado nº 003, e de noventa plantas não inoculadas, colhidas doze dias após o transplante para vasos. As extrações dos tecidos de hipocótilos e de raízes foram feitas do mesmo modo já descrito. A seguir os extratos foram levados a secagem total em evaporador rotatório, a 40°C, e então redissolvidos em 30 ml de etanol 95% p.a.

Uma alíquota de 10 ml do extrato etanólico obtido foi diluída com água numa proporção de 1:1 (v:v). A seguir o etanol foi evaporado a 40°C em evaporador rotatório e a fase aquosa fracio

nada uma vez com éter de petróleo (ponto de ebulição 60 a 80 °C) na proporção de 1:4 (v.v) . Após a partição, a fase éter foi totalmente evaporada e o resíduo redissolvido em 10 ml de etanol 95% p.a. Este extrato chamou-se de Extrato Éter de Petróleo (EEP).

Face a determinação dos fenóis totais nos extratos originais, bem como naqueles obtidos mediante a partição com éter de petróleo, as soluções testes usadas no bioensaio foram concentradas do seguinte modo: 5 ml de cada extrato foi totalmente evaporado e o resíduo redissolvido em 0,5 ml de etanol 95% p.a.

A determinação da capacidade anti-fúngica foi feita pelo método desenvolvido por MUSUMECI e FIGUEIREDO (17). Foram utilizadas lâminas de microscopia, sobre as quais foi depositada uma camada de meio de cultura GPA , na qual, após solidificação, foram feitos quatro orifícios de 3 mm de diâmetro. Em cada orifício foram colocados 20 µl da solução teste. Esta operação foi realizada em duas etapas, colocando-se na primeira 10 µl da solução e aguardando-se seis horas para que este volume se difundisse no meio e então foram colocados os outros 10 µl e nesta etapa as lâminas foram deixadas em repouso por doze horas. Após este período colocavam-se 5 µl de suspensão de conídios dos fungos a serem testados.

Para a avaliação utilizou-se o diâmetro médio de quatro colônias submetidas ao mesmo tratamento, transformadas em porcentagem de crescimento em relação à testemunha, a qual recebeu apenas 20 µl de etanol e foi considerada como 100% de crescimento.

4 - RESULTADOS

VARIAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS EM HIPOCÓTILOS E RAÍZES INOCULADAS E NÃO INOCULADAS

As médias dos resultados obtidos nas análises quantitativas dos fenóis totais, em equivalentes de ácido clorogênico, em 10 ml do EE , de hipocótilos e de raízes coletados em diferentes períodos após a inoculação, encontram-se nos Quadros 1 e 2 , respectivamente. Os resultados originais encontram-se nos Quadros 1 e 2 do Anexo.

Pelos dados obtidos observa-se que ocorre inicialmente um aumento rápido na concentração de fenóis totais nos hipocótilos inoculados com ambos os isolados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* e que nas plantas não inoculadas a concentração de substâncias fenólicas apresenta pouca variação, mantendo-se praticamente inalterada durante todos os 26 dias após o transplante.

Observa-se também que existe uma tendência de aumento dos fenóis totais nos primeiros vinte dias e a seguir nota-se uma queda nos teores encontrados. No caso do isolado 002 , no período de 24 dias verifica-se uma queda brusca na concentração de fenóis (Figura 2) .

Na relação entre peso seco de tecido de hipocótilo extraído e a concentração de fenóis, como se pode observar pela Figura 3 , as plantas inoculadas apresentam um aumento contínuo da concentração de fenóis, enquanto que nas plantas não inoculadas esta concentração permanece constante.

QUADRO 1 - Fenóis totais no EE de hipocótilos de feijoeiros inoculados e não inoculados com os isolados 002 e 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli*

Períodos após inoculados (em dias	Equivalentes de ácido clorogênico (+)		
	em mg/10 ml de Extratos Etanólicos		
	Isolado 002	Isolado 003	Não inoculado
2	0,605	0,313	0,236
4	1,663	1,337	0,230
6	3,140	3,186	0,186
8	3,725	3,833	0,226
10	4,700	5,740	0,360
12	4,456	5,957	0,396
14	4,826	5,176	0,323
16	4,635	6,450	0,373
18	5,685	7,050	0,293
20	6,870	6,816	0,316
22	5,535	6,780	0,283
24	1,890	7,890	0,303
26	5,265	5,683	0,236

(+) Média de três repetições.

QUADRO 2 - Fenóis totais no EE de raízes de feijoeiro inoculados e não inoculados com os isolados 002 e 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli*

Períodos após inoculação (em dias)	Equivalentes de ácido clorogênico (+)		
	em mg/10 ml de Extratos Etanólicos		
	Isolado 002	Isolado 003	Não inoculados
2	0,623	0,578	0,590
4	1,000	0,926	0,536
6	1,016	1,655	0,426
8	0,960	1,186	0,513
10	0,853	0,960	1,250
12	0,733	1,140	1,580
14	0,730	0,980	0,970
16	0,653	0,866	1,033
18	0,676	1,026	0,590
20	1,110	1,210	0,610
22	0,656	1,140	0,726
24	0,200	3,713	0,690
26	0,885	0,686	0,396

(+) Média de três repetições.

Pela observação dos dados relativos aos fenóis totais existentes nos extratos de tecidos de sistemas radiculares inoculados e não inoculados verifica-se uma grande irregularidade nas concentrações obtidas. Nos EE de sistemas radiculares inoculados a concentração de fenóis totais cresce até o 6º dia após o transplante, enquanto que nos EE de sistema radicular não inoculados a mesma decresce até este período e a partir daí verifica-se um aumento até o 12º dia do transplante.

A relação da concentração de fenóis totais por peso seco de sistema radicular extraído mostra que nas plantas não inoculadas há um decréscimo de fenóis totais desde o 2º dia após o transplante, até o final dos períodos. Nas plantas inoculadas o aumento na concentração de fenóis se verificou até o 6º dia após o transplante e a partir deste período as concentrações começam a cair e as curvas obtidas se tornam bastante irregulares. (Figura 5). Entretanto, a concentração de fenóis por grama de tecidos extraídos, é significativamente marcante nas plantas doentes.

Comparando-se as concentrações de fenóis totais obtidos nos EE de hipocótilos e raízes doentes, observa-se que no caso de hipocótilos as mesmas são maiores que em sistemas radiculares, sendo que, em contraposição, as raízes sadias apresentam maiores concentrações que hipocótilos sadios.

Na Figura 6, podemos observar que o ganho de peso em tecidos nos sistemas radiculares não inoculados foi crescente em todos os períodos, enquanto que nos sistemas radiculares inoculados com os iso

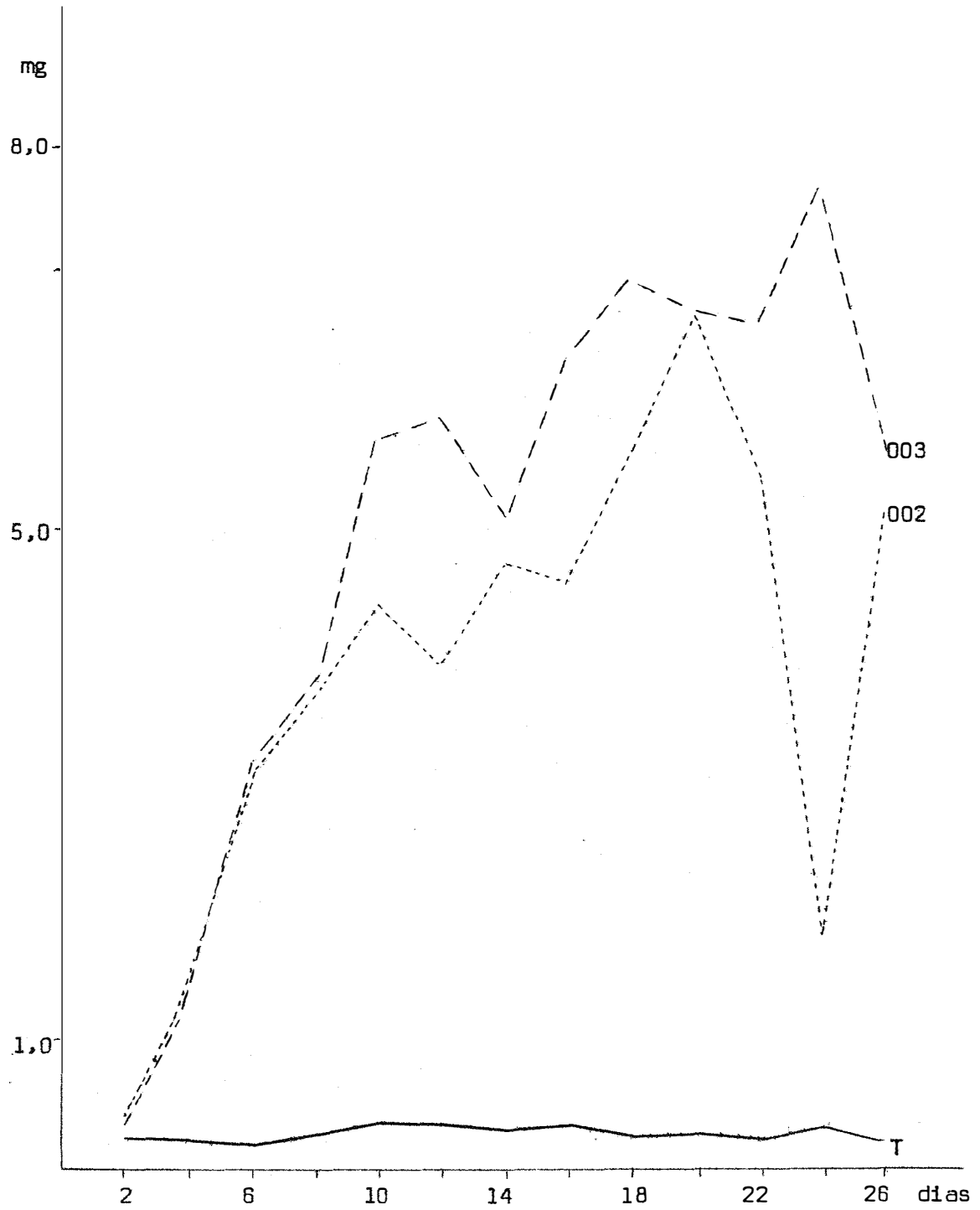


Figura 2 - Fenóis Totais nos EE (mg/10 ml) de Hipocótilos Inoculados e não Inoculados

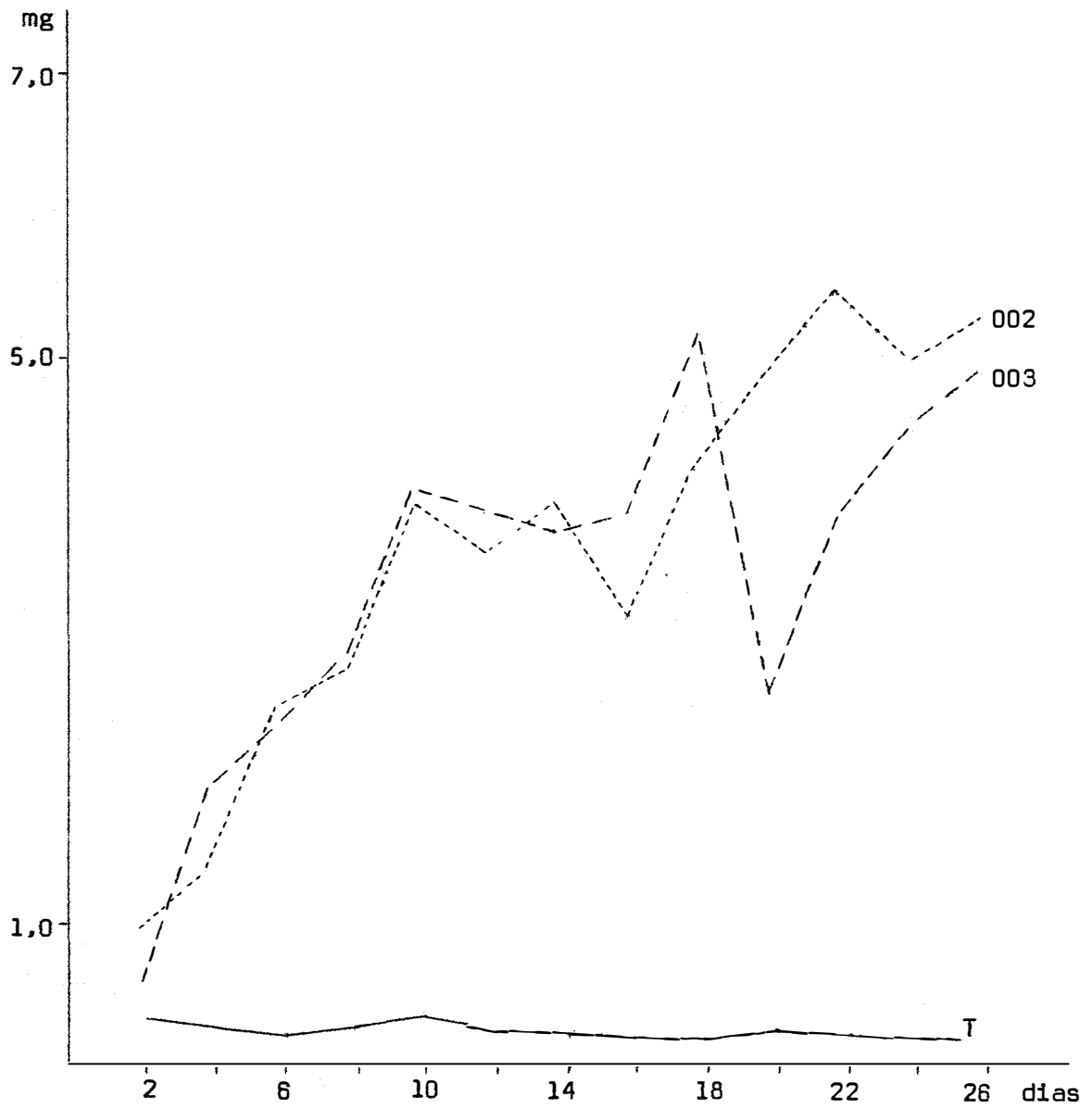


Figura 3 - Fenóis Totais no EE (mg/peso seco) de Hipocótilos Inoculados e não Inoculados

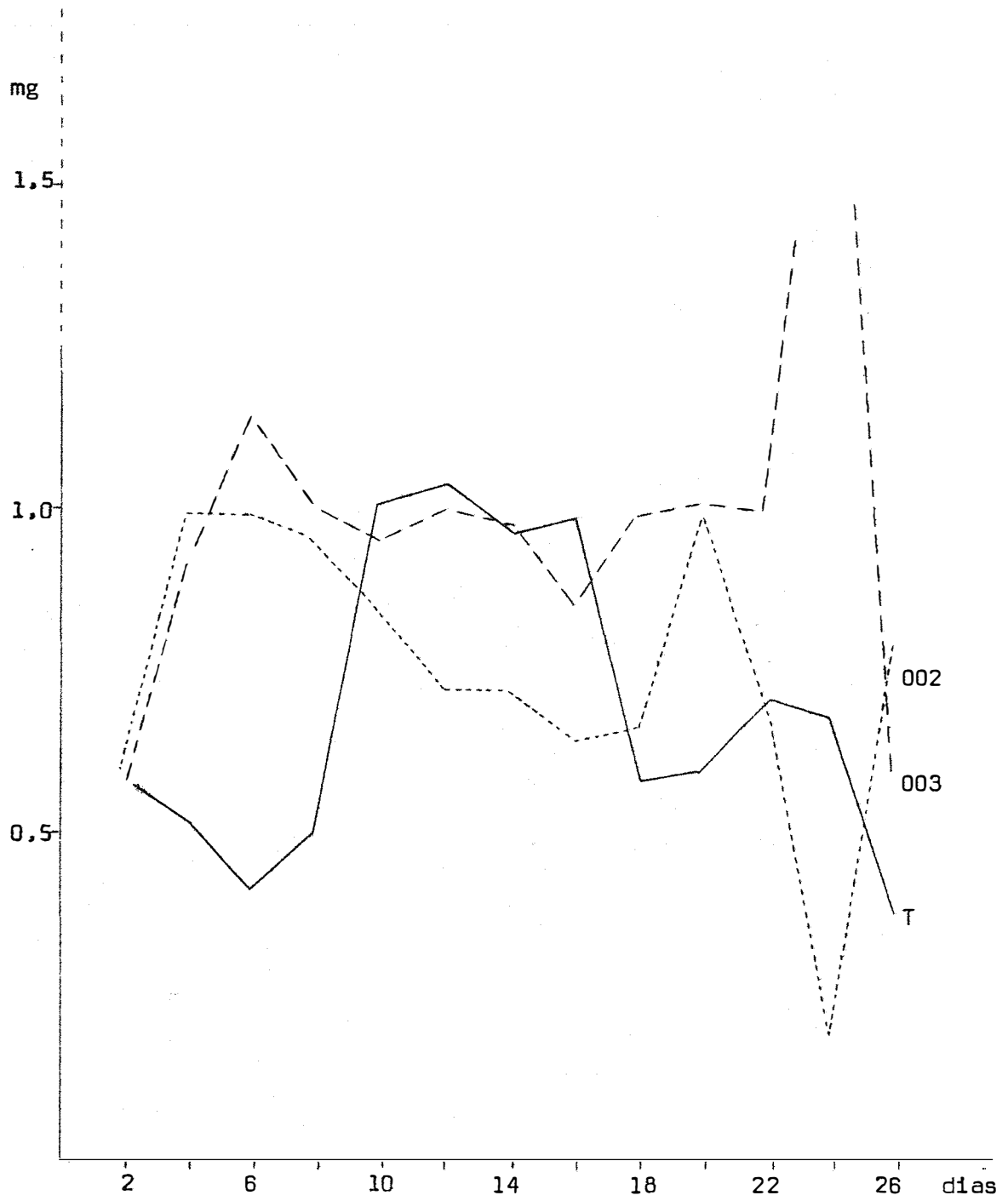


Figura 4 - Fenóis Totais nos EE (mg/10 ml) de Sistema Radicular Inoculados e Não Inoculados

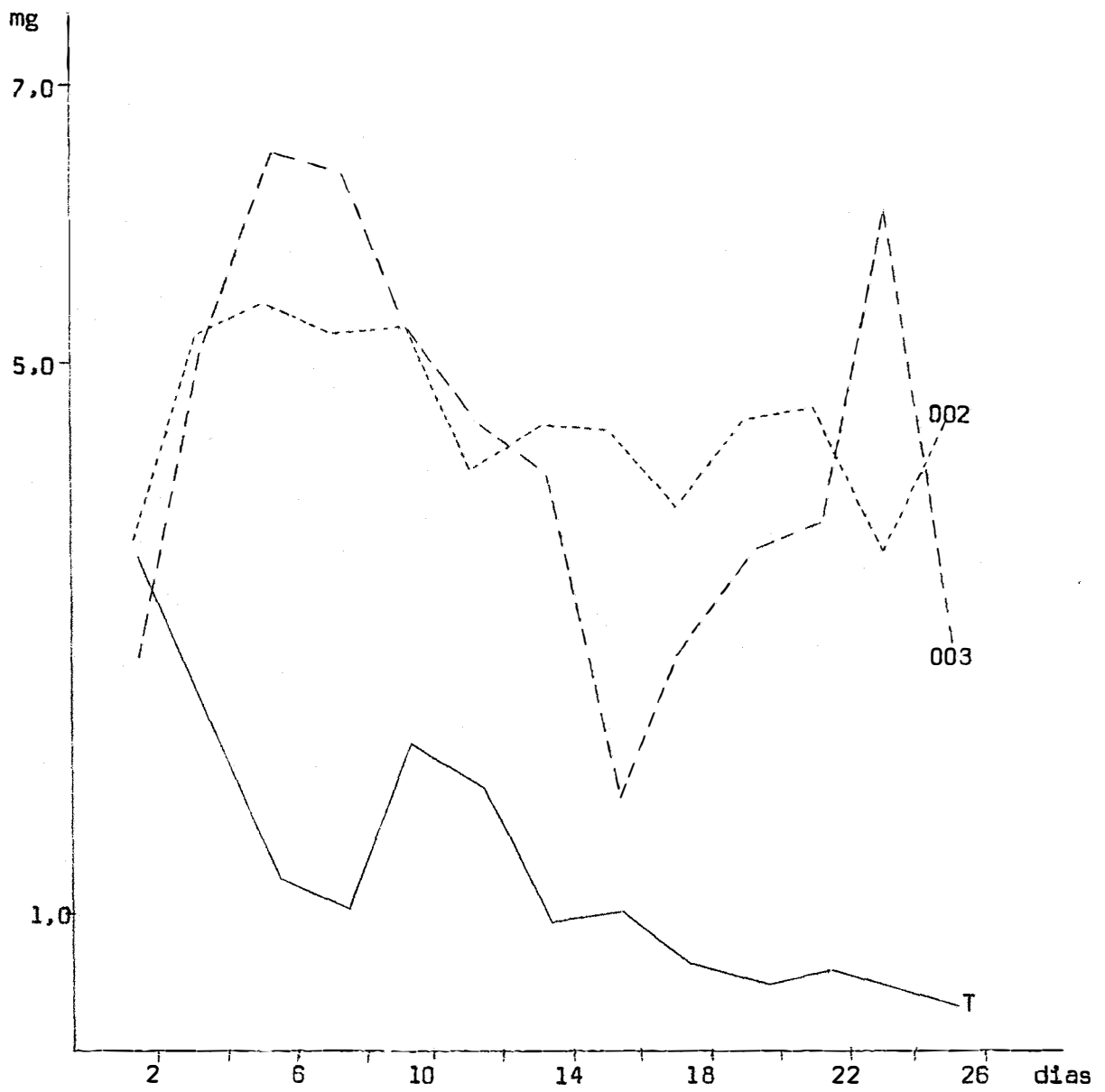


Figura 5 - Fenóis Totais nos EE (mg/peso seco) de Sistema Radicular Inoculados e Não Inoculados

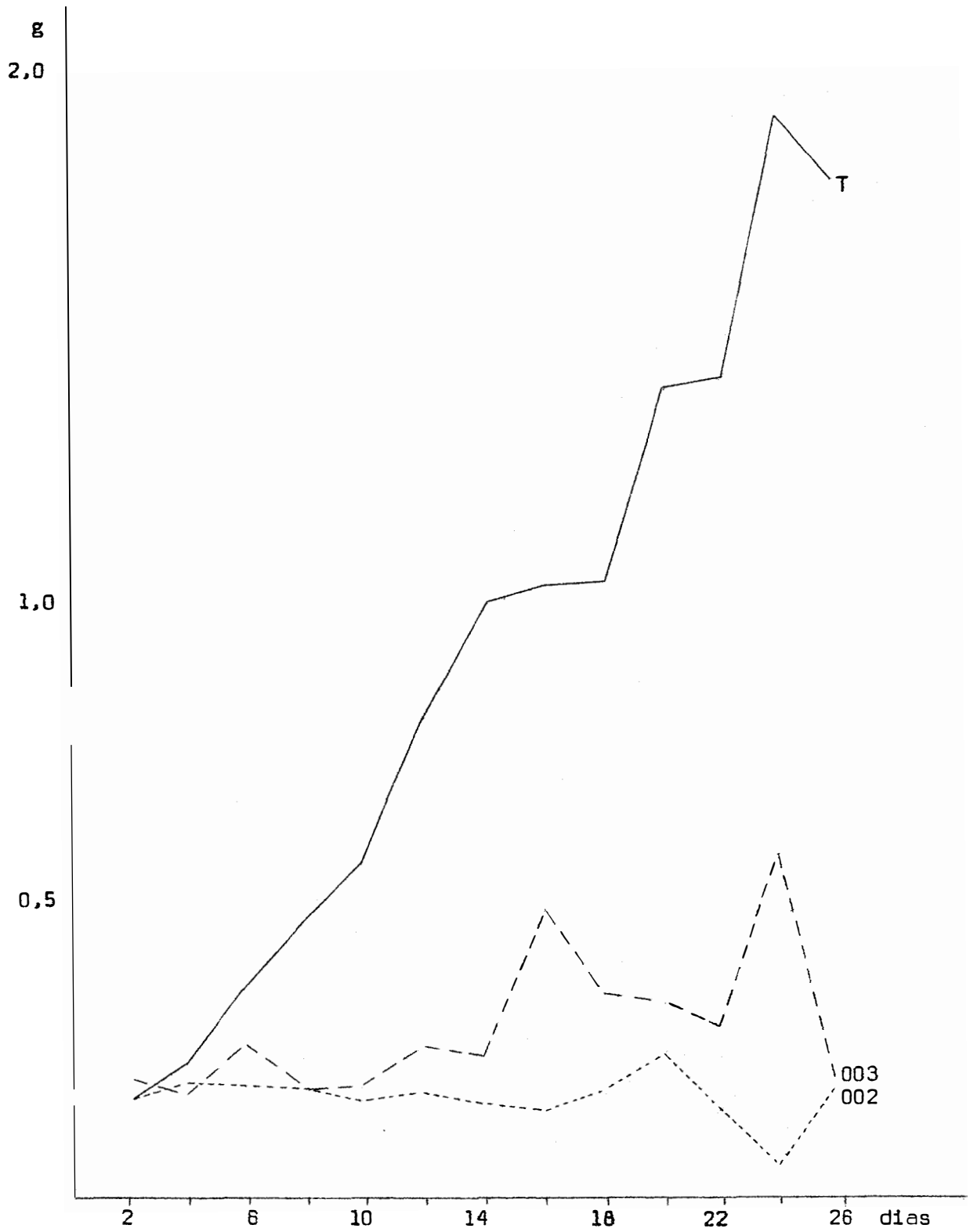


Figura 6 - Variação do Peso Seco em Sistemas Radiculares Inoculados e Não Inoculados

lados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* , verificou-se algum crescimento apenas em alguns períodos durante todo o experimento, sendo contudo sempre bem inferior aos sistemas radiculares não inoculados.

VARIAÇÃO QUALITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM HIPOCÓTILOS E RAÍZES DE FEIJOEIRO INOCULADAS E NÃO INOCULADAS

As diferenças qualitativas entre os extratos etanólicos de hipocótilos e raízes de plantas inoculadas e não inoculadas nos diferentes períodos de coleta realizadas em CCF , encontram-se nas Figuras 7 , 8 , 9 , 10 e 11 .

A observação dos cromatogramas sob U.V. curto dos EE de hipocótilos inoculados e não inoculados revelou a presença de duas substâncias que absorvem o comprimento de onda, localizadas nos Rf 0,40 e 0,55 e duas que fluorescem nos Rf 0,25 e 0,60 . Quando se usou ferrocianeto + cloreto férrico, verificou-se intensa reação para fenóis nos Rf 0,25 e 0,55 e fraca no Rf 0,40 . Apenas a substância localizada no Rf 0,55 reagiu com o cloreto férrico em metanol, de acordo com (12 , 13 e 14). Nos EE de hipocótilos não inoculados não se verificou a presença de nenhuma das substâncias acima referidas.

Na análise cromatográfica dos EE de sistemas radiculares inoculados e não inoculados, notou-se grandes diferenças entre as substâncias encontradas.

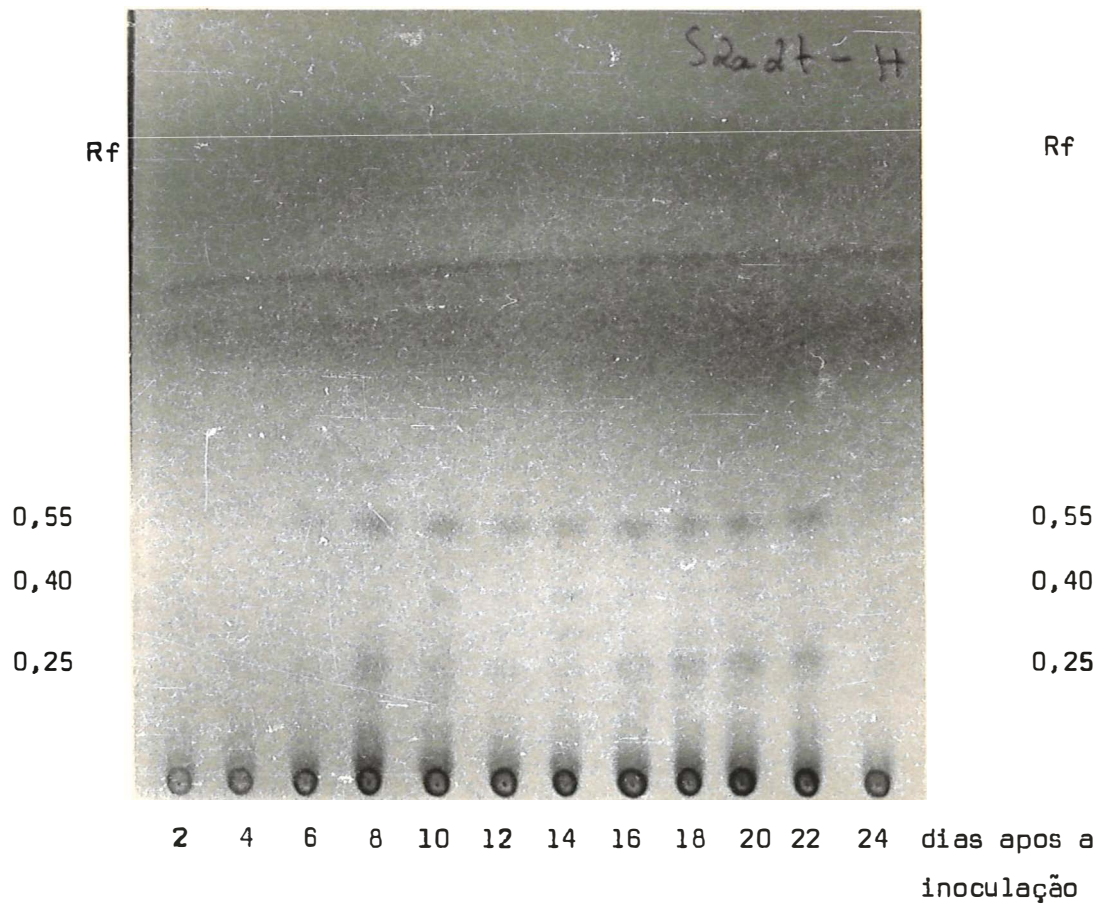


Figura 7 - Cromatograma de EE de Hipocótilos Inoculados
Isolado 002
100 μ l por mancha

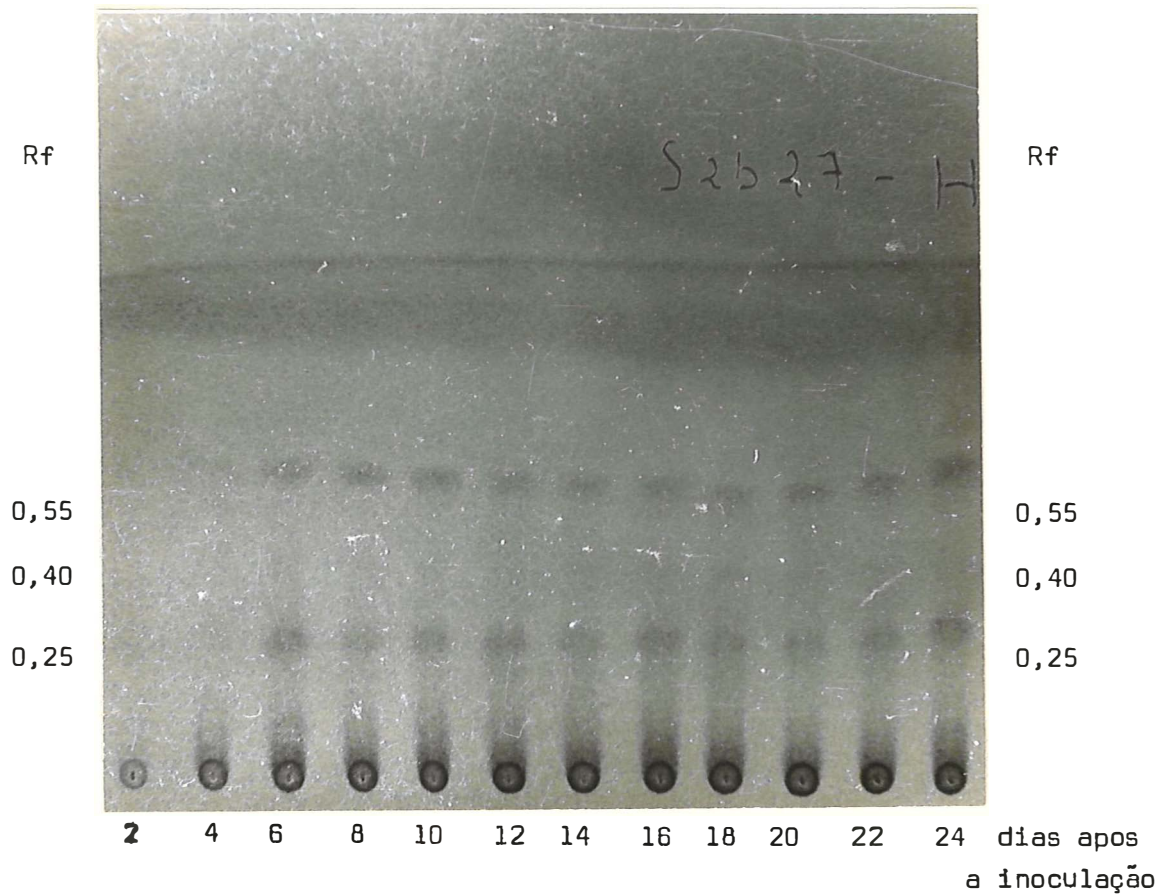


Figura 8 - Cromatograma de EE de Hipocótilos Inoculados
Isolado 003

100 μ l por mancha

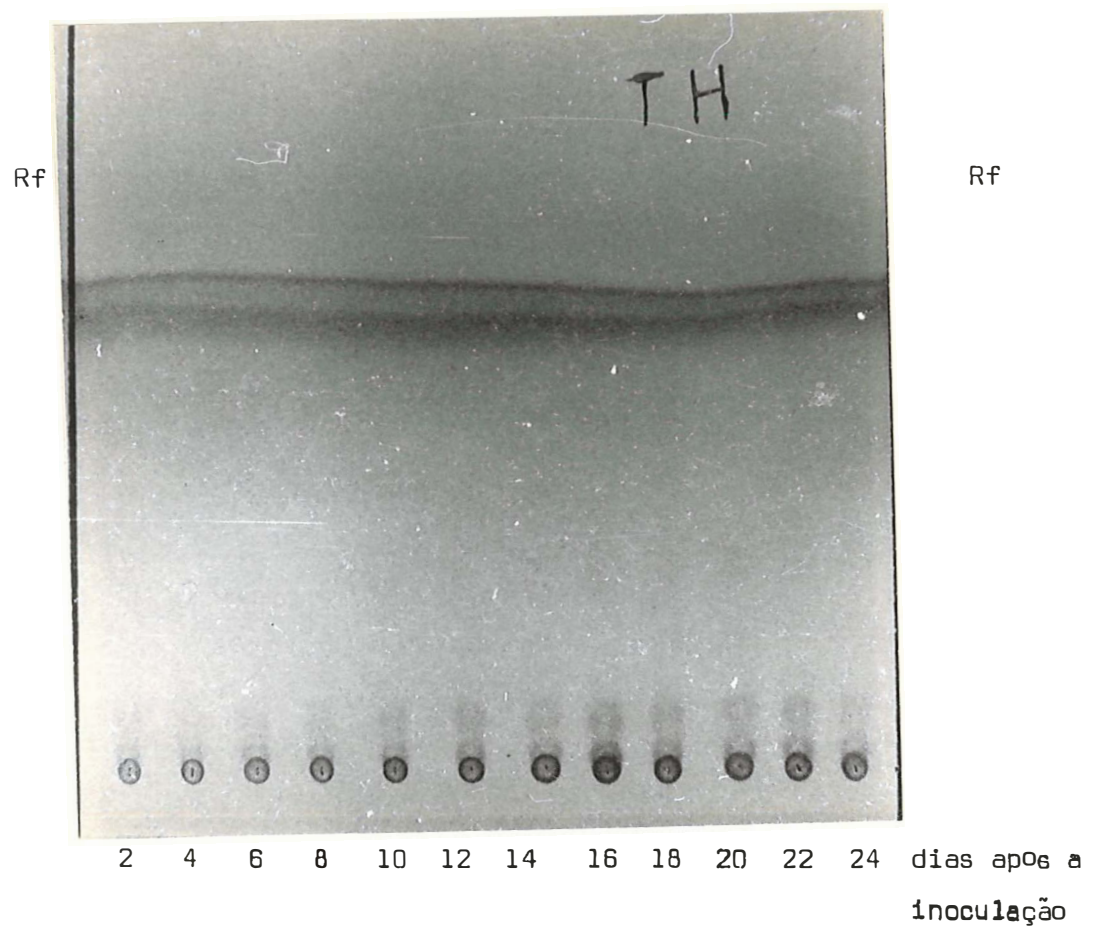


Figura 9 - Cromatograma de EE de Hipocótilos
Não Inoculados
100 µl por mancha

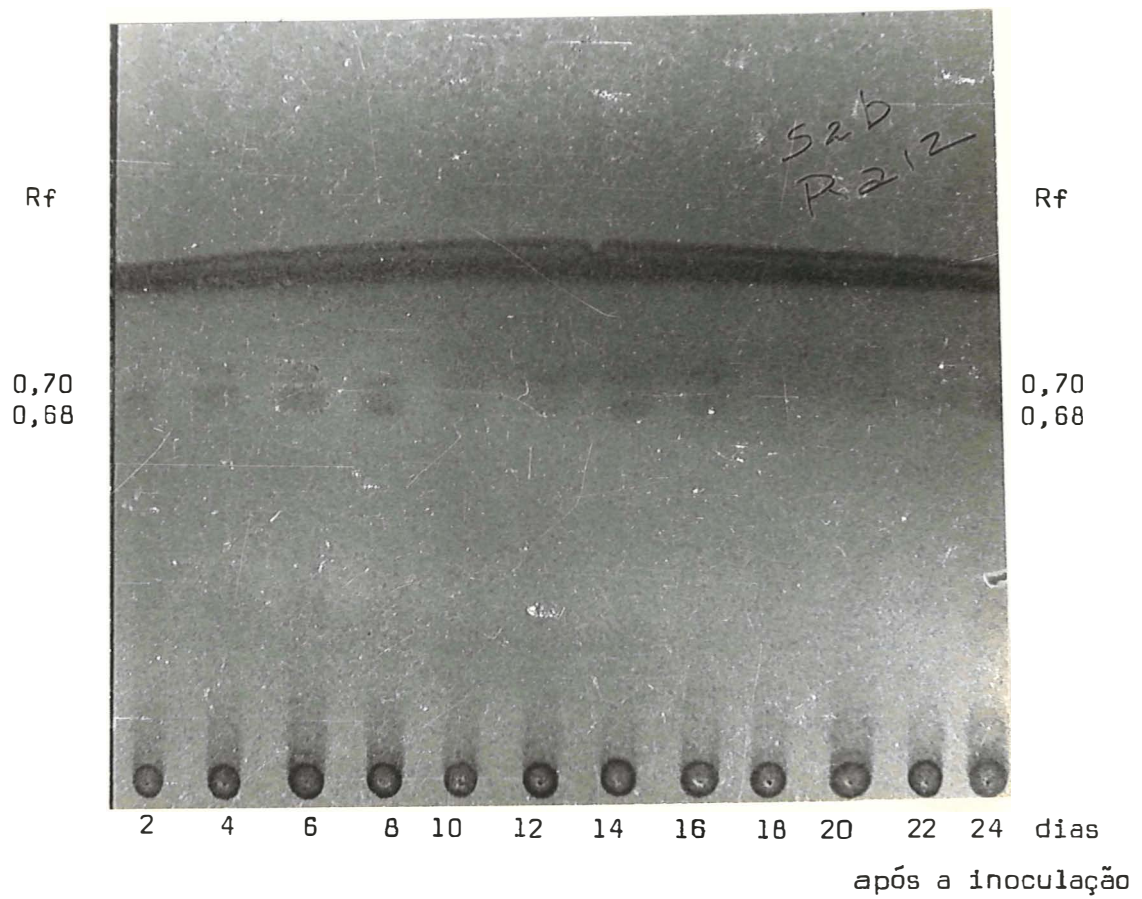


Figura 10 - Cromatograma de EE de Sistema Radicular
Inoculado Isolado 003
100 μ l por mancha

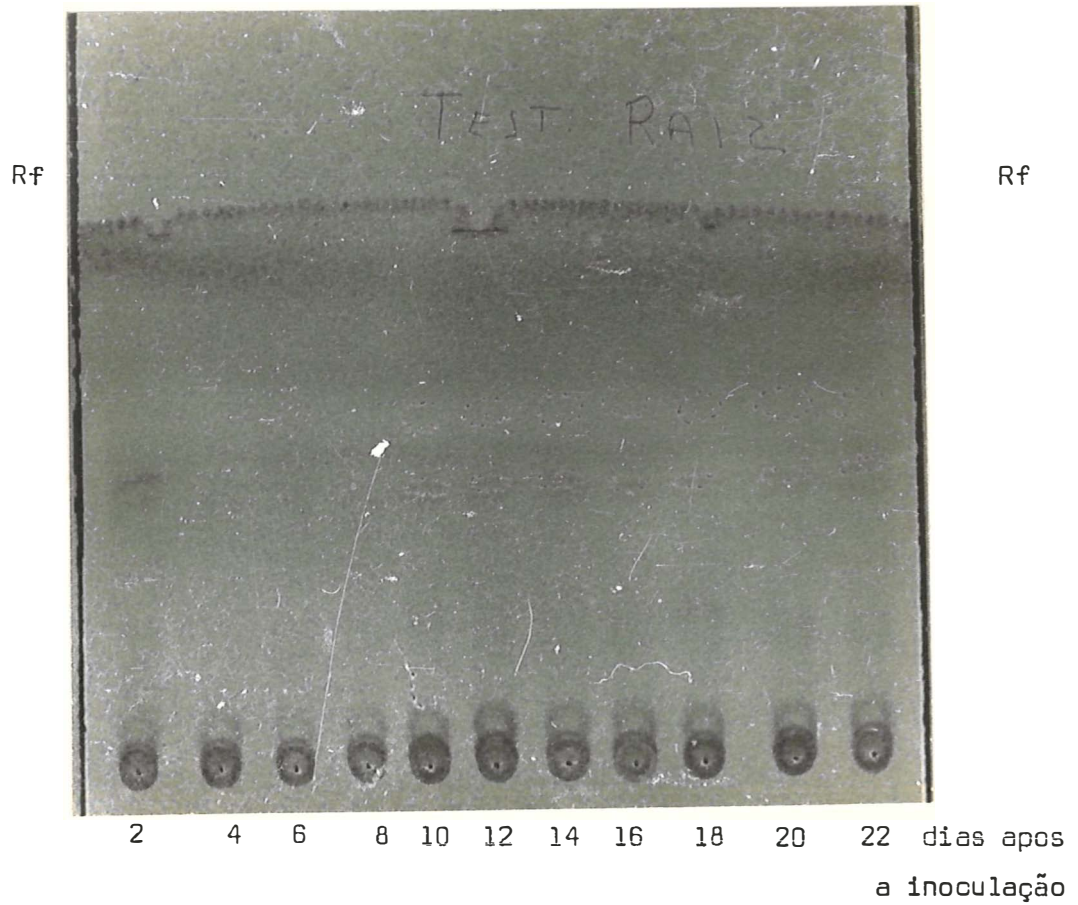


Figura 11 - Cromatograma de EE de Sistema Radicular
Não Inoculado
100 μ l por mancha

No exame com U.V. curto, verificou-se apenas a presença de três substâncias que absorvem, localizadas nos Rf 0,50 , 0,68 e 0,70 e que não se encontram em plantas não inoculadas. Entre as que fluorescem, verificou-se apenas o aparecimento de uma substância localizada no Rf 0,60 de coloração amarelo e que aparentemente se encontra em grande quantidade. Esta substância passou quase totalmente para a fração éter de petróleo quando foi efetuado o particionamento e não reage para fenóis com os reagentes usados.

Na revelação dos cromatogramas com ferrocianeto + cloreto férrico verificou-se reação para fenóis nos Rf 0,68 e 0,70 apenas nos extratos EE de sistema radicular inoculado.

EFEITOS INIBITÓRIOS DE EXTRATOS DE HIPOCÓTILOS E SISTEMAS RADICULARES INOCULADOS E NÃO INOCULADOS

As porcentagens médias de crescimento de alguns isolados de *Fusarium solani* patogênicos e não patogênicos e de *Colletotrichum falcatum* isolado de plantas de milho, submetidos a diversos extratos de plantas de feijoeiro inoculadas e não inoculadas, podem ser observadas pelo Quadro 3 .

De acordo com os resultados obtidos todos os extratos tiveram efeito inibidor no crescimento de *Fusarium solani* f. *cucurbitae* e *Colletotrichum falcatum* . Com relação aos isolados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* e *Fusarium solani* f. *pisii* , também patogê-

nicos do feijoeiro segundo CARDOSO (informação pessoal) , apenas os extratos EE de hipocótilos tiveram ação inibidora.

Os extratos EE e EEP de sistemas radiculares inoculados tiveram ação inibidora contra todos os fungos testados, apesar da grande diferença na concentração de fenóis totais.

QUADRO 3 - Efeitos inibitórios dos diversos Extratos de Hipocótilos e Sistemas Radiculares inoculados e não inoculados

Concentração dos Extratos ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	EE Hipocótilo Inoculado		EEP Hipocótilo Inoculado		EE Raiz Inoculada		EEP Raiz Inoculada		Controle Etanol 95% p.a.
	EE	EE	EEP	EEP	EE	EE	EEP	EEP	
0,58	90	3,88	0,29	1,36	1,45	0,24	83	100	100
	90	65	100	100	70	83	100	100	100
<i>F. solani</i> f. <i>pisi</i> % de crescimento									
100	100	80	100	100	60	80	100	100	100
	100	80	100	100	60	80	100	100	100
<i>F. solani</i> f. <i>cucurbitae</i> % de crescimento									
50	50	0	70	25	37,5	55	100	100	100
	50	0	70	25	37,5	55	100	100	100
<i>Colletotrichum falcatum</i> % de crescimento									
47,8	47,8	0	49,1	21,7	0	26	100	100	100
	47,8	0	49,1	21,7	0	26	100	100	100

Período de 48 horas.

5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Como pode-se observar nos resultados dos nossos trabalhos, a concentração de compostos fenólicos nos EE de hipocótilos aumentou com o progresso da doença. Isto foi verificado para os dois casos nos quais se correlacionaram as concentrações obtidas por peso seco de tecido extraído e volume de extrato obtido, o que coincide com os resultados de CARDOSO (7). Resultados semelhantes, nos quais foram verificados o aumento da concentração de substâncias de natureza fenólica com o desenvolvimento da doença ou aumento do número de lesões, foram também encontradas por PIERRE (19) em interações de plantas de feijoeiro com *Fusarium* e *Thielaviopsis*, verificando-se o mesmo com ROMANOWSKI (22) que usou os mesmos hospedeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum*.

Nos sistemas radiculares, as concentrações de compostos fenólicos apresentam uma variação muito grande em todos os tratamentos. Quando estas concentrações foram correlacionadas por peso seco de tecido extraído, observou-se que nos EE de sistemas radiculares inoculados e não inoculados, as concentrações de fenóis eram igualmente altas no primeiro período de coleta (dois dias após o transplante). A partir deste período, observou-se nas raízes de plantas não inoculadas uma diminuição na concentração de fenóis totais. A elevada concentração de fenóis, inicialmente observada tanto em plantas doentes como sadias provavelmente se deve a ferimentos feitos nas raízes durante a operação de transplante (10).

Analisando-se o ganho de peso seco de raízes (Figura 6) , observa-se que há um aumento progressivo deste nos sistemas radiculares não inoculados e praticamente nenhum nos sistemas radiculares inoculados. Com base nestes resultados, pode-se explicar que a alta concentração de fenóis totais obtida nos sistemas radiculares de plantas não inoculadas decorre em se ter extraído uma quantidade muito grande de tecido. Esta hipótese é reforçada comparando-se o ganho de peso dos sistemas radiculares inoculados com os dois isolados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* e aquele apresentado pelas plantas testemunhas.

A irregularidade das curvas obtidas quando considerou-se a concentração de fenóis totais por EE obtido (equivalente a concentração de fenóis por tratamento) nos diferentes períodos, deve-se ao fato da constante produção de novas raízes e a perda de tecido das raízes velhas.

As novas raízes apresentavam-se sem sintomas da doença e a sua quantidade era variável de período para período e, conseqüentemente a quantidade de fenóis extraída não representava apenas aquela existente em tecido doente. O total de fenóis nos sistemas radiculares de plantas não inoculadas, quando expressos em concentração de fenóis por tratamento, também mostraram muita variação nos diferentes períodos de coleta. Esta variação é provavelmente, função das quantidades de novas raízes nos diferentes períodos.

Observando-se a Figura 5 , no 16º dia do período, nos sistemas radiculares inoculados com o isolado 003 , nota-se significativa queda na curva obtida. Entretanto, na Figura 6 observa-se um aumento

no peso seco, no mesmo período de coleta, dos sistemas radiculares inoculados com o mesmo isolado. Isto possivelmente deverá ter refletido na queda acentuada da concentração dos fenóis totais.

Na análise qualitativa dos EE de hipocótilos inoculados verificou-se a presença de substâncias fenólicas nos Rf 0,25 , 0,40, e 0,55 , das quais apenas aquela localizada no Rf 0,55 apresentou reação específica para phaseollin de acordo com HADWIGER et alii , HESS et al. e HESS, et alii (12 , 13 e 14). Considerando-se os resultados aqui obtidos e os de CARDOSO (7) , que determinou o espectro de absorção desta substância e os resultados de MICHELE et alii (15) que usou o mesmo sistema cromatográfico, os mesmos indicam o Rf provável para phaseollin como sendo 0,55 e não como originalmente descrito por BATEMAN (4).

Das substâncias encontradas nas análises qualitativas dos EE obtidos de hipocótilos inoculados em diferentes períodos após o transplante, podemos destacar o phaseollin como sendo a primeira substância a se acumular nos tecidos em quantidades detectáveis quatro dias após a inoculação. Isto nos leva a crer que esta substância deva ser a primeira a ser produzida em hipocótilos como uma reação à invasão desses tecidos por *Fusarium solani* f. *phaseoli*.

VAN ETEN e BATEMAN (27) verificaram que, em hipocótilos infectados com *Rhizoctonia solani* , forma-se uma substância que os autores denominaram de kievitone, e que segundo os mesmos, é a que parece ser a mais importante na reação das plantas de feijoeiro à ação

deste fungo. Contudo, os mesmos autores verificaram que havia produção de phaseollin em concentrações apreciáveis nos mesmos tecidos.

VAN ETTEN (28) verificou que, em hipocótilos infectados com *Fusarium solani* f. *phaseoli*, a produção de kevitone é quase nula, enquanto que a produção de phaseollin se verificava em grandes quantidades.

Estes resultados vêm reforçar a nossa hipótese estabelecendo o phaseollin como a principal substância envolvida na interação de hipocótilos de feijoeiro e diferentes microrganismos mesmo porque, apesar de se verificar a formação de outras substâncias, o mesmo se encontra em quantidades apreciáveis e é uma das primeiras detectáveis.

As análises cromatográficas dos EE de sistemas radiculares mostraram grandes diferenças entre as plantas inoculadas e as não inoculadas. O conteúdo fenólico dos sistemas radiculares eram também qualitativamente diferentes daqueles encontrados em hipocótilos.

Nos EE de sistemas radiculares, verificou-se o aparecimento de duas substâncias fenólicas de Rf bastante próximos (0,68 e 0,70) e uma outra que fluoresce amarelo sob U.V., não reagindo para fenol (Rf 0,60). Estas substâncias não foram detectadas em sistemas radiculares não inoculados, mesmo quando estes foram submetidos a injúria de natureza mecânica no momento do transplante. A substância A descrita por CARDOSO (7) e o phaseollin não foram observados nos EE de tecidos de sistemas radiculares inoculados e não inoculados o que mostra existir uma resposta qualitativa diferente entre os dois tipos de tecido em questão. Estas diferenças entre os diversos EE po

de favorecer a nossa hipótese de que o phaseollin é a principal substância fenólica envolvida na reação dos tecidos de hipocótilos ao processo da doença, apesar de encontrarmos na literatura (13, 14 e 16) inúmeros trabalhos que mostram a formação de phaseollin em outros tecidos que não os de hipocótilos.

Nos diferentes períodos de coleta das plantas inoculadas observou-se também que a ação dos dois isolados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* foi sempre mais intensa nos sistemas radiculares que nos hipocótilos submetidos ao mesmo tratamento. BURKE (6), também trabalhando com plantas de feijoeiro inoculadas com *Fusarium*, demonstrou que este fungo ocasiona uma maior relação da produção quando causa podridão da raiz.

Nos bio-ensaios efetuados verificou-se que todos os extratos tiveram um efeito inibidor contra os fungos não patogênicos ao feijoeiro. Nos testes efetuados com os fungos patogênicos, as inibições se verificaram apenas com os EE de hipocótilos inoculados e os EE e EEP de sistemas radiculares inoculados. Entre os EEP obtidos de plantas inoculadas, apenas os de sistemas radiculares inoculados apresentaram atividade inibitória contra os fungos testados.

Os extratos EE de sistemas radiculares não inoculados apresentaram uma atividade inibitória bastante alta a fungos não patogênicos, o que demonstra a existência de substâncias pré-formadas, ou a sua formação em virtude dos ferimentos que as mesmas foram submetidas no processo de transplante.

Observando-se as concentrações de fenóis totais nos diversos extratos usados (Quadro 3) pode-se notar que no EEP de sistemas radiculares inoculados a concentração de fenóis é muito baixa sem, contudo, deixar de apresentar uma certa ação antibiótica, a que poderá ser consequência da presença da substância que fluoresce amarelo em U.V. e se situa no Rf 0,60 nas placas de cromatografia. Esta substância não aparece em sistemas radiculares não inoculados.

Em virtude dos fatos até aqui observados, podemos estabelecer algumas hipóteses sobre a maior suscetibilidade dos tecidos de sistemas radiculares que o de hipocótilos à ação do *Fusarium solani* f. *phaseoli*.

- 1 - A menor concentração de fenóis totais formados nos tecidos radiculares durante o estabelecimento do patogeno.
- 2 - Ausência de phaseollin nos tecidos de sistemas radiculares.
- 3 - Localização nos sistemas radiculares de uma maior concentração de inóculo, em virtude de uma grande superfície de contacto disponível.

De início podemos excluir as duas primeiras hipóteses estabelecidas, pois caso a maior resistência dos hipocótilos fosse condicionada pela maior concentração de fenóis totais ou à presença de phaseollin nestes tecidos, os resultados obtidos nos bio-ensaios teriam sido diferentes. Como pode-se observar no Quadro 3, o efeito do EEP de sistemas radiculares inoculados apresentou a mesma capacidade inibitória contra o *Fusarium solani* f. *phaseoli*, que o EE de hipocótilos inoculados, apesar destes últimos apresentarem uma concentração de fe-

nóis totais 16 vezes maior e também estar presente a substância denominada phaseollin.

Apesar da importância dada ao phaseollin como discutimos anteriormente, em virtude de ser a primeira a se formar em quantidades detectáveis, os nossos resultados não demonstram isto, podendo talvez serem consequência do método utilizado no bio-ensaio ou da variedade de feijoeiro utilizada.

Resta-nos portanto a terceira hipótese, como a mais viável para explicar a maior degradação dos tecidos de sistemas radiculares.

Como foi citado anteriormente, o método de inoculação utilizado neste trabalho, consistiu na imersão de hypocótilos e sistemas radiculares, pelo tempo de cinco minutos, numa suspensão de esporos e micélio dos fungos utilizados. Como pode-se observar, o uso deste método permite que uma maior quantidade de tecido de sistemas radiculares fiquem em contacto com os fungos concorrendo, portanto, para que uma maior quantidade de propágulos fiquem aderidos aos mesmos, verificando-se, portanto, a possibilidade de existirem penetrações nos tecidos, simultaneamente em vários pontos, o que, consequentemente, levaria a uma manifestação mais intensa da doença nestes tecidos, que nos tecidos de hypocótilos.

Pelos resultados obtidos podemos de imediato concluir que:

- 1 - As substâncias fenólicas encontradas em hipocótilos e raízes de feijoeiro inoculados e não inoculados são realmente qualitativamente diferentes.
- 2 - As concentrações de fenóis totais encontradas em hipocótilos e raízes inoculadas e não inoculadas são também diferentes.
- 3 - Os efeitos antibióticos dos diversos extratos testados forneceram respostas mais de natureza qualitativa que quantitativa.

6 - RESUMO

Hipocótilos e raízes de feijoeiros foram inoculados com dois isolados de *Fusarium solani* f. *phaseoli*. As plantas inoculadas apresentaram sintomas da doença que foram mais intensos quanto mais longo o período após a inoculação. As plantas não inoculadas, não apresentaram sintomas.

Hipocótilos e raízes das plantas inoculadas e não inoculadas foram usados para análises quantitativas e qualitativas de fenóis totais em diferentes períodos após a inoculação.

Os extratos etanólicos de hipocótilos e de raízes foram preparados com a extração de cinco hipocótilos na proporção de 1:4 (p:v) de etanol 95% p.a. Os fenóis totais foram determinados pelo método de Folin-Denis e os resultados expressos em equivalentes de ácido clorogênico por volume de extrato obtido e por peso seco de tecido.

A concentração de fenóis totais nos hipocótilos inoculados apresentaram um aumento contínuo quase até o final dos períodos, enquanto que em hipocótilos não inoculados não se verificou nenhum aumento em todos os períodos de coleta. Em sistema radicular inoculado, o aumento na concentração de fenóis verificou-se até o sexto dia, após a inoculação, sendo que, a partir desse dia, a mesma se tornou bastante irregular. Na relação da concentração de fenóis totais por peso seco de tecido extraído, as curvas apresentaram teores significativamente maiores.

Os extratos etanólicos de sistemas radiculares sadios, apresentaram teores bem elevados de fenóis totais.

Na análise qualitativa, em cromatografia de camada fina, dos extratos de hipocótilos inoculados, verificou-se a presença de duas substâncias que reagem intensamente para fenóis nos Rf 0,25 e 0,55 e uma outra muito fraca no Rf 0,40. Em sistemas radiculares inoculados, verificou-se reação para fenóis nos Rf 0,68 e 0,70, porém aparece também uma substância no Rf 0,60 que fluoresce amarelo em ultra-violeta e que não reage para fenóis. Esta substância não aparece em extratos de plantas sadias.

Quando foi feito o fracionamento, com éter de petróleo, do extrato etanólico de sistemas radiculares inoculados, verificou-se que esta substância migra para a fase éter quase que totalmente.

Os extratos etanólicos e os extratos de éter de petróleo de hipocótilos e de raízes inoculados e não inoculados, foram testados contra fungos patogênicos e não patogênicos ao feijoeiro.

Todos os extratos tiveram ação inibidora aos fungos não patogênicos ao feijoeiro. Entre os extratos éter de petróleo, apenas os de raízes inoculadas apresentaram atividade inibitória aos fungos patogênicos.

7 - SUMMARY

Hypocotyls and roots of bean plants were inoculated with two isolates of *Fusarium solani* f. *phaseoli*. The inoculated plants showed disease symptoms that were more severe at longer periods after inoculation. The non inoculated plants showed no symptoms.

Hypocotyls and roots of the inoculated plants were used for quantitative and qualitative analyses of total phenols at different periods after inoculations.

The ethanolic hypocotyl and root extracts were prepared from plants using a proportion of 1:4 (w:v) of 95% ethanol p. a. The total phenols were determined by the Folin Denis method and the results expressed as equivalents of chlorogenic acid per volume of extract or per dry weight of extracted tissues.

The concentration of total phenols in the inoculated hypocotyl extract increased with time, attaining a maximum 13 days after inoculations while in the non-inoculated hypocotyls the concentration was always very low even at the final periods.

In the inoculated roots the total phenol concentration increased up the 6th day after inoculation and at later periods it was very irregular. Expressing the total phenol content relative to the dry weight of plants, the curve showed significantly higher levels.

The extracts of healthy roots presented a high level of total phenols.

Root extracts of inoculated plants showed two substances (Rf 0,68 and 0,70) that reacted for phenols and another (Rf 0,60) that fluoresced yellow in ultraviolet light but which did not react for phenols. No such substances were found in healthy plant extracts.

When fractionating ethanolic extracts of roots of inoculated plants with petroleum ether this substance moved to in the ether phase.

All the extracts from inoculated and non-inoculated roots and hypocotyls were tested against pathogenic and non-pathogenic fungi. All the extracts presented inhibition of non-pathogenic fungi, while only the extracts of inoculated roots showed inhibition of pathogenic fungi.

- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 - ARMSTRONG, G. M. & K. ARMSTRONG - *Fusarium* wilt of bean in South Carolina and some host relations of bean *Fusarium*. Plant Disease Repr. 47: 1088-1091. 1963.
- 2 - BALMER, E. - Contribuição ao estudo das relações entre *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Syd. e Hans. e *Gossypium hirsutum* L. Tese de Doutorado apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 47 pg. 1967.
- 3 - BARNES, E. H. & WILLIAMS - Biochemical Response of Apple Tissues to Fungus Infection. Phytopathology 50: 844-846. 1960.
- 4 - BATEMAN, D. F. & J. M. DALY - The Respiratory Pattern of *Rhizoctonia* Infected Bean Hypocotyls in Relation to Lesion Maturation. Phytopathology 57: 127-131. 1967.
- 5 - BURKE, D. W. - *Fusarium* Root Rot of Beans and Behavior of the Pathogen in Different Soils. Phytopathology 55: 1112-1126. 1965.
- 6 - BURKE, D. W. & A. W. BARKER - Importance of Lateral Roots in *Fusarium* Root Rot of Beans. Phytopathology 56: 292-294. 1966.
- 7 - CARDOSO, C. O. N. - Accumulation of Phenols and Phytoalexins in Hypocotyls of Bean Infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Syd. & Hans. PhD. Thesis. Ohio University. 100 pg. 1971.

- 8 - CARDOSO, C. O. N. - Contribuição ao estudo das relações entre *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli* (Schlecht.) Kendr. e Snyder e *Phaseolus vulgaris* L. Tese de mestrado apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 48 pp. 1967.
- 9 - CHATTERJEE, P. - The Bean Root Rot Complex in Idaho. Phytopathology 48: 197-200. 1958.
- 10 - CONDON, P. & J. KUC - Isolation of a Fungitox Compound from Carrot Root Tissue Inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology 50: 267-270. 1960.
- 11 - CRUICKSHANK, J. A. M. & D. R. PERRIN - Phytoalexin of the Leguminosae. Phaseollin from *Phaseolus vulgaris* L. Life Science 8: 680-82. 1963.
- 12 - HADWIGER, L. A., S. L. HESS & S. von BROEMBSSEN - Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and phytoalexin production. Phytopathology 60: 332-336. 1970.
- 13 - HESS, S. L. & M. E. SCHWOCHAU - Induction, purification and biosynthesis of phaseollin in excised pods of *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 59: 1030 (Abstr.). 1969.
- 14 - HESS, S. L., L. A. HADWIGER & M. E. SCHWOCHAU - Studies on biosynthesis of phaseollin in excised pods of *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 61: 79-82, 1971.
- 15 - MICHELE, C. HEATH & VERA S. HIGGINS - In vitro and in vivo conversion of Phaseollin and Pisatin by an Alfalfa pathogen *Stemphylium botryosum*. Physiological Plant Pathology 3: 107-120. 1973.

- 16 - MULLER, K. O. - Studies of Phytoalexins. 1 - Deformation and Immunological Significance of Phytoalexins Produced by *Phaseolus vulgaris* L. in: Response to Infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. Australian J. Biol. Sci. 2: 275-300 , 1958.
- 17 - MUSUMECTI, R. M. & M. B. FIGUEIREDO - Microtécnica para ensaios biológicos com substâncias inibidoras do crescimento de fungos. VII Cong. Soc. Bras. de Fitopatologia. Brasília, DF. 1974.
- 18 - NASH, S. M. & M. C. SNYDER - Comparative Ability of Pathogenic and Saprophytic *Fusaria* to colonize Primary Lesions. Phytopathology 57: 293-296 , 1967.
- 19 - PIERRE, R. E. - Histopathology and phytoalexins induction in bean resistant or susceptible to *Fusarium* and *Thielaviopsis*. PhD. Thesis. Cornell University. 155 pp. Univ. Microfilms Inc. Ann. Arbor Michigan. 1966.
- 20 - PIERRE, R. E. & D. F. BATEMAN - Induction and distribution of phytoalexins in *Rhizoctonia* infected Bean Hypocotyls. Phytopathology 57: 1154-1160. 1967.
- 21 - PIERRE, R. E. - Phytoalexin Induction in Bean Resistant or Susceptible to *Fusarium* and *Thielaviopsis* . Phytopathology 61: 322-327 , 1971.

- 22 - ROMANOWSKI, R. O. , J. KUC & F. W. QUACKENBUSH - Biochemical changes in Seedlings of Bean-Infected with *Colletotrichum lindemuthianum* . Phytopathology 52: 1259-1263 , 1962.
- 23 - SWAIN, T. & W. A. HILLS - Phenolics constituents of *Prunus domestica* L. J. Sci. Food Agric. 10: 65-68. 1959.
- 24 - TOUSSOUN, T. A. & P. E. NELSON - A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 51 pp. 1968.
- 25 - VAN ETEN, H. D. , D. P. MAXWELL & D. F. BATEMAN - Lesion Maturation, Fungal Development and Distribution of Endopolygalacturonase and Cellulase in *Rhizoctonia* - Infected Bean Hypocotyls Tissues. Phytopathology 57: 121-126. 1967.
- 26 - VAN ETEN, H. D. & D. F. BATEMAN - Isolation of Phaseollin from *Rhizoctonia* - Infected Bean Tissue. Phytopathology 60: 385-386. 1970.
- 27 - VAN ETEN, H. D. & D. F. BATEMAN - Accumulation of Phytoalexins in Beans Hypocotyls with *Rhizoctonia solani* . Congresso Internacional da Soc. Inter-Americana de Fitopatologia. Anais. 1973.
- 28 - VAN ETEN, H. D. - Accumulation of Anti-Fungal Isoflavonoids in Beans Hypocotyls Infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* . Congresso Internacional da Soc. Inter-Americana de Fitopatologia. Anais. 1973.

- 29 - WELLMAN, F. L. - Technic for studing host resistance pathogeni-
city in Tomato *Fusarium* wilt. Phytopathology 29: 945-
956. 1939.

9 - A N E X O S

QUADRO I - Fenóis Totais nos EE de Hipocótilos de Feijoeiro Inoculados e Não Inoculados com os Isolados 002 e 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli* mg/ml de extrato

Períodos após Inoculação em dias	Inoculado 002	Inoculado 003	Não Inoculados
2	0,072	0,023	0,025
	0,049	0,031	0,023
	---	0,040	0,023
4	0,218	0,098	0,021
	0,151	0,151	0,023
	0,130	0,151	0,023
6	0,350	0,336	0,018
	0,280	0,030	0,019
	0,312	0,320	0,019
8	0,297	0,410	0,024
	0,360	0,330	0,025
	0,460	0,410	0,019
10	0,414	0,644	0,034
	0,468	0,504	0,031
	0,528	0,574	0,043
12	0,301	0,608	0,033
	0,490	0,552	0,037
	0,546	0,624	0,049

(continua...)

QUADRO I - Continuação

Períodos após Inoculação em dias	Inoculado 002	Inoculado 003	Não Inoculados
	0,404	0,508	0,025
14	0,560	0,477	0,037
	0,484	0,567	0,035
	0,441	0,530	0,054
16	0,508	0,545	0,025
	0,441	0,860	0,033
	0,574	0,675	0,035
18	0,490	0,630	0,035
	0,670	0,810	0,018
	0,648	0,810	0,031
20	0,792	0,650	0,033
	0,621	0,585	0,031
	0,756	0,585	0,031
22	0,630	0,567	0,023
	0,648	0,508	0,031
	0,171	0,880	0,023
24	0,207	0,567	0,035
	---	0,920	0,033
	0,544	0,405	0,027
26	0,585	0,508	0,023
	---	0,792	0,021

QUADRO II - Fenóis Totais nos EE de Raízes de Feijoeiro Inoculados e Não Inoculados com os Isolados 002 e 003 de *Fusarium solani* f. *phaseoli* mg/ml de extrato

Períodos após Inoculação em dias	Inoculado 002	Inoculado 003	Não Inoculados
2	0,069	0,076	0,053
	0,069	0,056	0,065
	0,049	0,041	0,059
4	0,101	0,086	0,049
	0,090	0,094	0,059
	0,109	0,098	0,053
6	0,086	0,163	0,045
	0,098	0,163	0,043
	0,121	0,169	0,040
8	0,072	0,076	0,069
	0,092	0,116	0,054
	0,124	0,164	0,031
10	0,064	0,082	0,138
	0,100	0,108	0,117
	0,092	0,098	0,123
12	0,058	0,108	0,162
	0,084	0,134	0,174
	0,078	0,100	0,138

(continua...)

QUADRO II - Continuação

Períodos após Inoculação em dias	Inoculado 002	Inoculado 003	Não Inoculados
	0,058	0,062	0,098
14	0,088	0,108	0,108
	---	0,124	0,087
	0,054	0,074	0,078
16	0,062	0,106	0,092
	0,080	0,080	0,140
	0,050	0,113	0,058
18	0,067	0,113	0,075
	0,086	0,082	0,043
	0,105	0,147	0,054
20	0,093	0,111	0,062
	0,135	0,105	0,067
	0,043	0,087	0,074
22	0,100	0,120	0,074
	0,054	0,135	0,070
	0,019	0,880	0,050
24	0,021	0,113	0,067
	---	0,121	0,090
	0,099	0,046	0,058
26	---	0,086	0,032
	0,078	0,050	0,029