

INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM FEIJOEIRO
POR DIFERENTES PATÓGENOS

CARLOS ROBERTO PIEROBOM

Orientador: CAIO O. N. CARDOSO

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

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

1977

À

Meus pais,

esposa,

e filhas

dedico

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul.

Ao Dr. Caio O. N. Cardoso pela orientação e revisão dos originais.

Ao Prof. Gilberto C. Luzzardi pelo estímulo e apoio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

INDICE

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Fitoalexinas e Fenóis associados com feijoeiro.	3
2.2. Produção de <i>Phaseollin</i> em função do tempo	5
2.3. Bioensaios utilizados no estudo de fitoalexinas	5
2.4. Objetivos	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Organismos e técnicas de inoculação	8
3.2. Método de extração	9
3.3. Épocas de extração	9
3.4. Caracterização dos extratos	11
3.5. Purificação dos componentes fenólicos dos ex tratos	12
3.6. Estudos sobre o efeito inibidor das substâncias purificadas	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Caracterização das substâncias fenólicas	16
4.2. Efeito inibidor das substâncias purificadas...	18
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	27
7. SUMMARY	28
8. LITERATURA CITADA	29

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
TABELAS	
1. Fenóis totais nos extratos de hipocótilos de feijoeiro infectados	17
2. Fenóis totais nos extratos de hipocótilos de feijoeiro infectados	17
3. Efeito das substâncias fenólicas purificadas sobre a alongação de tubo germinativo e germinação de esporos de fungo patogênico e não patogênico ao feijoeiro	22
FIGURAS	
1. Método de extração	10
2. Aparelho utilizado para eluição de substâncias fenólicas das placas de Cromatografia de Camada Delgada	13
3. Esquema de Cromatograma de Camada Delgada das substâncias fenólicas extraídas de hipocótilos infectados	19
4. Espectro UV das substâncias fenólicas de Rf 0,35 purificadas por cromatografia	20
5. Espectro UV das substâncias fenólicas de Rf 0,65 purificadas por cromatografia	21

1. RESUMO

A produção de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro infectados por *Fusarium solani* f. *phaseoli* e por *Rhizoctonia solani* foi estudada, em plantas da variedade "Carioca".

Duas fitoalexinas caracterizadas, uma por apresentar Rf 0,35 no sistema de Cromatografia de Camada Fina (CCF) de Hedin, fluorescer sob UV e possuir um pico de absorção de UV a 280 nm e, a outra, por apresentar Rf 0,65 no referido sistema CCF, absorver UV e possuir picos a 280 e 315 nm no espectro de absorção de UV, foram extraídas de ambos sistemas patógeno-hospedeiro.

Através de CCF, absorção de UV e testes de inibição sobre fungos verificou-se que o feijoeiro produz as mesmas fitoalexinas, na mesma sequência, independentemente do patógeno utilizado como indutor.

2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

MÜLLER (1958) estabeleceu os conceitos básicos sobre as substâncias resultantes da interação entre hospedeiro e patógeno, e que chamou de fitoalexinas em alusão a seu carácter de reação defensiva.

A partir de então diversos autores dedicaram-se ao estudo de fitoalexinas e compostos fenólicos e, em feijoeiro, existem relatos de sua indução por fungos patogênicos, não patogênicos e por compostos orgânicos e minerais.

CARDOSO (1971) demonstrou que as substâncias fenólicas encontradas em tecido doente de feijoeiro podem ser utilizadas como parametro para medir a severidade da doença e para estudos sobre patogenicidade e variabilidade dos fungos.

Comparando-se os dados obtidos por PIERRE e BATEMAN (1967) e VAN ETEN e BATEMAN (1970), que utilizaram o sistema *Phaseolus vulgaris* L. - *Rhizoctonia solani* Kühn, com os obtidos por CARDOSO (1971), no sistema *P. vulgaris*-*Fusarium*

solani f. *phaseoli* (Burk) Syd. e Hans., observa-se que existem discordâncias em certas características dos compostos fenólicos isolados. O presente trabalho visa esclarecer a possibilidade dessas diferenças serem devidas aos sistemas patógeno-hospedeiro.

Os aspectos encontrados na literatura, de interesse mais direto para o trabalho, são sumarizados a seguir.

2.1. Fitoalexinas e fenóis associados com feijoeiro

CRUICKSHANK e PERRIN (1963) demonstraram que uma suspensão de conídios de *Monilinia fructicola*, depositada em cavidade de sementes de vagens destacadas de feijoeiro, induz a produção de um composto com propriedades antifúngicas. O composto foi cristalizado e identificado como fenol e recebeu o nome de *phaseollin*. Os autores verificaram também que a concentração de *phaseollin* necessária para causar uma redução de 50 % no crescimento micelial de *M. fructicola*, fungo não patogênico ao feijoeiro, foi de 3 ug por ml de meio agar, enquanto que para *Colletotrichum lindemuthianum*, patogênico ao feijoeiro, foi de 50 ug por ml de meio. *Phaseollin* revelou um espectro de absorção com máximos a 279, 286 e 315 nm.

Em 1967, usando hipocotilos de feijoeiro inoculados com *R. solani*, PIERRE e BATEMAN (1967) verificaram que além da formação de *phaseollin* (com picos de absorção a 279, 286 e 315 nm) ocorria a formação de outra substância com ca

racterísticas de fitoalexina (substância II) a qual apresentava apenas um pico de absorção a 288 nm.

A presença de *phaseollin*, com picos de absorção de UV a 279, 286 e 315 nm, e substância II, com apenas um pico a 288 nm, em vagens de feijoeiro inoculadas com *F. solani* f. *phaseoli* e *Thielaviopsis basicola* é também relatada por PIERRE (1971).

VAN ETEN e BATEMAN (1970), utilizando *phaseollin* extraído de hipocótilos de feijoeiro inoculado com *R. solani* demonstraram que o sistema de cromatografia em camada fina (CCF) desenvolvido por Hedin e outros é adequado para o isolamento de *phaseollin* em pequenas quantidades. Neste sistema de cromatografia *phaseollin* apresenta um Rf de 0,34 e pode ser localizada com reagentes usuais para detecção de fenóis ou pelo uso de luz ultra violeta de comprimento de onda curto.

HESS et alii (1971) localizaram *phaseollin* em placas de CCF através de pulverização com cloreto férrico a 3 % em metanol e afirmam que a coloração vermelha desenvolvida após aquecimento é específica de *phaseollin*.

CARDOSO (1971) observou a presença de três substâncias fenólicas em hipocótilos de feijoeiro inoculado com *F. solani* f. *phaseoli*. A primeira, substância A, apresenta um espectro de absorção com apenas um pico a 280 nm, no sistema de cromatografia de Hedin situa-se em Rf 0,35 e fluoresce sob luz UV. A segunda, substância B, com um espectro de absorção com picos a 280 e 315 nm, situa-se em Rf 0,65 e absorve

luz UV de comprimento de onda curto. A substancia B reage com cloreto fêrrico produzindo coloração vermelha após leve aquecimento. A substância A apresenta, com este reagente uma coloração muito leve. A terceira substância, com apenas um máximo de absorção a 280 nm, praticamente não se desloca da linha de origem no referido sistema de cromatografia.

HEATH e HIGGINS (1973), em estudos sobre a de gradação de *phaseollin* por *Stemphylium botryosum*, relatam a localização de *phaseollin* em Rf 0,59 no sistema CCF de Hedin, absorvendo luz UV de comprimento de onda curto.

2.2. Produção de phaseollin em função do tempo

Phaseollin é continuamente acumulada em hipocotitos de feijoeiro infectados com *R. solani* ou com *F. solani* f. *phaseoli*, pelo menos até 12 dias após a inoculação (CARDOSO, 1971 e VAN ETEN e BATEMAN, 1970).

2.3. Bioensaios utilizados no estudo de fitoalexinas

Diversos são os métodos que tem sido utilizados para testar a atividade antibiótica de fitoalexinas sobre fungos.

PIERRE (1971), utilizou os métodos de discos de agar e de suspensão de esporos em caldo nutritivo. No primeiro, discos de agar contendo esporos adicionados antes da solidificação, são colocados em pequenos vidros de relógio contem

do a substância a ser testada. No segundo método a substância a ser testada é colocada em quantidades determinadas sobre vidros de relógio e evaporada. A suspensão de esporos em caldo nutritivo é então adicionada ao vidro de relógio contendo os resíduos de evaporação. Em ambos os métodos a avaliação é feita através do crescimento do tubo germinativo.

Na avaliação da eficiência de inibição de *Phaeo* e substância II contra *R. solani*, PIERRE e BATEMAN (1967) usaram o teste de crescimento micelial. A substância a ser testada, dissolvida em etanol é adicionada a placas de petri de 5 cm ou erlenmeyers de 50 ml e evaporada. Um volume de 0,1 ml de etanol é adicionado a cada 3,0 ml de meio sólido ou líquido para favorecer a distribuição e solubilização da fitoalexina. Após a repicagem e incubação do organismo teste, a avaliação foi efetuada pelo diâmetro de colônias, em meios sólidos, e peso seco de micélio, em meios líquidos.

CARDOSO (1971), utilizou a incorporação de esporos e da substância a ser testada em meio sólido, antes da solidificação. A suplementação do meio (agar-água 1%) foi feita a 45°C, com o auxílio de um agitador magnético, na proporção de 0,5 ml de etanol contendo diferentes concentrações de substâncias fenólicas para cada 100 ml de meio. Em placas de petri contendo 1,0 ml de suspensão de esporos foram vertidos 6,0 ml de meio suplementado com extrato. A distribuição homogênea dos esporos foi obtida por agitação rotativa das placas antes da solidificação do meio.

Um método de ensaio biológico de substâncias inibidoras de crescimento de fungos, idealizado para o emprego de pequenas quantidades de produtos, foi descrito por MUSUMECI e FIGUEIREDO (1974) consiste em adaptação de técnica comumente empregada para testes sorológicos de dupla difusão em agar. Lâminas de vidro, de microscopia, esterilizadas, são recobertas por meio de cultura, aseticamente, com o auxílio de uma pipeta. Após a solidificação são efetuados orifícios no agar, com cerca de 3,0 milímetros de diâmetro, segundo esquema pré-estabelecido. As substâncias a serem testadas são colocadas nos orifícios, em volumes conhecidos, e, após a difusão das substâncias para o agar, os organismos testes são repicados através de suspensão de esporos ou discos de meio de cultura com o mesmo diâmetro dos orifícios. O efeito inibidor é determinado pelo diâmetro da colônia. O método, além de utilizar pequenas quantidades de soluções, apresenta a vantagem de que as lâminas após coradas e fixadas podem ser arquivadas ou mesmo serem utilizadas como negativo fotográfico.

2.4. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo verificar se diferentes patógenos podem induzir, em um mesmo hospedeiro, diferentes fitoalexinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organismos e técnica de inoculação

Feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade "Carioca", com 7 dias de idade, obtidos de semeadura em vasos com areia lavada e esterilizada, foram inoculados com *Rhizoctonia solani* Kühn ou com *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Snyd. & Hans.

O inóculo de *F. solani* f. *phaseoli* constituiu de suspensão de conídios e micélio. O fungo foi cultivado por 7 dias sob agitação em meio constituído por solução de Hoagland suplementada com 1 % de sacarose. As culturas foram homogeneizadas em liquidificador e a suspensão assim obtida foi diluída em igual volume de solução de Hoagland.

O inóculo de *R. solani* foi preparado a partir de micélio obtido por cultivo durante sete dias em erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio, constituído por decocto de 200 g de batatas acrescido de 10 gramas de sacarose por

litro de água. A massa micelial assim obtida foi separada por filtração e ressuspensa em solução de Hoagland por agitação durante três minutos em liquidificador, na proporção de um litro de solução por massa de um frasco de cultura.

A inoculação foi feita por irrigação com 200 ml de suspensão de inóculo por vaso com 10 plantas. As parcelas testemunhas receberam igual volume de solução de Hoagland.

Os isolados de *F. solani* f. *phaseoli* e *R. solani* utilizados foram obtidos da coleção do Dr. Caio O. N. Cardoso e o isolado de *F. moniliforme* utilizado nos testes de inibição foi isolado de milho.

3.2. Método de extração

O método de extração de fenóis utilizado no presente estudo é, basicamente, o descrito por VAN ETEN e BATEMAN (1970) e é apresentado em detalhes na Figura 1.

O tecido do hospedeiro utilizado para a extração foi secções de hipocotilos delimitados pela linha do solo e pelo início das raízes. O peso fresco das secções e o peso seco do resíduo posterior a extração foram determinados.

3.3. Épocas de extração

Os extratos em éter de petróleo, processados segundo o esquema da Figura 1 foram obtidos de hipocotilos de

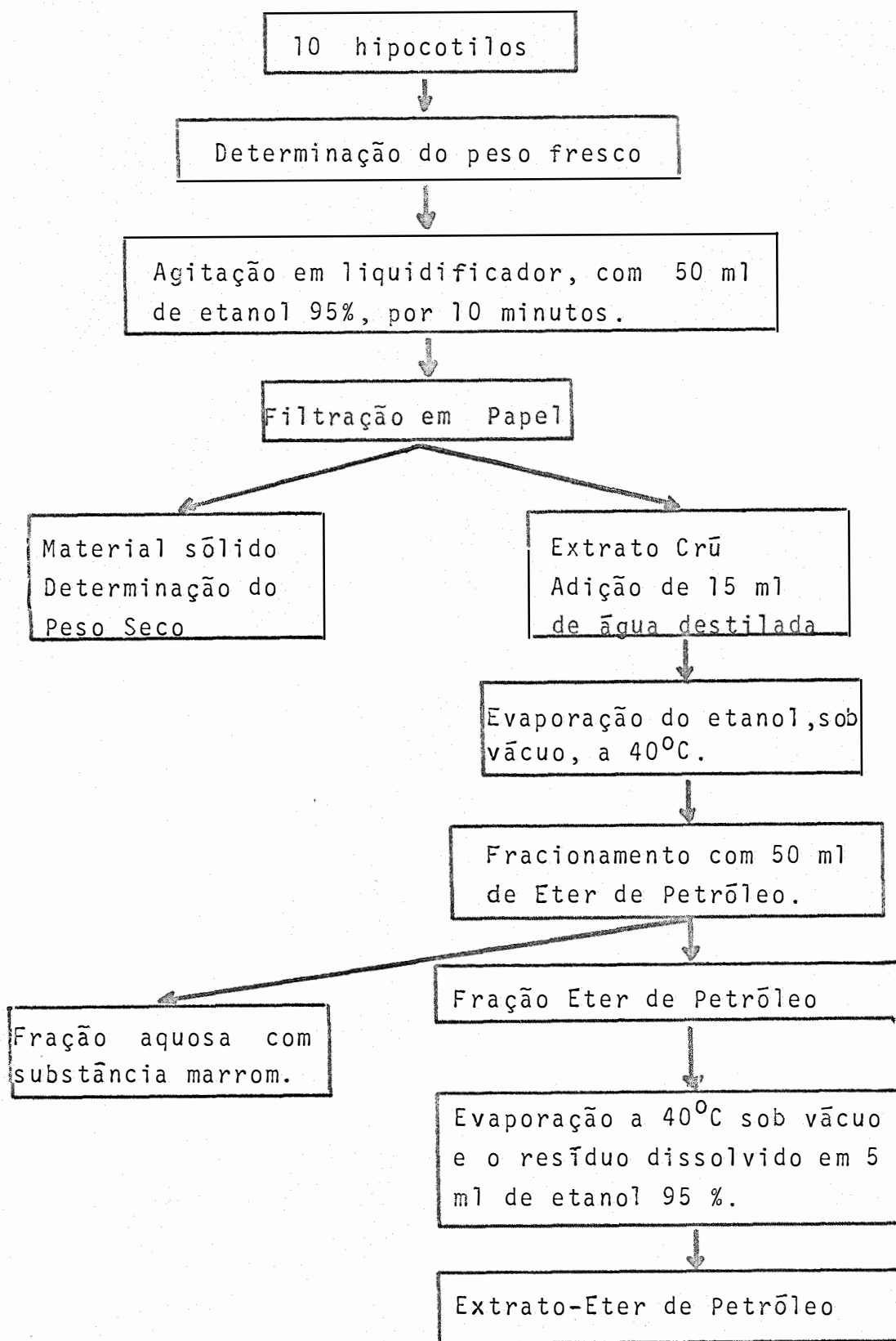


Fig. 1. Método de extração

feijoeiro colhidos com 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação. Em ambos sistemas patógeno-hospedeiro as extrações foram realizadas em três repetições para cada época, usando-se 10 hipocótilos em cada amostra.

3.4. Caracterização dos extratos

O teor de fenóis totais dos extratos foi determinado pelo método Folin-Denis modificado, descrito por SWAIN e HILLIS (1959). Aliquotas de 0,5 ml dos extratos foram usadas e comparadas com igual volume de soluções conhecidas de ácido clorogênico. A densidade ótica (D.O.) a 725 nm das soluções processadas foi medida em Espectrofotômetro (Spectronic 20). Esses valores foram correlacionados com a curva padrão de ácido clorogênico e são mencionados como equivalentes miligramas de ácido clorogênico (Eq mg AC) por unidade de peso seco de tecido extraído ou equivalente micrograma (Eq ug AC) de ácido clorogênico por planta.

O espectro ultravioleta dos extratos em eter de petróleo foi determinado em espectrofotômetro Beckman DB, adaptado a um registrador, tendo sido observada a faixa de comprimento de onda entre 340 e 240 nm.

A separação dos compostos fenólicos dos extratos foi efetuada por cromatografia. O sistema CCF utilizado foi essencialmente o de Hedin, descrito por VAN ETEN e BATEMAN (1970) como adequado para a detecção de *phaseollin*. Sili

ca gel G (E. Marck Co.) com 250 micra de espessura foi utilizada como suporte e, pentano; éter etílico; ácido acético (75:25:1) como sistema de solventes. Os componentes dos extratos foram detectados por visualização sob luz ultra violeta e pelo uso de reagentes para fenóis como cloreto férrico-ferrocianeto de potássio e cloreto férrico a 3 % em metanol.

3.5. Purificação de componentes fenólicos dos extratos

Alguns compostos fenólicos presentes nos extratos de hipocotilos de feijoeiro infectados foram separados por CCF e posteriormente eluídos. A eluição consistiu em raspagem da sílica no local em que a substância foi detectada e o seu recolhimento em etanol a 95 %. Para essa operação foi utilizado, com pequenas modificações, o aparelho desenvolvido por CARDOSO (1971), que consiste de um kitassato ligado a uma bomba de vácuo com entrada de ar através de um tubo de Teflon cuja extremidade interna fica imersa no solvente. (Figura 2). A sílica gel é separada do etanol e dos componentes solúveis em etanol por centrifugação.

O espectro de absorção de UV das substâncias eluídas foi determinado com espectrofotômetro Beckmann BD contra um branco de sílica gel. Esse branco foi obtido pelo processamento de áreas com o mesmo Rf de placas de CCF que foram desenvolvidas no mesmo sistema de solventes, porém sem terem recebido qualquer amostra. O espectro foi determinado den

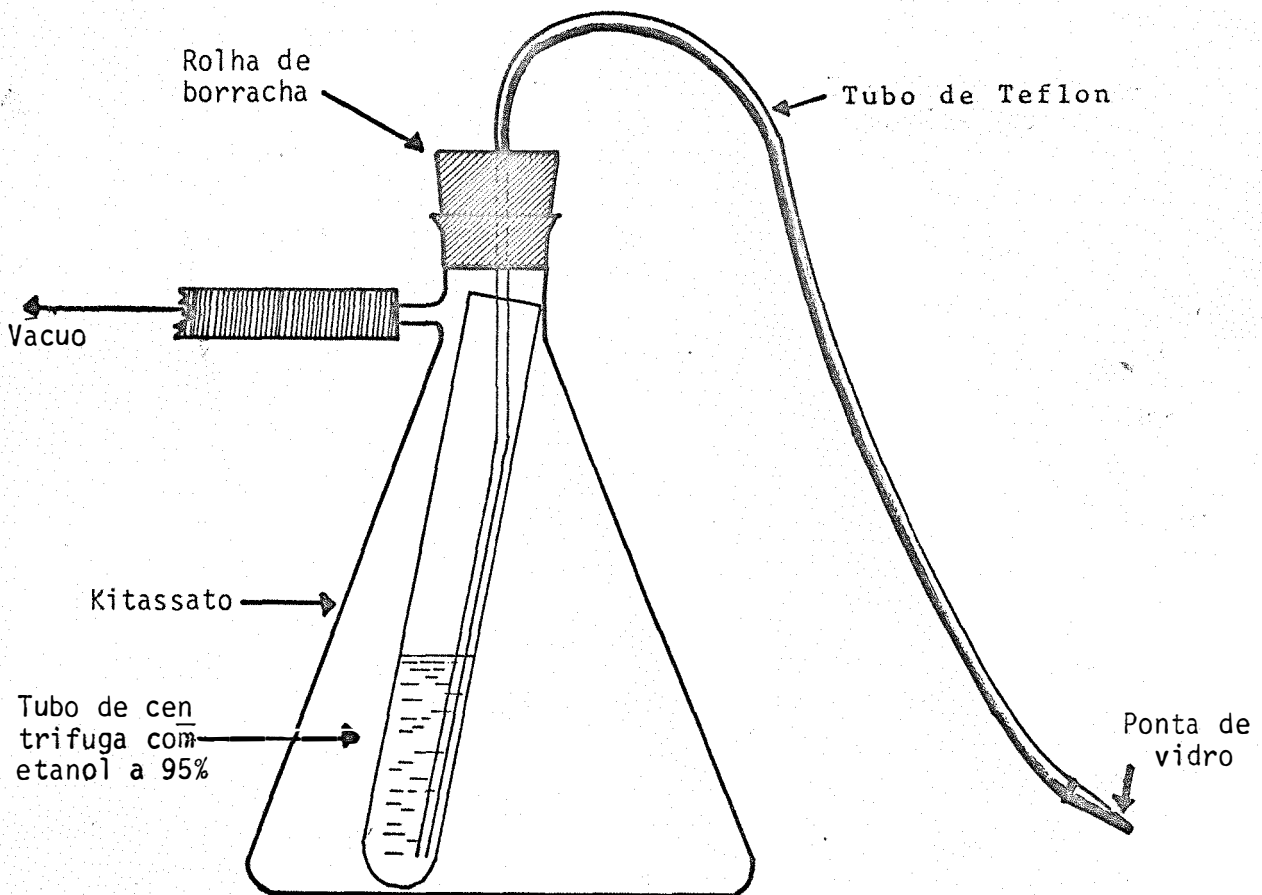


FIGURA 2 - Aparelho utilizado para eluição de substâncias fenólicas das placas de Cromatografia de Camada Delgada.

tro da faixa de 240 a 340 nm de comprimento de onda.

3.6. Estudos sobre o efeito inibidor das substâncias purificadas

Para o estudo do efeito inibidor sobre germinação de esporos e crescimento de tubo germinativo foram utilizados extratos de hipocotilos colhidos 12 dias após a inoculação. Um milímetro de extrato em éter de petróleo foi distribuído na linha de origem de placa de CCF. Após o desenvolvimento do cromatograma as substâncias desejadas foram visualizadas sob luz UV e demarcadas na sílica. Assim, as faixas compreendidas entre Rf 0,3-0,4 e 0,6-0,7, foram raspadas pelo processo já descrito e eluídas em etanol. Para as provas em branco, placas que não receberam substância alguma na linha de origem foram desenvolvidas no mesmo sistema e tiveram as mesmas faixas raspadas e eluídas em etanol. A sílica gel foi separada das substâncias eluídas em etanol por centrifugação. O etanol foi então evaporado e o resíduo ressuspensado em um mililitro de etanol, restaurando a concentração anterior.

As amostras de substâncias de mesmo Rf, independente do sistema patógeno-hospedeiro, tiveram sua D.O. determinada em espectrofotometro e foram diluídas de forma que todas apresentassem a mesma D.O. da amostra menos concentrada. Assim, as substâncias de Rf 0,35 tiveram sua concentração i

gualada em D.O. 0,135, correspondente na curva padrão de ácido clorogênico a 13,5 Eq ug AC/ml e as de Rf 0,65 em D.O. 0.240 correspondente a 24,0 Eq ug AC/ml.

Para o teste de inibição as substâncias purificadas e os esporos do fungo foram adicionados, antes da solidificação a agar-água. Para garantir uma distribuição homogênea, tanto dos esporos como da substância a ser testada, 0,1 ml de suspensão de esporos e 10 microlitros da solução etanólica contendo a fitoalexina foram adicionados a 3,0 ml de agar-água a 1 %, mantidos em banho-maria a 42⁰C. Imediatamente após a adição dos esporos e da substância a ser testada o tubo de ensaio era agitado em agitador de tubos e vertido sobre lâmina de vidro previamente esterilizada.

As lâminas assim preparadas foram mantidas em placa de petri sobre papel de filtro umedecido durante 18 horas a 28⁰C. Após esse período foram regadas com Lactofenol com Azul de Algodão, visando a paralização do crescimento, e efetuadas as medições e contagens de esporos germinados. As medições de comprimento de tubos germinativos foram efetuadas com ocular micrométrica aferida através de lâmina com escala.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das substâncias fenólicas

Os teores totais de fenóis em hipocotilos de feijoeiros aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação com *R. solani* e *F. solani* f. *phaseoli* e da testemunha não inoculada, são apresentados em equivalentes microgramas de ácido clorogênico por hipocotilo na Tabela 1 e em equivalentes miligramas de AC por grama de tecido seco na Tabela 2.

Através de CCF, sistema de Hedin, foi verificada entre outras a presença de substâncias com reação para fenóis em Rf 0,35 e 0,65, em extrato de ambos sistemas patógeno-hospedeiro. As substâncias que se apresentam em Rf 0,35 fluorescem sob UV e as de Rf 0,65 absorvem UV. Nos extratos obtidos de hipocotilos com três dias após a inoculação apenas a substância que apresenta em Rf 0,65 foi facilmente visualizada através de reagentes. A substância de Rf 0,35 somente foi visualizada após o sexto dia. Os extratos da testemunha não ino

Tabela 1. Fenóis totais nos extratos de hipocótilos de feijoeiros infectados e sadios.

Dias após a inoculação	Equivalentes ug AC/hipocótilo*		
	Testemunha não inoculada	Infectado p/ <i>F.s.f. phaseoli</i>	Infectado p/ <i>R.solani</i>
3	0,33	3,83	3,67
6	0,36	8,83	6,83
9	0,50	16,83	13,17
12	0,63	23,33	22,50

* média de 3 repetições

Tabela 2. Fenóis totais nos extratos de hopocótilos de feijoeiros infectados e sadios.

Dias após a inoculação	Equivalente mg AC/g tecido seco*		
	Testemunha não inoculada	Infectado p/ <i>F.s.f. phaseoli</i>	Infectado p/ <i>R.solani</i>
3	0,053	0,445	0,502
6	0,051	0,817	0,879
9	0,060	1,480	1,322
12	0,059	1,422	1,390

* média de 3 repetições

culada não apresentaram compostos com reação fenólica. A Figura 3 apresenta o esquema de um cromatograma dos extratos obtidos de hipocótilos de feijoeiro inoculados com *R. solani* e com *F. solani f. phaseoli*, aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação.

O espectro de absorção de UV das substâncias fenólicas purificadas por CCF, extraídas tanto do sistema *P. vulgaris* x *R. solani* como do *P. vulgaris* x *F. solani f. phaseoli*, é apresentado nas Figuras 4 e 5. Independentemente dos sistemas patógeno-hospedeiro de que foram extraídas, as substâncias de Rf 0,65 apresentaram dois picos de absorção, um a 280 e outro a 315 nm. As substâncias de Rf 0,35, também em ambos sistemas apresentaram apenas um pico a 280 nm.

4.2. Efeito inibidor das substâncias purificadas

O efeito das substâncias separadas por CCF sobre germinação e alongação do tubo germinativo de esporos de fungo patogênico e não patogênico ao feijoeiro é apresentado na Tabela 3. A análise estatística dos dados revelou que a alongação do tubo germinativo de esporos de *F. solani f. phaseoli* fungo patogênico ao feijoeiro, não foi reduzida pelas substâncias testadas, ao passo que, esporos de *Fusarium moniliforme* não patogênico, tiveram o crescimento do tubo germinativo reduzido, de forma significativa ao nível de 1 % de probabilidade, quando comparado com crescimento nos tratamentos água,

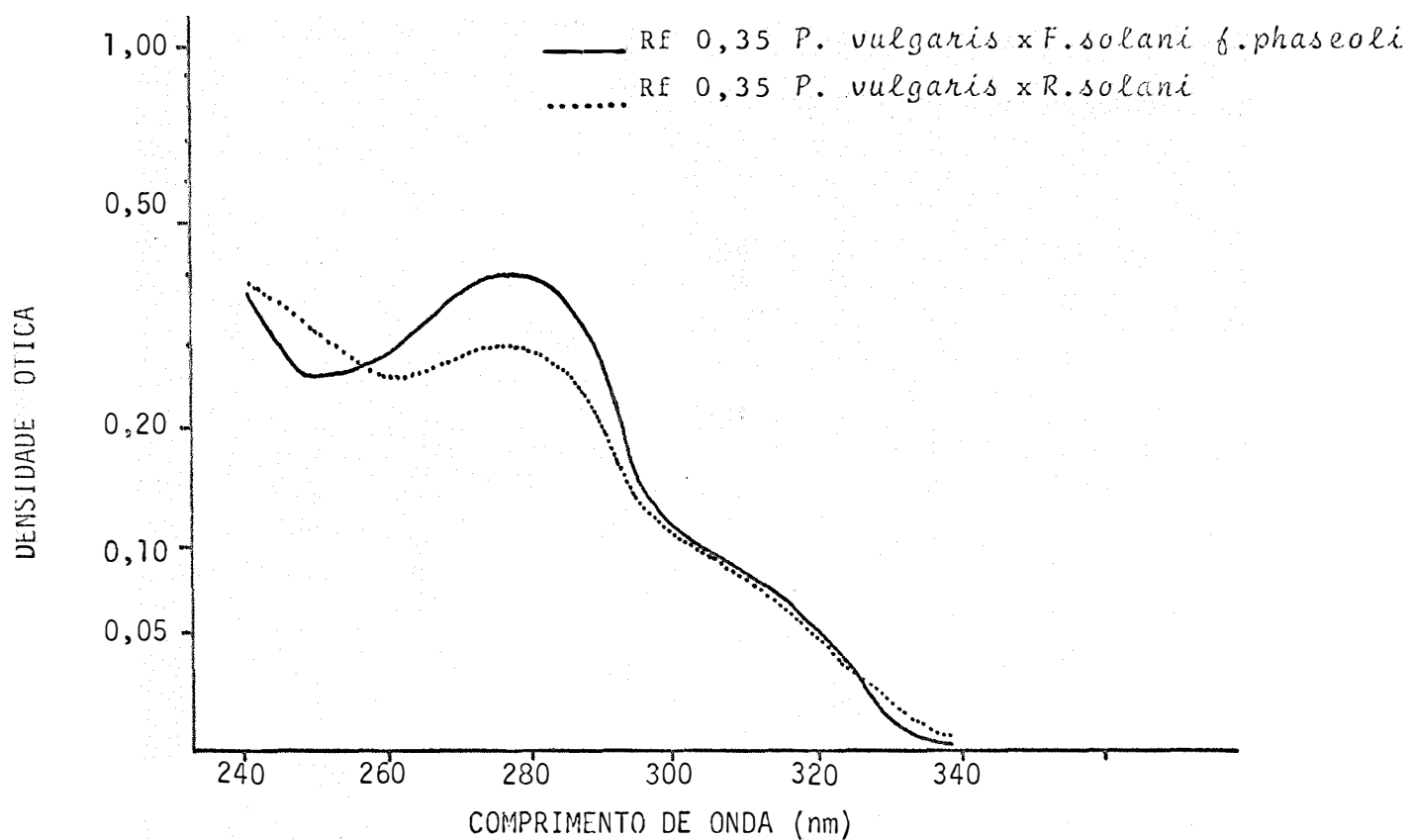


FIGURA 4.. Espectro UV das substâncias fenólicas de Rf 0,35
obtidas por cromatografia.

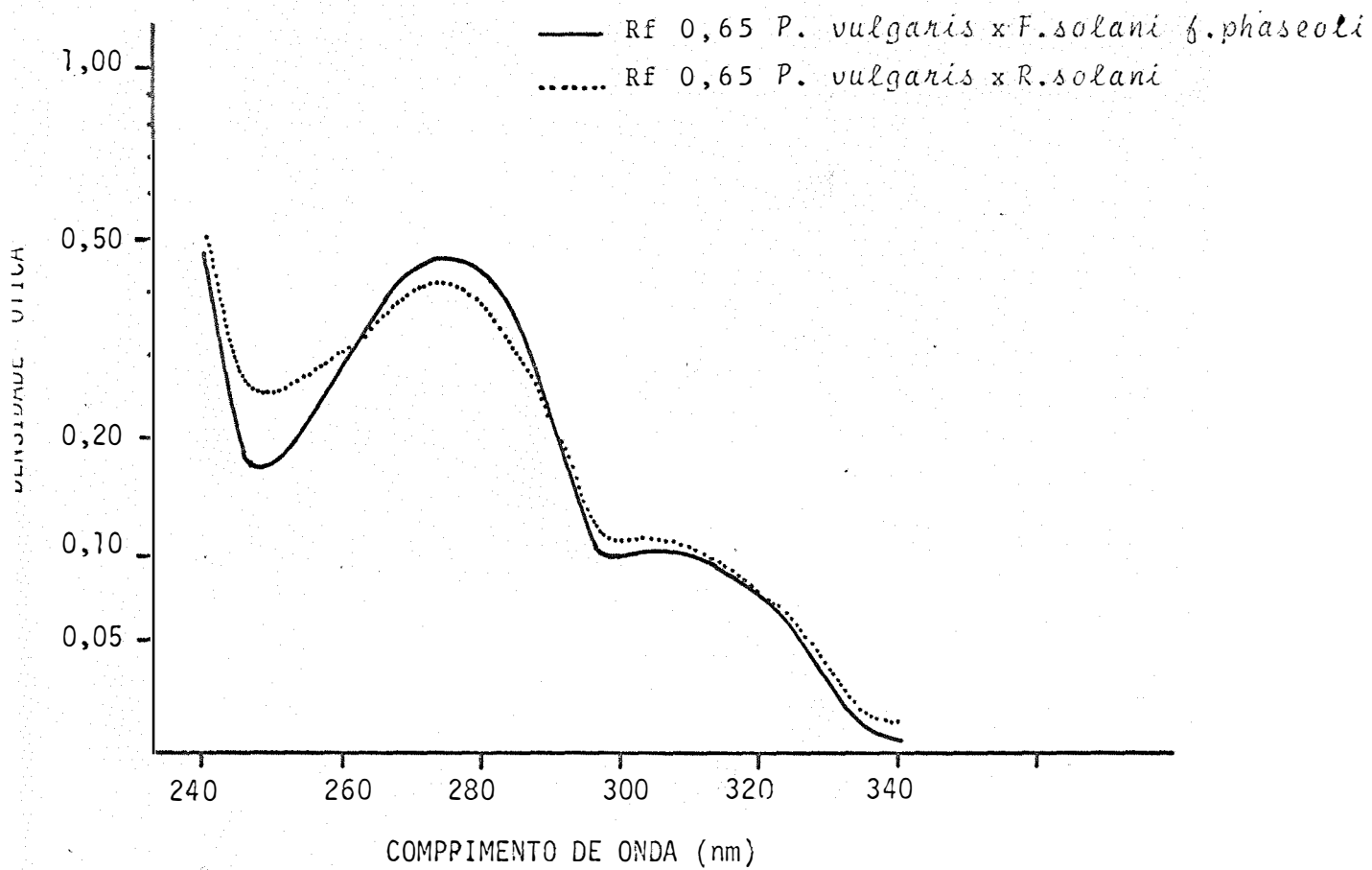


FIGURA 5. Espectro UV das substâncias fenólicas de Rf 0,65, purificadas por cromatografia.

Tabela 3. Efeito das substâncias fenólicas purificadas sobre a elongação de tubo germinativo e germinação de esporos de fungo patogênico e não patogênico ao feijoeiro.

Soluções	Comprimento do tubo germinativo (nm)*		Porcentagem de germinação*
	<u>F.solani</u> f. <u>phaseoli</u>	<u>F.moniliforme</u>	
Etanol	292 a	98 a	70,40 a
Água	266 a	115 a	74,86 a
Branco Rf 0,35	277 a	110 a	87,10 a
Branco Rf 0,65	274 a	111 a	82,53 a
(<u>F.s.p.</u> x <u>Phaseolus</u> v.)Rf 0,35	326 a	78 b	88,13 a
(<u>F.s.p.</u> x <u>Phaseolus</u> v.)Rf 0,65	330 a	65 b	84,06 a
(<u>R.s.</u> x <u>Phaseolus</u> v.)Rf 0,35	339 a	71 b	87,33 a
(<u>R.s.</u> x <u>Phaseolus</u> v.)Rf 0,65	333 a	68 b	88,93 a

Dentro de cada teste as parcelas seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 1 % de probabilidade.

* média de 3 repetições.

etanol e as provas em branco. A germinação de esporos de *F. solani* f. *phaseoli* igualmente não foi afetada mas, em *F. moniliiforme* as percentagens de germinação de esporos diferiram significativamente das testemunhas.

Para a análise estatística dos ensaios envolvendo germinação de esporos foi utilizada a transformação em arco seno, de acordo com tabela apresentada por FISHER e YATES (1971).

5. DISCUSSÃO

A produção de substâncias fenólicas por hipocótilos de feijoeiro infectados, observada no decorrer do presente trabalho, está em acordo com a literatura existente sobre o assunto. A observação de CARDOSO (1971), em feijoeiro-*F. solani* f. *phaseoli*, de que a velocidade de produção de fenóis totais, entre o terceiro e nono dia após a inoculação, foi maior do que a velocidade de crescimento do hospedeiro e que, após o nono dia, essa relação se inverteu foi verificada em ambas as combinações patógeno-hospedeiro.

A análise dos extratos em éter de petróleo, obtidos de tecidos infectados, permitiu através de CCF no sistema He din, a separação de duas substâncias fenólicas. A primeira apresentou R_f 0,35, fluorescência sob UV e apenas um pico de absorção de UV a 280 nm. A segunda, R_f 0,65, absorção de UV e um espectro com picos de absorção a 280 e 315 nm. As características destas substâncias fenólicas coincidem com as obtidas por CARDOSO (1971) e ratificam as diferenças encontradas

por este autor em relação aos dados de CRUICKSHANK e PERRIN (1963), PIERRE e BATEMAN (1967), VAN ETEN e BATEMAN (1970) e PIERRE (1971). Estes últimos autores encontraram duas fitoalexinas em feijoeiro: *phaseollin*, com picos de absorção de UV a 279, 286 e 315 nm e a substância II, com apenas um pico a 288 nm. Com relação a posição de *phaseollin* em CCF no sistema de Hedin também existe discordância entre VAN ETEN e BATEMAN (1970), que relatam a presença de *phaseollin* em Rf 0,34 e HEATH e HIGGINS (1973) que citam para *phaseollin*, no mesmo sistema, Rf 0,59.

A seqüência de formação das fitoalexinas, no presente trabalho, foi a mesma em ambos sistemas patógeno-hospedeiro e coincidente também com o obtido por CARDOSO (1971) no sistema feijoeiro - *F. solani* f. *phaseoli*.

No que se refere a ação fungistática característica das fitoalexinas, os resultados obtidos coincidem com o conhecimento existente na bibliografia. Foi verificado que a concentração, capaz de inibir significativamente o crescimento do tubo germinativo e a germinação de esporos de fungo não patogênico, não foi suficiente para causar os mesmos efeitos em fungo patogênico ao hospedeiro. Também na ação fungistática não foram detectadas diferenças entre as fitoalexinas produzidas nos dois sistemas patógeno-hospedeiro estudados.

A hipótese que motivou a realização do presente trabalho, de que as diferenças entre os resultados obtidos por CARDOSO (1971) em hipocótilos de feijoeiro infectados por

F. solani f. *phaseoli* e os de PIERRE e BATEMAN (1967) e VAN ETTEN E BATEMAN (1970), que também utilizaram hipocotilos de feijoeiro, porém, infectados por *R. solani*, fossem devidas aos diferentes sistemas patógeno-hospedeiro, não foi confirmada pelos resultados obtidos. As fitoalexinas extraídas dos dois sistemas estudados mostraram idênticas características quando analisadas pelo mesmo procedimento, tanto em CCF, espectro de absorção de UV, ação inibidora sobre fungos e ordem cronológica de aparecimento.

6. CONCLUSÕES

Hipocótilos de feijoeiro produzem as mesmas fitoalexinas, na mesma sequência, independentemente do patógeno indutor.

7. SUMMARY

Studies os phytoalexins extracted from hypocotils of bean plants, var. "Carioca", infected by *Rhizoctonia solani* and in same tissue of this host, infected by *Fusarium solani* f. *phaseoli* , were carried out.

Two phytoalexins, one with Rf 0,35 in Hedin's Thin Layer Chromatografy system, fluorescing under short UV light, with a maximum a 280 nm and, the other, with Rf 0.65 in the same TLC system, absorving short UV light and with maxima at 280 and 315 nm, were extracted from both host-pathogen system.

Using TLC, UV spectrum and effect on mycelial growth and spore germination of fungi, was verified that the bean plant produces the same phytoalexins, in the same sequence not depending on the host-pathogen system.

8. LITERATURA CITADA

- CARDOSO, C.O.N., 1971. Accumulation of Phenols and Phytoalexins in Hypocotyls of Bean Infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli*. (Burk) Snyder and Hans. Columbus, Ohio State University. 100 p. (Tese de Doutorado).
- CRUICKSHANK, I.A.M. e D.R. PERRIN, 1963. Phytoalexins of the leguminosae. Phaseollin from *Phaseolus vulgaris* L. Life Sciences U.S.A., 9:680-682.
- FISHER, R.A. e F. YATES, 1971. Tabelas estatísticas para pesquisa em biologia, medicina e agricultura. São Paulo. Ed. da Univ. de São Paulo e Ed. Polígono. 150p.
- HEATH, M.C. e V.J. HIGGINS, 1973. In vitro and in vivo conversion of phaseollin and pisatin by an alfalfa pathogen *Stemphylium botryosum*. Physiological Plant Pathology. New York. 3:107-120.

- HESS, S.L., L.A. HARDWIGER e M.E. SCHWOCHAU, 1971. Studies on Biosynthesis of Phaseollin in Excised Pods of *Phaseolus vulgaris*. Saint Paul Minn. Phytopathology 61:79-82.
- MÜLLER, K.O. 1958. Studies on Phytoalexins. I The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. Aust. J. Biol. Sci. Melbourne. 11:275-300.
- MUSUMECI, M.R. e M.B. FIGUEIREDO, 1974. Microtecnia para ensaios biológicos com substâncias inibidoras de crescimento de fungos. VII Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília, D.F. (mimeo) 2p.
- PIERRE, R.E., 1971. Phytoalexin Induction in Beans Resistant or Susceptible to *Fusarium* and *Thielaviopsis*. Phytopathology, Saint Paul, Minn. 61:322-327.
- PIERRE, R.E. e D.F. BATEMAN, 1967. Induction and Distribution of Phytoalexins in *Rhizoctonia*- Infected Bean Hypocotils. Phytopathology, Saint Paul, Minn. 57:1154-1160.
- SWAIN, T. e W.A. HILLIS, 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. J.Sci. Food Agric. London, 10:65-68.
- VAN ETEN, H.D. e D.F. BATEMAN, 1970. Isolation of Phaseollin from *Rhizoctonia*-Infected Bean Tissue. Phytopathology Saint Paul, Minn. 60:385-386.