

6448

JOÃO MARIA DE FIGUEIRÊDO

Engenheiro-Agrônomo

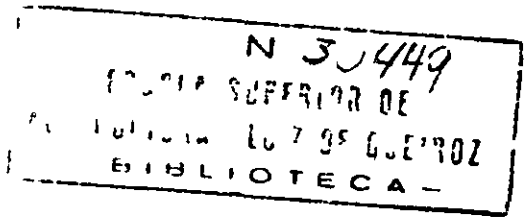


CENTRO DE DOCUMENTACION

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

Orientador ^C Caio Octávio Nogueira Cardoso

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



PIRACICABA
Estado de São Paulo
- 1975 -

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 sadias. 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 fenolicas tanto nas variedades suscetíveis como nas resistentes estão diretamente ligadas ao numero 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 numero 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 tecnica da gota de difusão Observou a formação de compostos fenólicos 24 horas apos 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-dihidroxi-fenóis que nas demais combinações

CARDOSO (7) determinou que a concentração de fenóis totais no extrato cru de hipocotilos infectados por *Fusarium solani* aumenta com o desenvolvimento das lesões alcançando o maximo 15 dias apos a inoculação, o que corresponde a quase seis vezes os teores fenolicos existentes nas plantas sadias Determinou tambem que a taxa de produção de fenóis totais em plantas doentes excede a taxa de crescimento da planta do 3º ao 9º dia sendo superada ao 15º dia em diante apos 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 hipocotilos de feijoeiro inoculados com *Thelephora basicola*, *Fusarium solani* f *phaseoli*, *Cladospodium cladosporioides* e *Monilinia fructicola* obteve extratos que foram fracionados com éter de petroleo os quais foram analisados cromatograficamente Nesta análise determinou a existência de três substâncias fenolicas 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 e 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

HADWIGER e Von BROEMBSSEN (12) HESS e SCHWOCHAU (13) e HESS et alii (14) usaram uma solução de cloreto ferrico a 1% em metanol como reagente específico para phaseollin pulverizando as placas cromatograficas com esta solução e após breve aquecimento observaram a formação de uma coloração avermelhada

CARDOSO (7) cromatografou extratos de hipocotilos 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 reagem para as maiorias dos reagentes de fenóis mas no entanto apenas a substância com Rf 0 65 apresentou a reação com cloreto ferrico em metanol descrito como típico para phaseollin por HESS e outros (12 13 14) Esse mesmo autor

purificou e 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 ETTEEN e BATEMAN (27) e VAN ETTEEN (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 Arnou para a determinação de fenóis totais, nas diversas linhagens de feijoeiro utilizadas em seu trabalho embora este método não seja o mais adequado para a 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 fencis 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 inoculo 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 inoculo 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 tecnica 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 tecnica do crescimento miceliano PIERRE (19) desenvolveu a tecnica da suspensão de esporos em solução nutritiva MUSUMECI (17) desenvolveu um método de estudos de substâncias inibidoras e microorganismos 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 microorganismos a serem testados

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

- i - As substâncias fenolicas encontradas em hipocotilos e raízes , inoculadas e não inoculadas podem ser qualitativamente diferentes
- ii - As quantidades de fenóis totais encontradas em hipocotilos e raízes inoculadas e não inoculadas devem tambem variar
- iii - Os efeitos inibidores dos diversos extratos de hipocotilos e raízes inoculadas e não inoculadas, podem tambem 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. *pisii* 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-boa (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 -

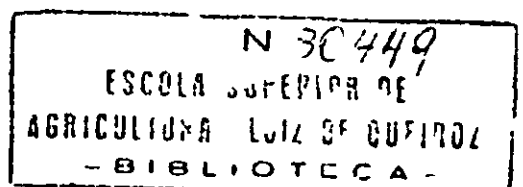
yer de dois litros contendo um litro de meio de ARMSTRONG (1) sendo os mesmos agitados manualmente duas vezes ao dia

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

Todos os fungos do gênero *Fusarium* foram conservados em solo esteril como descrito por TOUSSOUN e NELSON (24) Sempre que necessário 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 hipocótilos 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 desenvasadas pelo mesmo processo de jato contínuo de água As partes basais de hipocótilos e os sistemas radiculares foram separados o peso fresco determinado e então armazenados a -4°C



Sistemas radiculares e hipocotilos 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 homogenização, 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

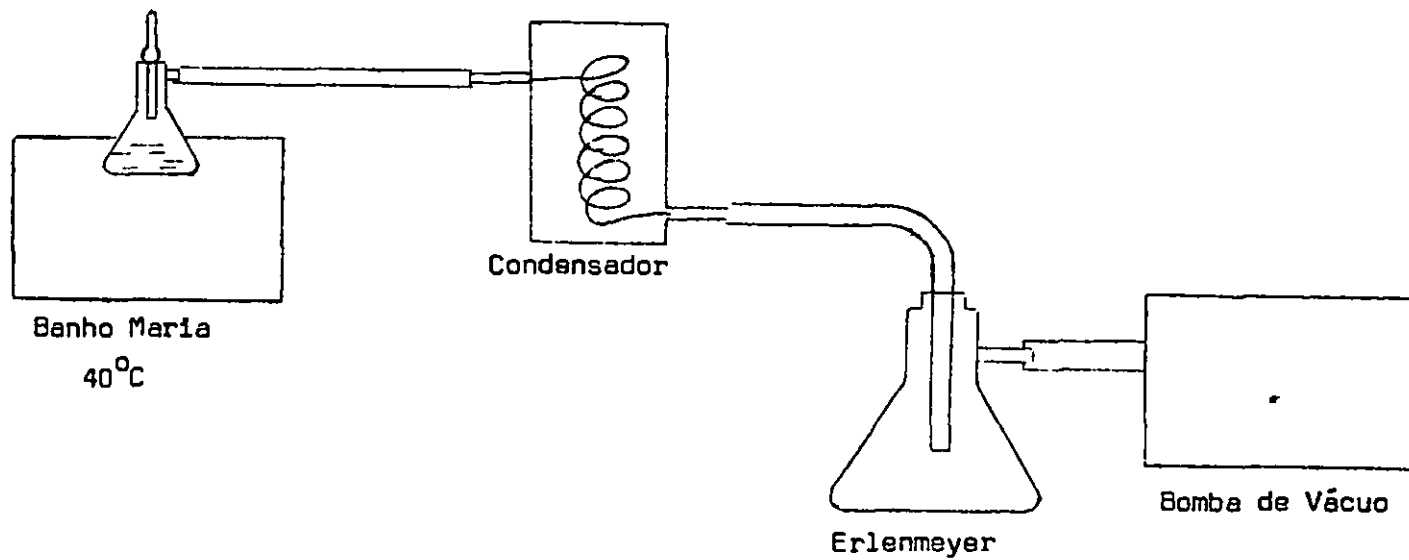


Fig 1 - Evaporador improvisado no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da U S P

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 ETTEN 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 + clorato férrico (volumes iguais a 1% em água) ou com cloreto ferrico a 3% em metanol seguidas de breve aquecimento para detecção de phaseollin segundo HESS e SCHWOCHAU (13) , HADWIGER e VON BROEMSEM (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).

Faz-se 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 a testemunha, a qual recebeu apenas 20 µl de etanol e foi considerada como 100% de crescimento.

4 - RESULTADOS

VARIAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS¹ 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 fenolicas apresenta pouca variação mantendo-se praticamente inalterada durante todos os 26 dias após o transplante.

Observe-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	1 610
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

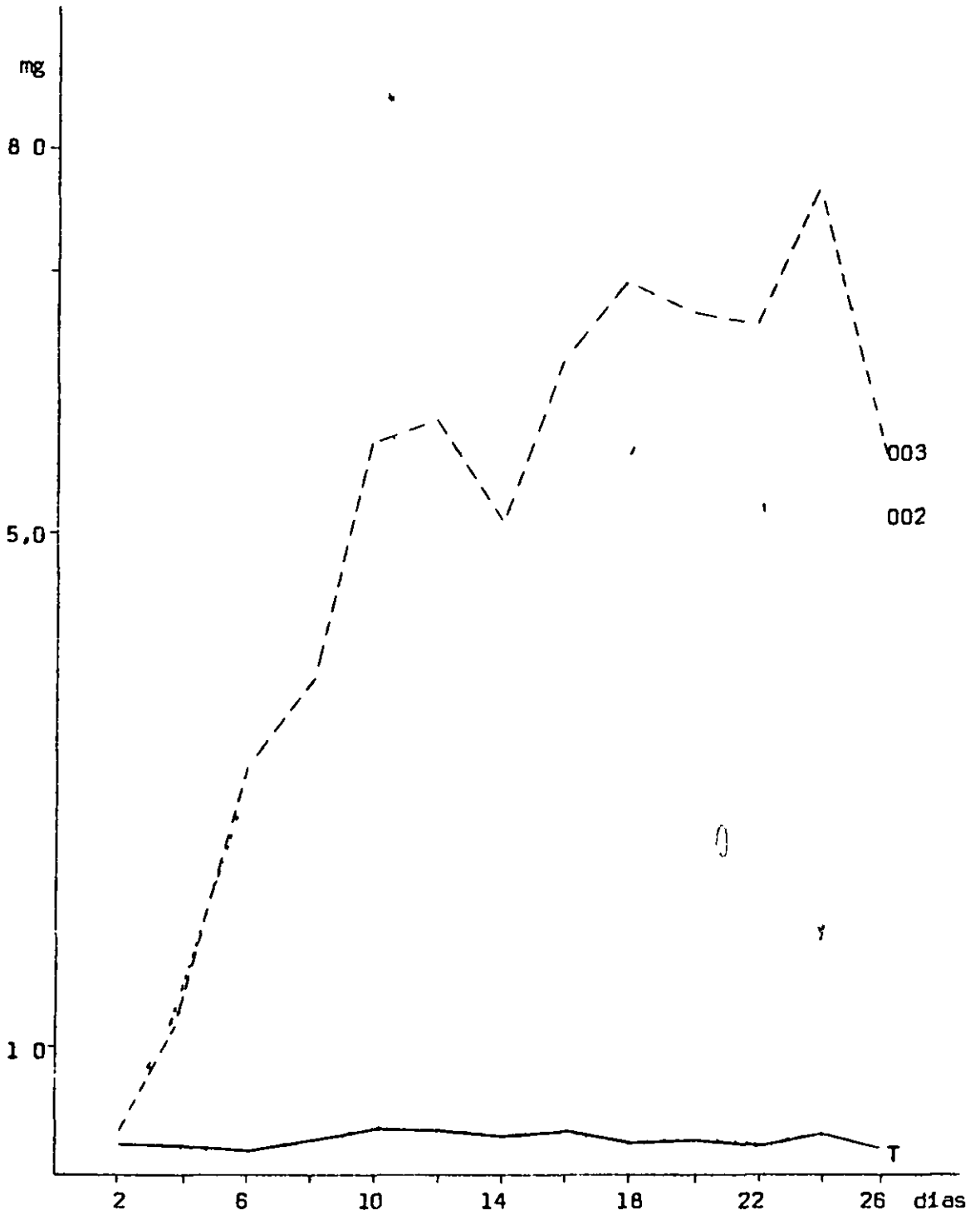


Figura 2 - Fenóis Totais nos EE (mg/10 ml) de Hipocótilos Inoculados e não Inoculados

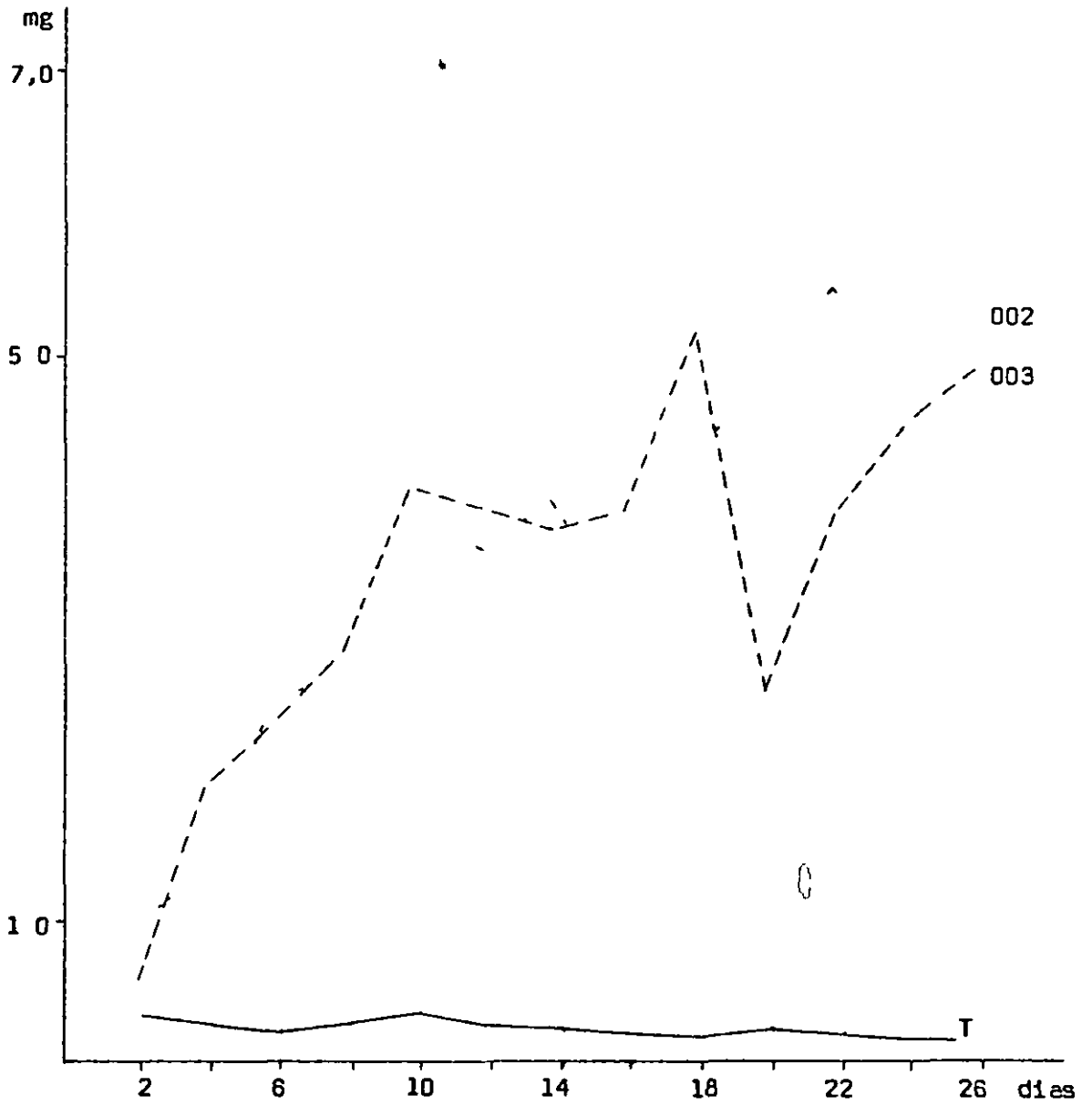


Figure 3 - Fenóis Totais no EE (mg/peso seco) de Hipocótilos Inoculados e não Inoculados

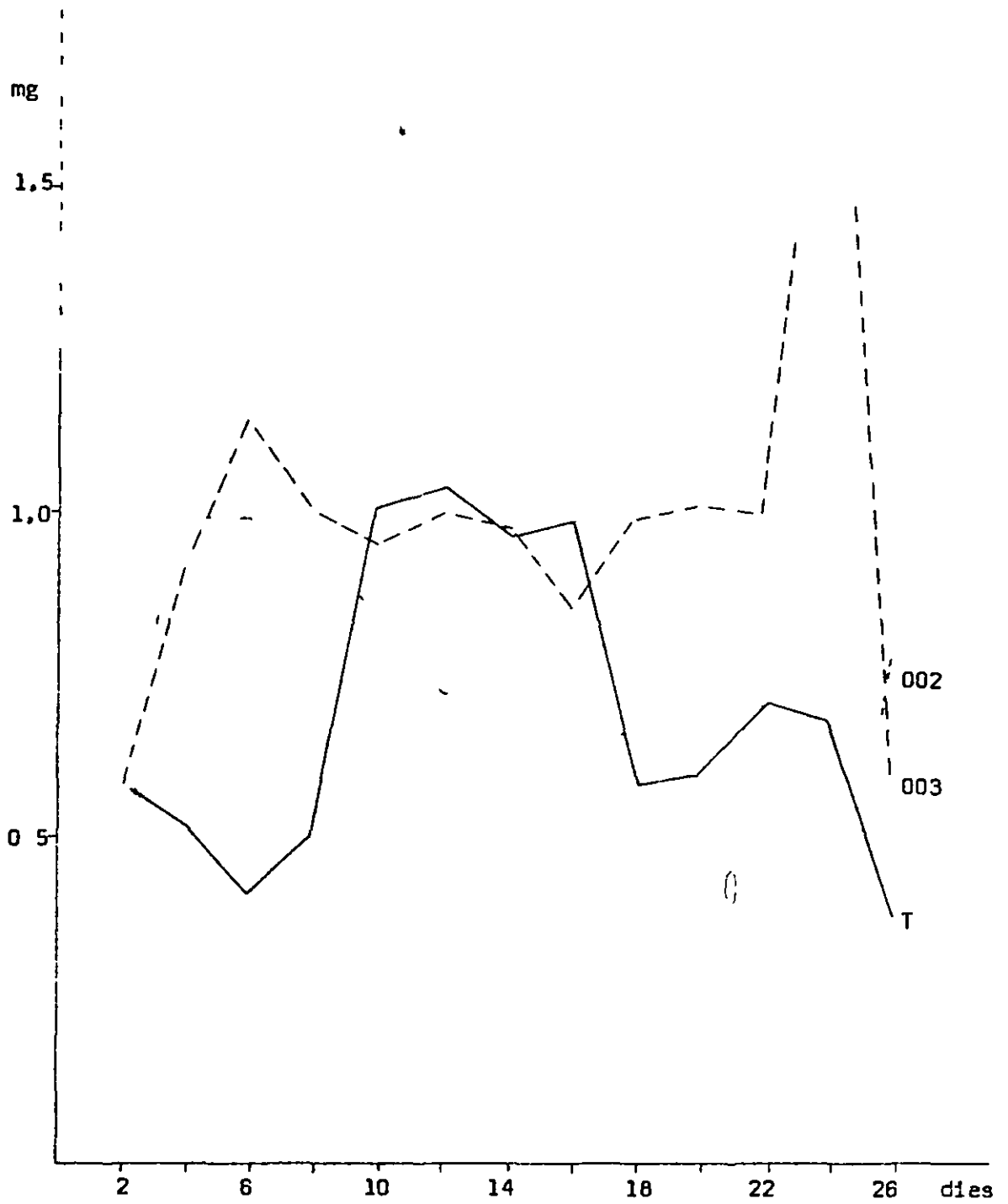


Figura 4 - Fenóis Totais nos EE (mg/10 ml) de Sistema Radicular Inoculados e Não Inoculados

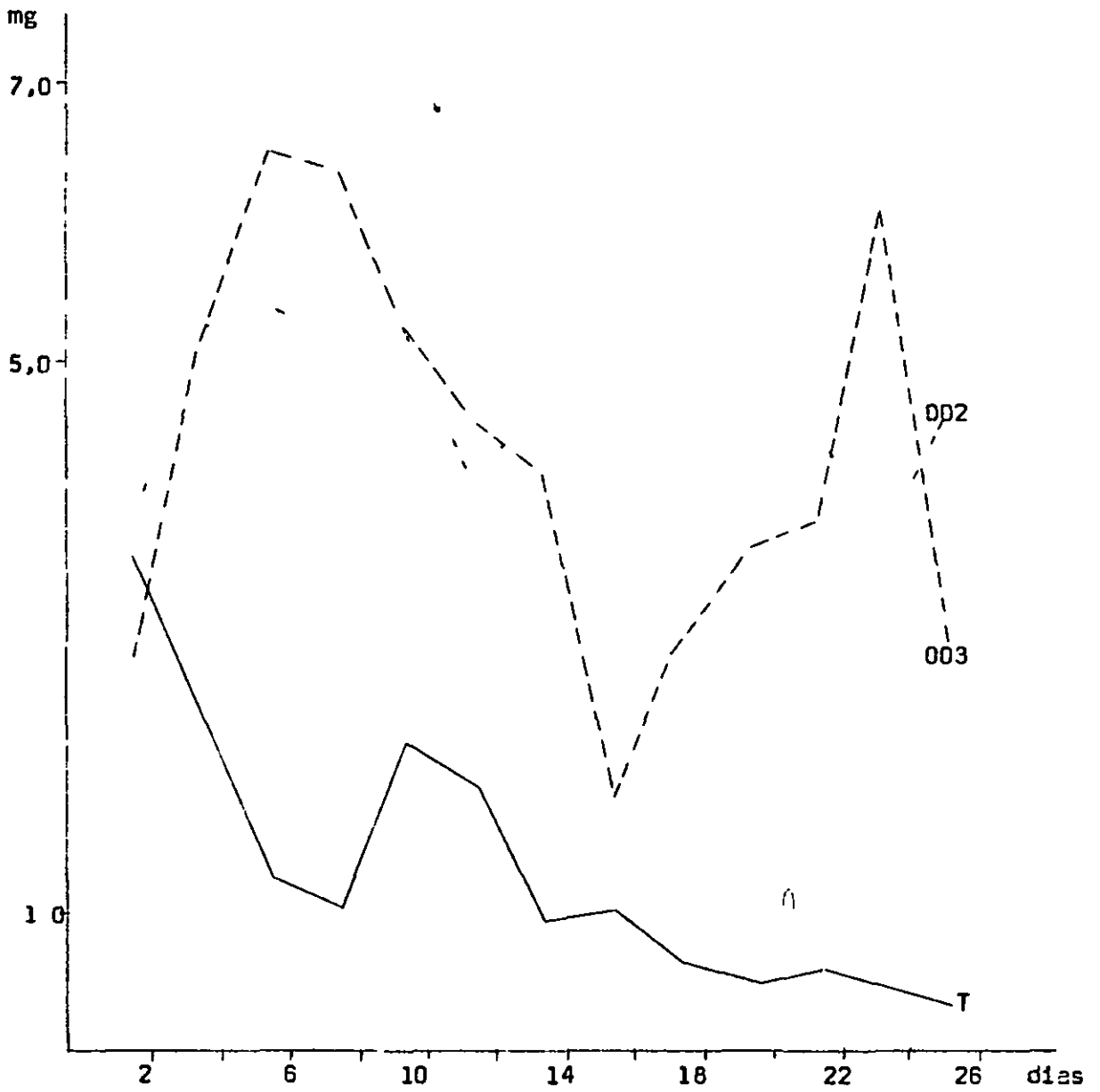


Figura 5 - Fenóis Totais nos EE (mg/peso seco) de Sistema Radicular Inoculados e Não Inoculados

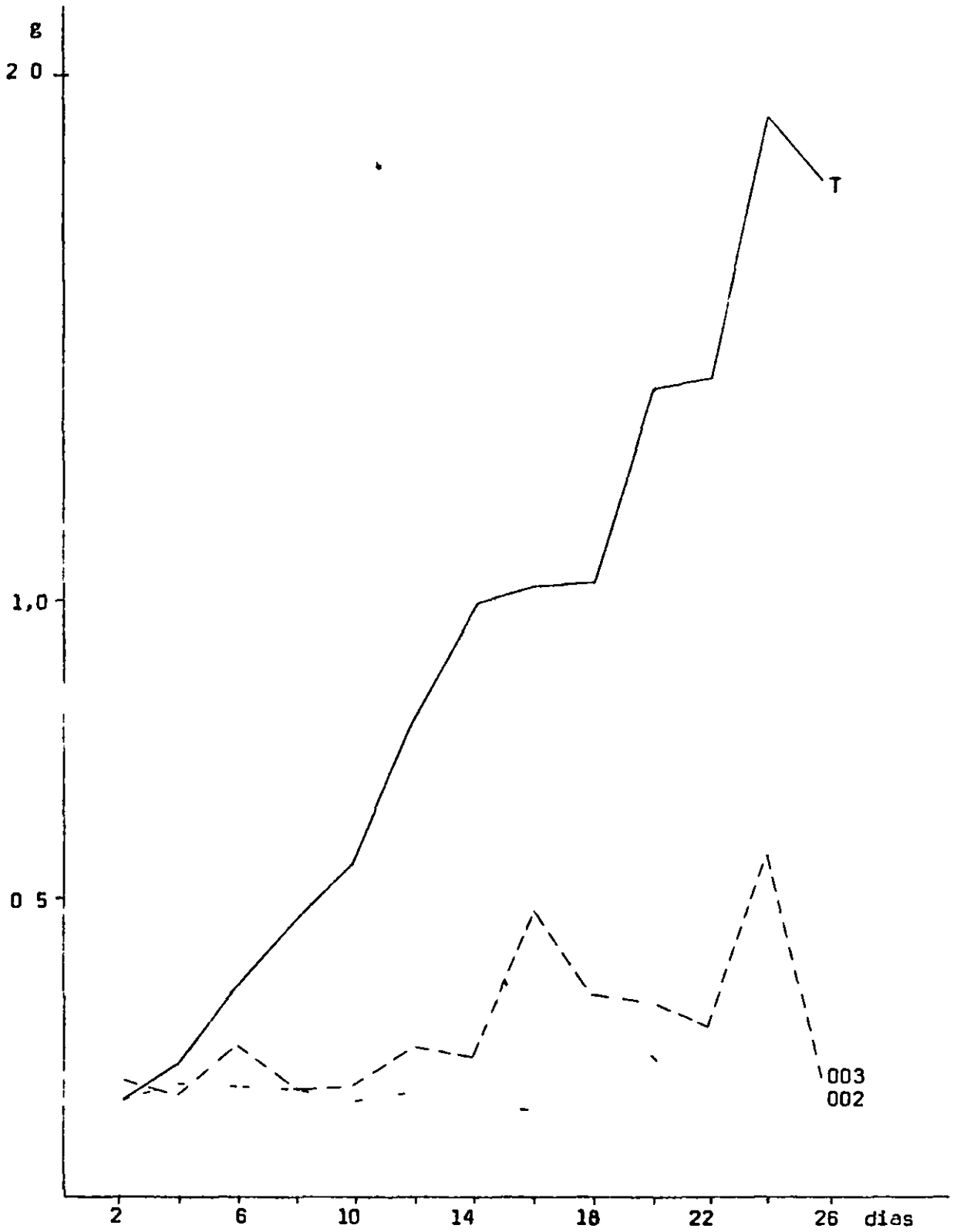


Figura 6 - Variação do Peso Seco em sistemas radiculares Inoculados e Não Inoculados

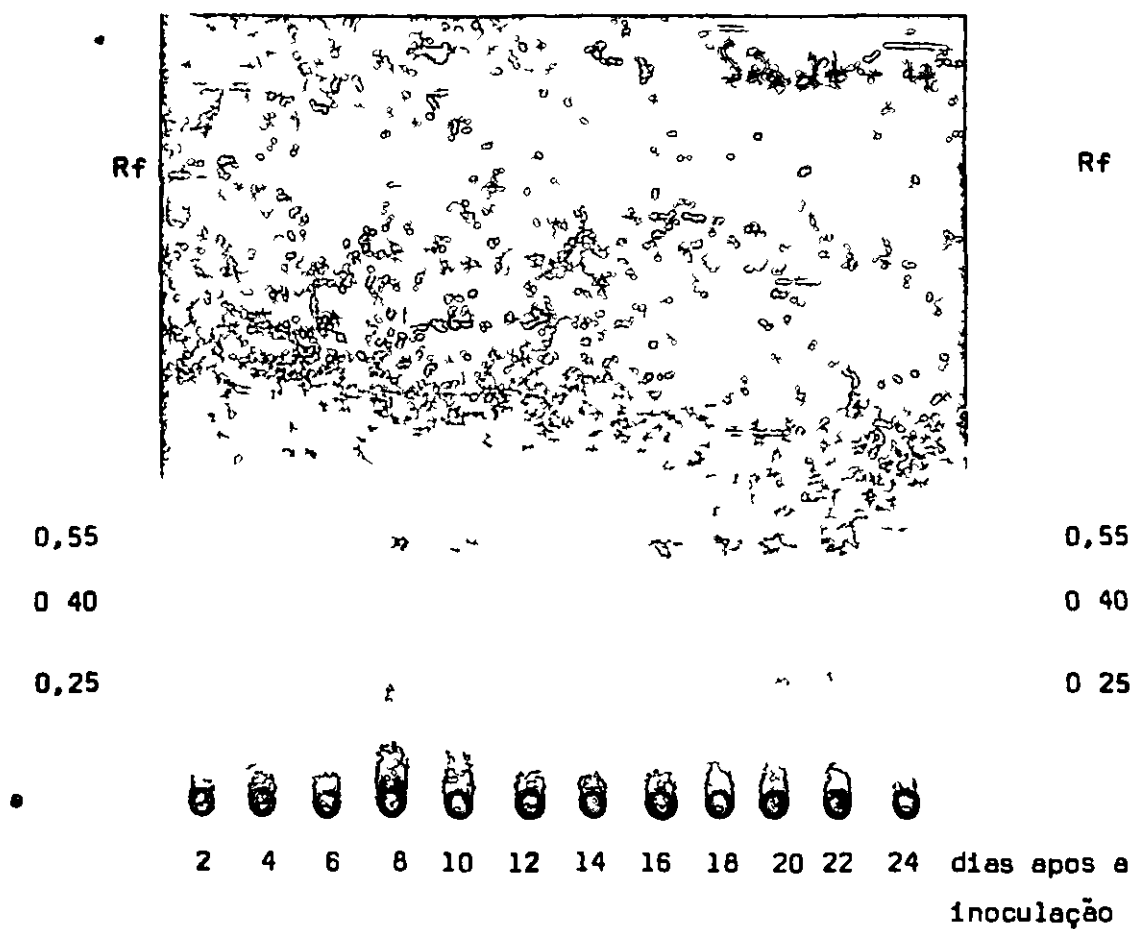
lados de *Fusarium solani* f. *phaseoli* verificou-se algum crescimento apenas em alguns períodos durante todo o experimento sendo contudo sempre bem inferior aos sistemas radiculares não inoculados

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 UV 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 µl por mancha**

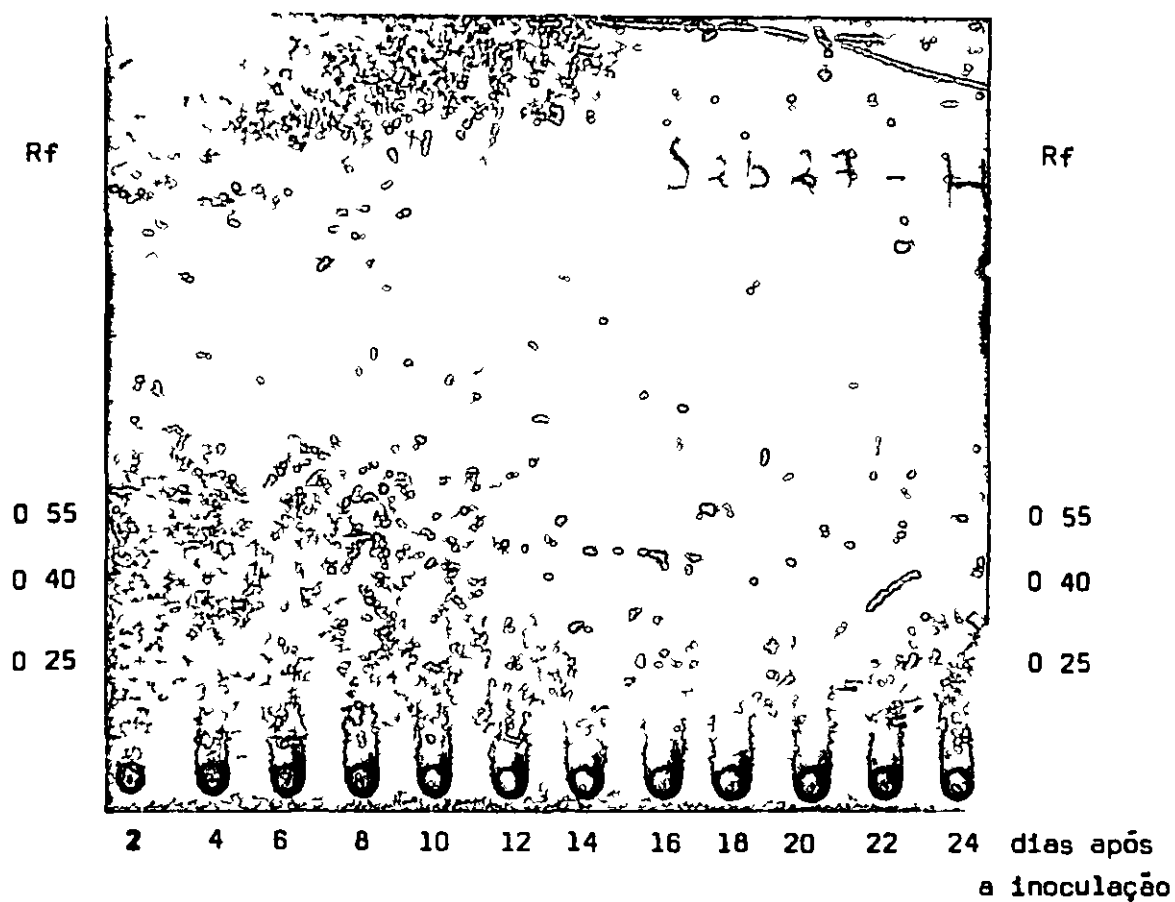
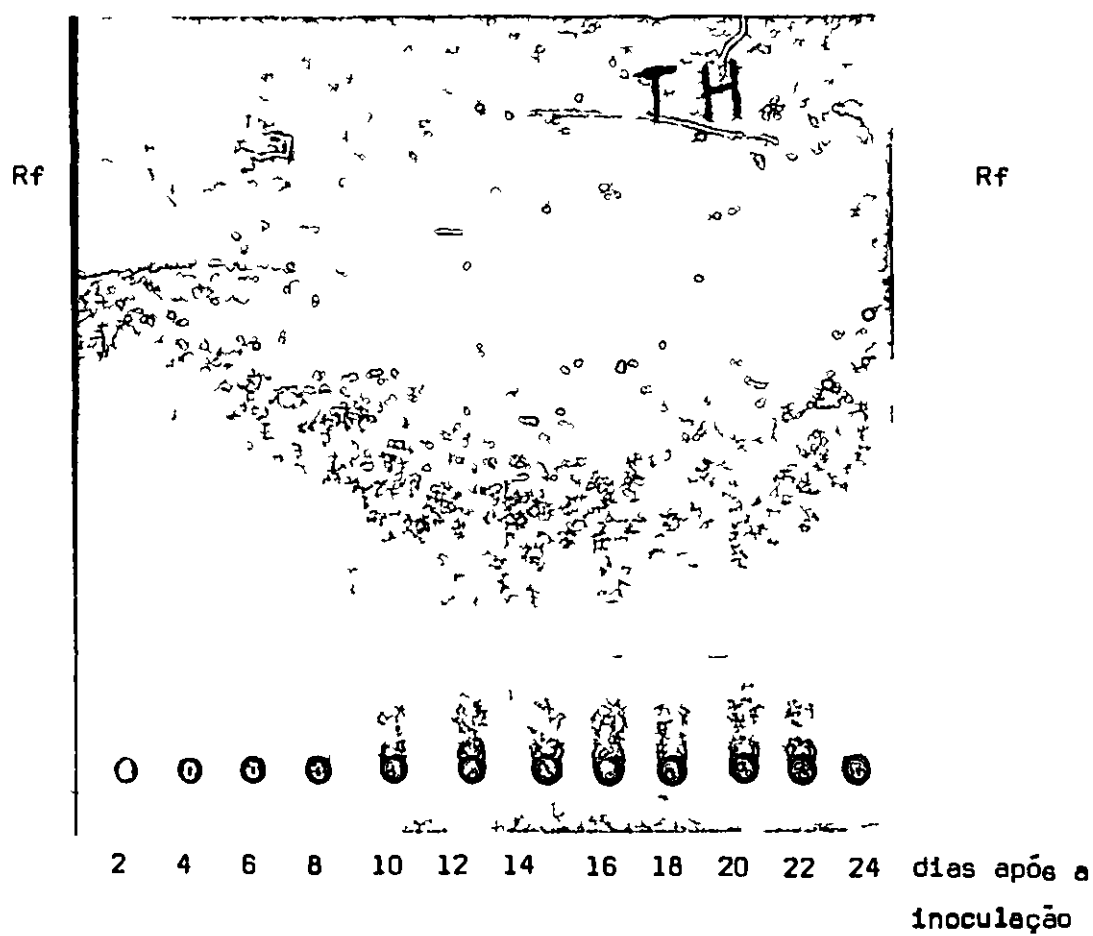


Figura 8 - Cromatograma de EE de Hipocótilos Inoculados
Isolado 003
100 µl por mancha



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

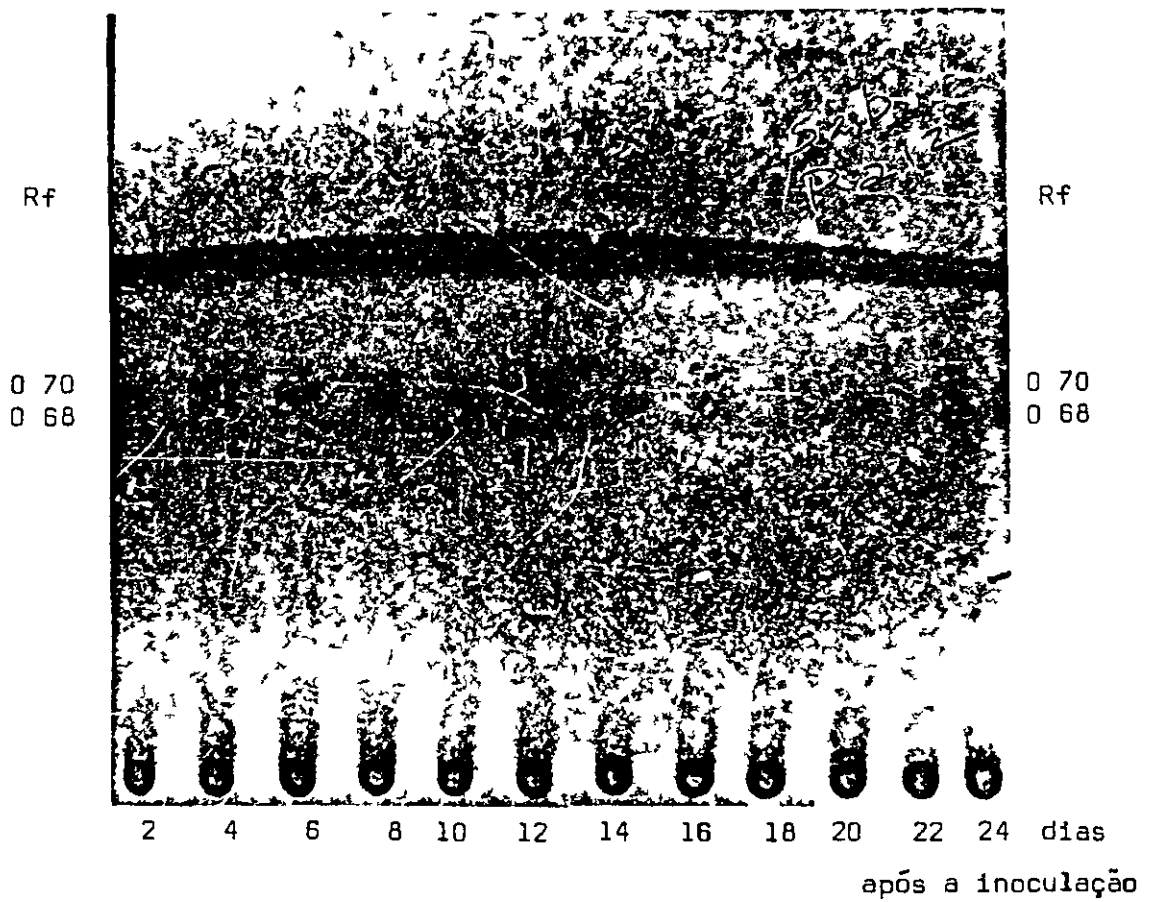


Figure 10 - Cromatograma de EE de Sistema Radicular
Inoculado Isolado 003

100 μ l por mancha

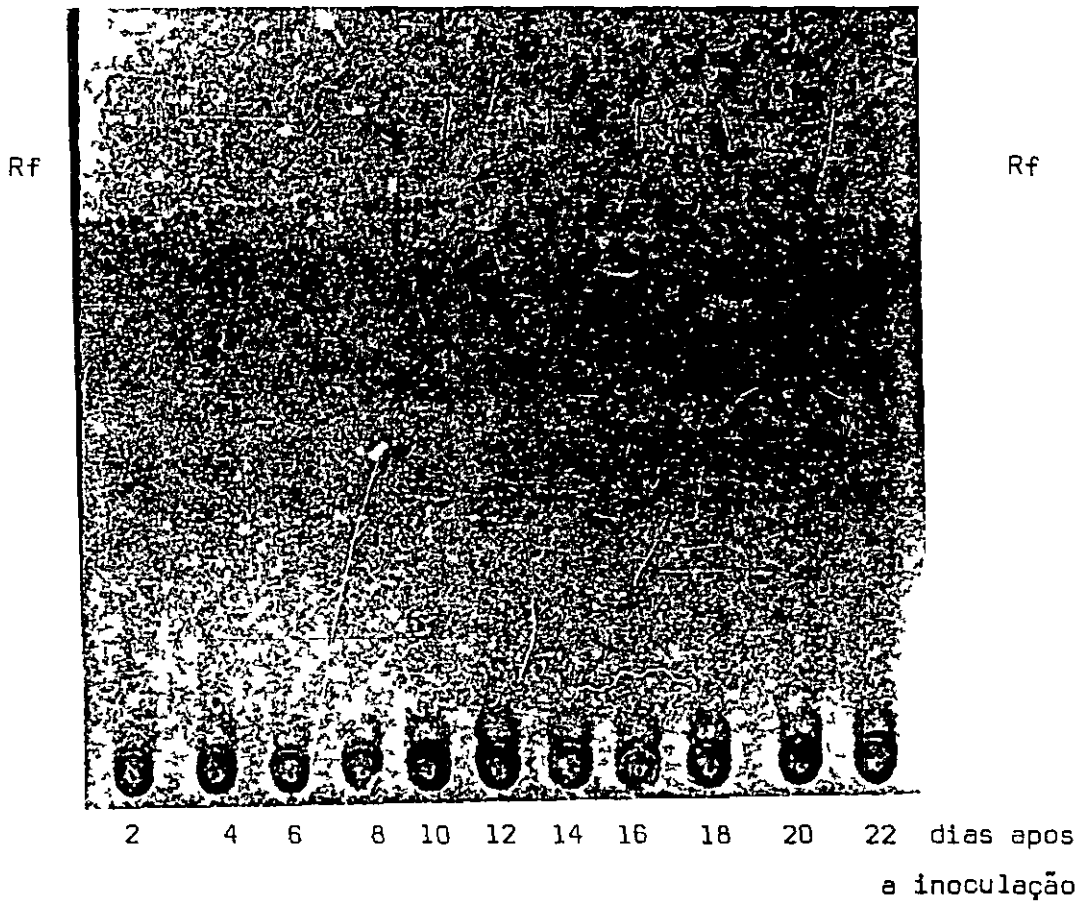


Figura 11 - Cromatograma de EE de Sistema Radicular
Não Inoculado
100 μ l por mancha

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 ferrico 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 *psii* 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 inibitorios dos diversos Extratos de Hipocotilos e Sistemas Radiculares inoculados e não inoculados

Concentração dos Extratos (µg/µl)	EE Hipocotilo Sadio	EE Hipocotilo Inoculado	EEP Hipocotilo Inoculado	EE Raiz Sadias	EE Raiz Inoculada	EEP Raiz Inoculada	Controle Etanol
	0,58	3,88	0 29	1 36	1 45	0 24	95 p a
<i>F solani f pisi</i> % de crescimento	90	65	100	100	70	83	100
<i>F solani f phaseoli</i> % de crescimento	100	80	100	100	60	80	100
<i>F solani f cucurbitae</i> % de crescimento	50	0	70	25	37 5	55	100
<i>Colletotrichum falcatum</i> % de crescimento	47,8	0	49 1	21,7	0	26	100

Período de 48 horas

5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Como pode-se observar nos resultados dos nossos trabalhos a concentração de compostos fenolicos 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 fenolica com o desenvolvimento da doença ou aumento do numero 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 fermentos feitos nas raízes durante a operação de transplante (10).

Analisando-se o ganho de peso seco de raízes (Figura 6) observa-se que ha 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 fenois 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 fenois totais por EE obtido (equivalente a concentração de fenois 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 variavel de período para período e conseqüentemente a quantidade de fenois extraída não representava apenas aquela existente em tecido doente. O total de fenois nos sistemas radiculares de plantas não inoculadas quando expressos em concentração de fenois por tratamento também mostraram muita variação nos diferentes períodos de colata. 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, e a que parece ser a mais importante na reação das plantas de feijoeiro a reação

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

VAN ETEN (28) verificou que em hipocotilos infectados com *Fusarium solani* f. *phaseoli* a produção de kevitone e 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 hipocotilos 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 hipocotilos

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 UV, 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 fermentos que as mesmas foram submetidas no processo de transplante

Observando-se as concentrações de fenois totais nos diversos extratos usados (Quadro 3) pode-se notar que no EEP de sistemas radiculares inoculados a concentração de fenois 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 fenois totais formados nos tecidos radiculares durante o estabelecimento do patógeno
- 2 - Ausência de phaseollin nos tecidos de sistemas radiculares
- 3 - Localização nos sistemas radiculares de uma maior concentração de inoculo, 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 fenois 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 hipocótilos 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 hipocótilos

Pelos resultados obtidos podemos de imediato concluir que

- 1 - As substâncias fenolicas encontradas em hipocotilos e raízes de feijoeiro inoculados e não inoculados são realmente qualitativamente diferentes
- 2 - As concentrações de fenois totais encontradas em hipocótilos e raízes inoculadas e não inoculadas são também diferentes
- 3 - Os efeitos antibioticos 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 etanolicos 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 eter de petróleo do extrato etanolicos de sistemas radiculares inoculados verificou-se que esta substância migra para a fase eter quase que totalmente

Os extratos etanolicos e os extratos de eter de petroleo 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 eter de petroleo apenas os de raízes inoculadas apresentaram atividade inibitoria aos fungos patogênicos

16 248

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. 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 to 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) Snyder 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) Snyder & 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 BROEMBSEN - 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 & VERNA S HIGGINS - In vitro and in vivo conversion of Phaseollin and Pisatin by an Alfafa 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 - Microtecnica 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 D 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 ETTEN 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 ETTEN, H D & D F BATEMAN - Isolation of Phaseollin from *Rhizoctonia* - Infected Bean Tissue Phytopathology 60 385-386 1970
- 27 - VAN ETTEN 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 ETTEN, H D - Accumulation of Anti-Fungal Isoflavonoids in Beans Hypocotyls Infected with *Fusarium solani* f *phaseo* 11 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

f1

9 - ANEXOS

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