

**CLEBER NOVAIS BASTOS**

**Engenheiro Agrônomo**

Instituto Biológico da Bahia

**Produção de toxina por *Fusarium moniliforme* Sheldon e seu efeito  
sobre alguns cultivares de milho (*Zea mays* L.)**

Orientador: **Prof. Dr. Eric Balmer**

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

---

Piracicaba  
Estado de São Paulo  
1974

A  
meus pais  
e  
irmãos

DEDICÓ

## A G R A D E C I M E N T O S

O autor apresenta os seus agradecimentos:

- Ao Instituto Biológico da Bahia, à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e ao Departamento de Fitopatologia, os quais tornaram possível a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização desta pesquisa.
- Ao Professor Dr. Éric Balmer, pela valiosa orientação, estímulo e sugestões durante a realização do presente trabalho.
- Ao Professor Dr. Clélio Lima Salgado, pela prestimosa colaboração na revisão dos originais e sugestões.
- Ao Eng.<sup>o</sup>-Agr.<sup>o</sup> Hilton Thadeu Zarate do Couto, pela colaboração nas análises estatísticas.
- Aos Eng.<sup>os</sup>-Agr.<sup>os</sup> Carlos Perea e Fernando F. Tavares, pelas colaborações prestadas.
- Ao Dr. Clyde C. Allison, pela versão, para o inglês, do resumo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Í N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	7
3.1 - Meios de Cultura Utilizados .....	7
3.2 - Isolado Utilizado .....	8
3.3 - Isolamento do Patógeno e Manutenção das Culturas ...	9
3.4 - Obtenção da Toxina .....	9
3.4.1 - Métodos de produção da toxina .....	9
3.4.2 - Purificação parcial da toxina .....	10
3.4.3 - Conservação da solução de toxina .....	11
3.5 - Determinação do Crescimento do Micélio de Fungo e do pH dos Filtrados de Cultura .....	11
3.6 - Bioensaios .....	12
3.6.1 - Esterilização, germinação das sementes e escolha das sementes germinadas .....	12
3.6.2 - Condução do teste, avaliação e concentra ção das soluções de toxina usadas .....	13
3.6.3 - Sementes utilizadas .....	13
3.7 - Experimentos .....	14
3.7.1 - Experimento I - Efeitos do período de cul tivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento do fungo, pH do meio e produção de toxina .....	14
3.7.1.1 - Peso seco obtido para micélio e pH do filtrado de cultura .....	14
3.7.1.2 - Bioensaio I .....	15
3.7.1.3 - Bioensaio II .....	15

3.7.2 - Experimento II - Efeito da toxina no desenvolvimento da raiz principal de sementes germinadas de oito cultivares de milho .....	15
3.7.3 - Experimento III - Efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade .....	16
4 - RESULTADOS .....	18
4.1 - Experimento I .....	18
4.1.1 - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento do fungo .....	18
4.1.2 - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o pH do filtrado de cultura .....	21
4.1.3 - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre a produção de toxina .....	23
4.1.3.1 - Bivensaiio I .....	23
4.1.3.2 - Bivensaiio II .....	28
4.2 - Experimento II - Efeito da toxina no desenvolvimento da raiz principal de sementes de oito cultivares de milho .....	31
4.3 - Experimento III - Efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade .....	32
5 - DISCUSSÃO .....	34
6 - CONCLUSÕES .....	41
7 - RESUMO .....	43
8 - SUMMARY .....	45
9 - BIBLIOGRAFIA .....	47
10 - APÊNDICE .....	51

## 1 - INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande importância econômica na alimentação humana e animal, tanto "in natura" como industrializado.

No Brasil, este cereal ocupa uma posição de destaque, quer se trate do volume de sua produção ou de sua área cultivada. Entretanto, nas nossas condições, o milho está sujeito a incidência de um número relativamente grande de doenças e, dentre estas destaca-se a morte dos "seedlings" causada por Fusarium moniliforme Sheldon (Gibberella fuji-kuroi (Saw) Wr.) , que dependendo das condições ambientais poderá causar grandes prejuízos.

Para o controle, a medida mais adequada e econômica consiste no emprego de variedades resistentes.

A detecção de fontes de resistência a patógenos mediante o uso de toxina em sementes germinadas é muito desejável, pois, além de ser um teste mais rápido, é menos afetado por efeitos de fatores ambien-

tais. Neste sentido já se tem conhecimento de trabalhos realizados, em diferentes partes do mundo, realçando assim, a importância do uso da toxina no método de seleção.

O presente trabalho teve por objetivos estudar os efeitos do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento de Fusarium moniliforme Sheldon, pH do meio, produção de toxina pelo patógeno e o possível uso da mesma na seleção de material resistente.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo DJAKAMIHARDJA (5) , Fusarium moniliforme (Sheld) Syd. Hans. foi constatado pela primeira vez em Nebraska, em 1904, causando podridões de espigas de milho e foi descrito por SHELDON com o nome de Fusarium moniliforme Sheldon.

De acordo com MESSIAEN & CASSINI (16) , Fusarium moniliforme Sheldon (Gibberella fujikuroi (Saw) Wr.) caracteriza-se pela ausência de clamidosporos, microconídios abundantes e pequenos, elípticos, em cadeias sobre conidióforos alongados.

MESSIAEN & CASSINI (16) , MESSIAEN (15) e EDWARDS (6) relataram a existência de uma variedade: Gibberella moniliforme var. subglutinans (Sheld) Syd. Hans., cujos microconídios são produzidos em falsas cadeias e não na forma normal de cadeias.

Todavia, SNYDER & HANSEN (23) , em suas investigações com Fusarium moniliforme , concluíram que a formação de microconídios



em cadeias é instável e portanto imprópria para a separação de variedades, considerando então Fusarium moniliforme e Fusarium moniliforme var. subglutinans como sinônimos. Porém, BOOTH (1) relatou que em Fusarium moniliforme os microconídios são formados em fiálides simples, usualmente em cadeias, enquanto que para Fusarium moniliforme var. subglutinans os microconídios são formados em polifiálides, não em cadeias.

Com relação a doença de plântulas de milho causada por este patógeno, os trabalhos desenvolvidos por MOHAMED et alii (17), FUTRELL & KILGORE (8) mostraram que Fusarium moniliforme pode afetar a emergência, stand e vigor das plântulas, produzindo, posteriormente, clorose, necrose e finalmente morte das mesmas.

No tocante aos efeitos produzidos pelo fungo e produtos metabólicos do mesmo, MOHAMED et alii (17) e SCOTT & FUTRELL (21) observaram que filtrados de culturas de Fusarium moniliforme, quando colocados em plântulas de milho, causavam os mesmos sintomas que aqueles observados quando as plântulas foram inoculadas com o fungo.

FUTRELL & KILGORE (8), cultivando plântulas de milho em cultura axênica com Fusarium moniliforme, observaram que o sistema radicular apresentou uma inibição no seu alongamento e concluíram que o modo de ação da inibição foi causada por uma toxina produzida pelo fungo. Esta inibição foi também observada por SCOTT & FUTRELL (21), quando colocaram sementes de milho para germinar em papel de filtro embebido em solução contendo toxina produzida por Fusarium moniliforme.

Com relação a especificidade, KIRSEY et alii (11) demonstraram que a toxina produzida por Fusarium moniliforme não é específica para milho, pois é capaz de inibir coleóptilos de trigo, causar necrose e clorose em plântulas de fumo e produzir efeitos tóxicos em animais.

No tocante às características da toxina produzida por Fusarium moniliforme, FUTRELL & KILGORE (8) e SCOTT & FUTRELL (21) relataram ser esta toxina estável ao calor e completamente solúvel em água, enquanto KIRSEY et alii (11), encontrando características físicas e químicas diferentes de outras toxinas conhecidas, evidenciaram a possibilidade de tratar-se estruturalmente de uma nova toxina, dando-lhe o nome "moniliformina". Por outro lado, GAUMANN (9) relatou ser Gibberella fujikuroi capaz de produzir ácido fusárico e ácido dihidrofusárico juntamente com outras toxinas.

Com relação aos fatores que afetam a atividade de uma toxina, KUO & SCHEFFER (12), estudando a toxina produzida por Helminthosporium carbonum Ullstrup, raça 1, observaram que a temperatura, o tempo de exposição das raízes das plântulas à solução de toxina e a concentração da mesma afetam a sua atividade.

SAAD et alii (20), procurando estudar a influência da idade do micélio e o efeito da aeração na produção de toxina, cultivaram Alternaria tenuis Nees em solução de Richard, em agitação. Durante um período de 2 a 28 dias, efetuaram a filtração de culturas e observaram, que o máximo de crescimento do fungo foi alcançado depois de 9 dias, mas nenhuma toxina foi detectada, mesmo após 28 dias.

PRINGLE & SCHEFFER (18), procurando estudar o efeito do período de cultivo do fungo sobre o pH da solução nutritiva, cultivaram Periconia circinata (Mangin) Sacc. em meio de Fries, inicialmente, ajustado para um pH 5,4. Após 18 dias, eles observaram que a concentração hidrogen-iônica caiu abaixo de pH 4,0, enquanto aos 28 dias elevou-se próximo a pH 7,0.

CHI & HANSEN (2), estudando o efeito do pH sobre o crescimento de um isolado de Fusarium oxysporum (56-3) em meio de Richard, observaram que a concentração hidrogen-iônica ótima para o crescimento estava entre um pH 5,0 - 5,5, enquanto que acima de pH 6,5 ou abaixo de pH 4,5 o crescimento era reduzido.

Com relação à composição do meio de cultura e período de cultivo sobre a produção de toxina, SMEDEGARD - PETERSEN & NELSON (22) relataram que, quando isolados de Cochliobolus heterostrophus Dreschs eram cultivados em meio de Fries suplementado com 2% de extrato de levedura, a maior produção de toxina era detectada após 14 dias.

Quanto ao emprego de toxina como um meio auxiliar para a detecção de resistência, vários trabalhos têm sido feitos usando reações de plântulas de diversas gramíneas, inclusive o milho, à toxinas produzidas por diferentes patógenos. Assim, YODER (29) e LUKE et alii (14), usando toxina de Phyllosticta maydis Army Nelson e Helminthosporium victoriae Meehan Murphy, respectivamente em milho e aveia, chegaram a conclusão que é possível separar plântulas resistentes e susceptíveis.

Segundo STEINER & BYTHER (24), a detecção de resistência a patógenos, mediante o uso de toxina é mais vantajosa, pois além de obter resultados mais rápidos, os mesmos são menos afetados por efeitos de fatores ambientais. Além disso, as possíveis mudanças em virulência do patógeno, devido ao cultivo contínuo em meio de cultura, são eliminadas, quando grande quantidade de toxina pode ser produzida e armazenada por um longo período de tempo. Estes autores caracterizaram parcialmente a toxina produzida por Helminthosporium sacchari (B. de Haan) Butl. e a utilizaram na seleção, em larga escala, de variedades de cana-de-açúcar resistentes à doença causada por este fungo.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Meios de Cultura Utilizados

Os meios de cultura empregados no presente trabalho foram os seguintes:

A - Batata-dextrose-agar (B D A) , TUIITE (25)

Batata .....	200 g
Dextrose .....	20 g
Agar .....	15 g
Água até completar .....	1.000 ml

B - Meio de Fries modificado, LUKE & WHEELER (13)

Sacarose .....	30 g
Tartarato de amônia .....	5 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	1 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	1 g

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
NaCl .....	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,13 g
Extrato de levedura .....	1 g
Água .....	1.000 ml

C - Solução de Richard, TUIE (25)

Sacarose .....	50 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	5 g
MgSO <sub>4</sub> .....	2,5 g
FeCl <sub>3</sub> .....	traços
Água .....	1.000 ml

D - Meio de cevada, RUIZ - TAPIADOR & LORDUY (19)

Grãos de cevada .....	150 g
Água .....	170 ml

Os meios de cultura, acima citados, foram esterilizados por autoclavagem a uma atmosfera de pressão, durante 20 minutos, sendo que o meio de cevada foi esterilizado duas vezes com um intervalo de 24 horas entre esterilizações.

3.2 - Isolado Utilizado

No presente trabalho foi utilizado um isolado de Fusarium moniliforme Sheldon isolado de raízes de milho procedentes da região de Lavras, Minas Gerais.

### 3.3 - Isolamento do Patógeno e Manutenção das Culturas

Para o isolamento, foi seguido a seguinte técnica: as raízes foram subdivididas em fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio, (fórmula comercial contendo 5,2% de cloro-ativo) diluído na base de uma parte deste para uma parte de água, mediante a imersão dos fragmentos na solução durante um minuto. Após a desinfestação, os fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo agar-água e mantidos à temperatura ambiente. Parte das colônias do fungo obtidas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio inclinado de BDA (batata-dextrose-agar) e mantidas através de repicagens sucessivas.

### 3.4 - Obtenção da Toxina

#### 3.4.1 - Método de produção da toxina

Para a obtenção do inóculo a ser usado em estudo de produção de toxina, foi feita, em tubos de ensaio contendo as culturas do fungo, uma suspensão de conídios com água esterilizada, sendo transferido 0,1 ml desta suspensão para os frascos erlemeyer, com capacidade de 250 ml, que continham, separadamente, 50 ml dos meios de cultura de Richard, Fries e cevada, descritos no item 3.1. Para cada meio de cultura foram usados 4 frascos, os quais foram colocados no escuro a 27°C, durante períodos correspondentes a 7, 14 e 21 dias. Com intervalos de 7 dias, a partir da colocação da suspensão de conídios nos diferentes meios de cultura líquidos, o micélio foi removido dos mesmos, separadamente para cada uma das repetições de cada tratamento em meios líquidos, para a determinação do peso seco do micélio, mediante a filtragem do con

teúdo de cada frasco por um funil de Buchner com papel de filtro whatman n.º 1 .

O filtrado obtido, para cada repetição de cada tratamento em meio líquido usado, foi utilizado para a determinação do pH , sendo, em seguida, ajuntadas as quatro repetições de cada tratamento e processados a seguir como um todo.

A cada frasco contendo meio sólido, meio de cevada, foram adicionados 150 ml de água estéril, sendo o conteúdo homogeneizado mediante agitação. Em seguida, procedeu-se a uma primeira filtração num pano, para eliminar as impurezas maiores, e passando-se, em seguida, o filtrado obtido por um funil de Buchner contendo papel de filtro whatman n.º 1 . Os filtrados correspondentes às quatro repetições de cada tratamento foram ajuntadas e processadas a seguir como um todo.

Finalmente, todos os filtrados obtidos para os diferentes tratamentos foram submetidos, separadamente, a uma filtração através de filtros de "Seitz" , previamente esterilizados à temperatura de 120°C e pressão de 1,0 atmosfera, durante 20 minutos, sendo em seguida conservados em congelador a - 18°C até a posterior purificação parcial.

#### 3.4.2 - Purificação Parcial da Toxina

Para purificação parcial da toxina, foi utilizada a técnica de STEINER & BYTHER (24) , com ligeiras modificações, sendo ela em linhas gerais a seguinte:

Os filtrados obtidos separadamente para cada meio de cultura e período de produção de toxina, num volume correspondente a 100 ml para os meios líquidos e 150 ml para os extratos do meio de cevada, foram concentrados a 1:10 do volume original, sob vácuo a 42°C .

Aos diferentes concentratos obtidos, foi adicionado igual volume de metanol, sendo os frascos guardados a 4°C por 24 horas. Após este período, o precipitado resultante em cada frasco foi removido, separadamente, do sobrenadante mediante filtração em funil de Bucher contendo papel de filtro whatman n.º 1. O filtrado obtido foi evaporado a vácuo, até metade do volume, para eliminação do metanol.

A fim de se ter maior segurança quanto a evaporação do metanol, foi adicionado, separadamente, a cada concentrado, um volume igual de água, após o que foi feita nova evaporação até restarem, no frasco evaporador, 10 ml de solução contendo toxina para extratos obtidos em meios líquidos e 15 ml para extratos obtidos em meio de cevada.

Finalmente, a solução contendo a toxina foi particionada três vezes com igual volume de clorofórmio, sendo o clorofórmio descartado, após a separação nítida das fases orgânicas e aquosa, e guardada a fase aquosa, daqui por diante referida como "solução de toxina".

Os meios de cultura, que serviram como testemunhas, passaram pelos mesmos processos de filtração, extração e concentração.

#### 3.4.3 - Conservação da solução de toxina

As "soluções de toxina" foram conservadas em congelador, a - 18°C, até a utilização por ocasião dos bioensaios.

#### 3.5 - Determinação do Crescimento do Micélio do Fungo e do pH dos Filtrados de Cultura

O crescimento do fungo foi determinado através do peso seco do micélio obtido, separadamente, para cada repetição da interação período de crescimento e meios de cultura.



O micélio foi removido do meio líquido, por filtração a vácuo, mediante a utilização de um funil de Buchner contendo papéis de filtro previamente pesados. Os papéis de filtro juntamente com o micélio foram colocados em estufa, a 80°C, por 24 horas, e em seguida colocados em dissecador contendo silicagel e posteriormente pesados.

O pH do filtrado de cada repetição, para cada um dos meios de cultura nos diferentes períodos, foi determinado, separadamente, mediante o uso de um potenciômetro.

### 3.6 - Bioensaios

#### 3.6.1 - Esterilização, germinação das sementes e escolha das sementes germinadas

Para esterilização superficial, germinação das sementes e escolha das sementes germinadas, foi seguida a técnica usada por LUKE & WHEELER (13), com a introdução de ligeiras modificações.

As sementes foram esterilizadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio, (diluindo uma parte de hipoclorito comercial, contendo 5,2% de cloro-ativo, com uma parte de água) durante 20 minutos. A seguir, as sementes foram lavadas com água estéril e colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água, e incubadas a 27°C. Após 48 horas, foram selecionadas, para o bioensaio, as sementes germinadas que apresentavam raiz principal medindo aproximadamente 5 mm de comprimento.

### 3.6.2 - Condução do teste, avaliação e concentração das soluções de toxina usadas

Para testar um possível efeito de toxina, foi seguido o método de HOOKER et alii (10) que consiste em colocar 5 ml da "solução de toxina" em placas de Petri, com dimensões de 60 x 15 mm, com tampo de papel de filtro. Em seguida, cinco sementes germinadas, com raiz principal com comprimento aproximado de 5 mm, com o embrião voltado para baixo, foram colocadas em cada placa de Petri e logo após, colocadas no escuro a temperatura de 27°C, durante 48 horas.

Como testemunhas, foram usadas as "soluções sem toxina", obtidas a partir dos diferentes meios de cultura não inoculados e tendo recebido os mesmos tratamentos que os meios inoculados, como também a água destilada.

Para avaliação de um possível efeito inibidor no alongamento das raízes, foi utilizado o método usado por HOOKER et alii (10) que consiste em medir com uma régua o comprimento da raiz principal de cada semente germinada.

As diferentes concentrações das "soluções de toxina", utilizadas nos bioensaios, foram obtidas mediante a diluição das "soluções de toxina", inicialmente obtidas, com água estéril.

Nos bioensaios I e II foram usadas as diluições 1:10, 1:50 e 1:100, ao passo que no bioensaio III foi usada a diluição 1:10.

### 3.6.3 - Sementes utilizadas

As sementes utilizadas nos diferentes bioensaios encontram-se relacionadas a seguir:

Cultivares	Procedência
ESALQ HV - 1	ESALQ
Centralmex	ESALQ
Piramex	ESALQ
Hmd 7479	ESALQ
Cateto São Simão	ESALQ
Ag - 28	Sementes Agrocerec S/A
Ag - 25	Sementes Agrocerec S/A
Ag-157	Sementes Agrocerec S/A

### 3.7 - Experimentos

3.7.1 - Experimento I - Efeitos do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento do fungo, pH do meio e produção de toxina

3.7.1.1 - Peso seco obtido para o micélio e pH do filtrado de cultura

Para este estudo, foram utilizados os meios líquidos de Richard e de Fries modificado, os quais foram após a transferência do fungo, incubados, no escuro, a temperatura de 27°C, durante os períodos de 7, 14 e 21 dias. Com intervalos de 7 dias, a partir da inoculação dos frascos, foram recolhidos quatro frascos, correspondentes as quatro repetições, para cada interação período x meio, e feitas as determinações para peso seco de micélio e pH.

### 3.7.1.2 - Bioensaio I

Neste bioensaio, foram usadas as "soluções de toxina" obtidas para os meios de cultura de Richard, Fries e cevada, referentes aos períodos de 7, 14 e 21 dias de crescimento do fungo nos meios.

As diluições para as "soluções de toxina" usadas foram: 1:10, 1:50 e 1:100.

Como testemunhas, foram usadas as "soluções sem toxina", diluídas a 1:10, e água destilada.

As sementes de milho utilizadas foram as do híbrido ESALQ HV-1 var. sintético. A condução do bioensaio e o método de avaliação foram aqueles descritos anteriormente no item 3.6.2.

O delineamento deste ensaio obedeceu a um esquema fatorial  $3 \times 3 \times 3$  (meios  $\times$  períodos  $\times$  diluições) com tratamentos adicionais, inteiramente casualizado com três repetições, sendo que cada placa de Petri, contendo cinco sementes, foi considerada uma repetição.

Para a análise da variância foram utilizadas as médias das cinco sementes.

### 3.7.1.3 - Bioensaio II

Este bioensaio foi feito com o propósito de confirmar-se os dados obtidos no bioensaio I, sendo seguido o mesmo delineamento, número de tratamentos e metodologia.

### 3.7.2 - Experimento II - Efeito da toxina no desenvolvimento da raiz principal de sementes germinadas de oito cultivares de milho

Neste ensaio, foi estudado o comportamento de oito cultivares de milho em presença da toxina produzida pelo fungo no meio de

cevada durante o período de 21 dias de cultivo.

A concentração da "solução de toxina" usada foi uma diluição com água estéril para 1:10 em relação a "solução de toxina" original.

Os cultivares foram: Centralmex , Piramex , Hmd 7479 , Caseto São Simão , Ag - 28 , Ag - 25 , Ag - 157 e ESALQ HV - 1 .

Este ensaio foi delineado obedecendo a um esquema fatorial 8 x 2 (cultivares x presença ou ausência de toxina) , inteiramente casualizado com três repetições, sendo que cada placa de Petri, contendo cinco sementes, foi considerada como uma repetição.

Para a análise da variância foram utilizadas as médias das cinco sementes.

A condução do teste e avaliação foram feitas segundo os métodos descritos anteriormente no item 3.6.2 .

Foi incluído um tratamento testemunha para cada cultivar , no qual a "solução de toxina" foi substituída pela "solução sem toxina" obtida para o meio de cevada, na ausência do fungo, também diluída a 1:10 .

### 3.7.3 - Experimento III - Efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade

As "soluções de toxina" usadas nos ensaios anteriores foram mantidas a - 18°C durante 8 meses. Após este período, foram usadas as "soluções de toxina" produzidas nos meios de Richard e cevada , para os períodos de 14 e 21 dias.

As "soluções de toxina" foram diluídas com água estéril , para 1:10 em relação a solução inicial.

Como testemunhas foi usada água destilada.

A condução do ensaio e método de avaliação foram descritos anteriormente no ítem 3.6.2 .

Este ensaio foi delineado obedecendo a um esquema fatorial 3 x 3 (meios x períodos de conservação) , inteiramente casualizado com três repetições, sendo que cada placa de Petri, contendo cinco sementes foi considerada uma repetição.

Para a análise da variância foram utilizadas as médias das cinco sementes.

#### 4 - RESULTADOS

##### 4.1 - Experimento I

###### 4.1.1 - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento do fungo

Os resultados obtidos para o crescimento do fungo, peso seco de micélio, em diferentes períodos e meios são apresentados no Quadro I do Apêndice, e no Gráfico n.º 1 do texto.

Os resultados obtidos para a análise da variância são apresentados no Quadro II do Apêndice.

A análise da variância revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para o desenvolvimento do fungo nos diferentes meios de cultura.

As médias para os diferentes meios, expressas em mg de peso seco de micélio, foram 521 e 256 , respectivamente, para os meios de Richard e Fries.

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 122,50 mg de peso seco.

A análise da variância também revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para o desenvolvimento do fungo nos diferentes períodos de cultivo.

As médias para os diferentes períodos, expressas em mg de peso seco de micélio, foram:

$$\hat{m}_7 \text{ dias} = 215$$

$$\hat{m}_{14} \text{ dias} = 511$$

$$\hat{m}_{21} \text{ dias} = 440$$

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 141,47 mg de peso seco.

O teste de Tukey revelou que o peso seco de micélio obtido para 7 dias, diferiu significativamente daqueles obtidos para 14 e 21 dias, enquanto que estes dois últimos não diferiram significativamente entre si.

Como a interação, meio de cultura e período de cultivo, foi significativa, o número de graus de liberdade correspondentes a períodos e interação foram desdobrados. A análise da variância para este desdobramento é apresentada no Quadro III do Apêndice. Esta análise revelou efeitos altamente significativos para períodos dentro dos meios de Richard e Fries.



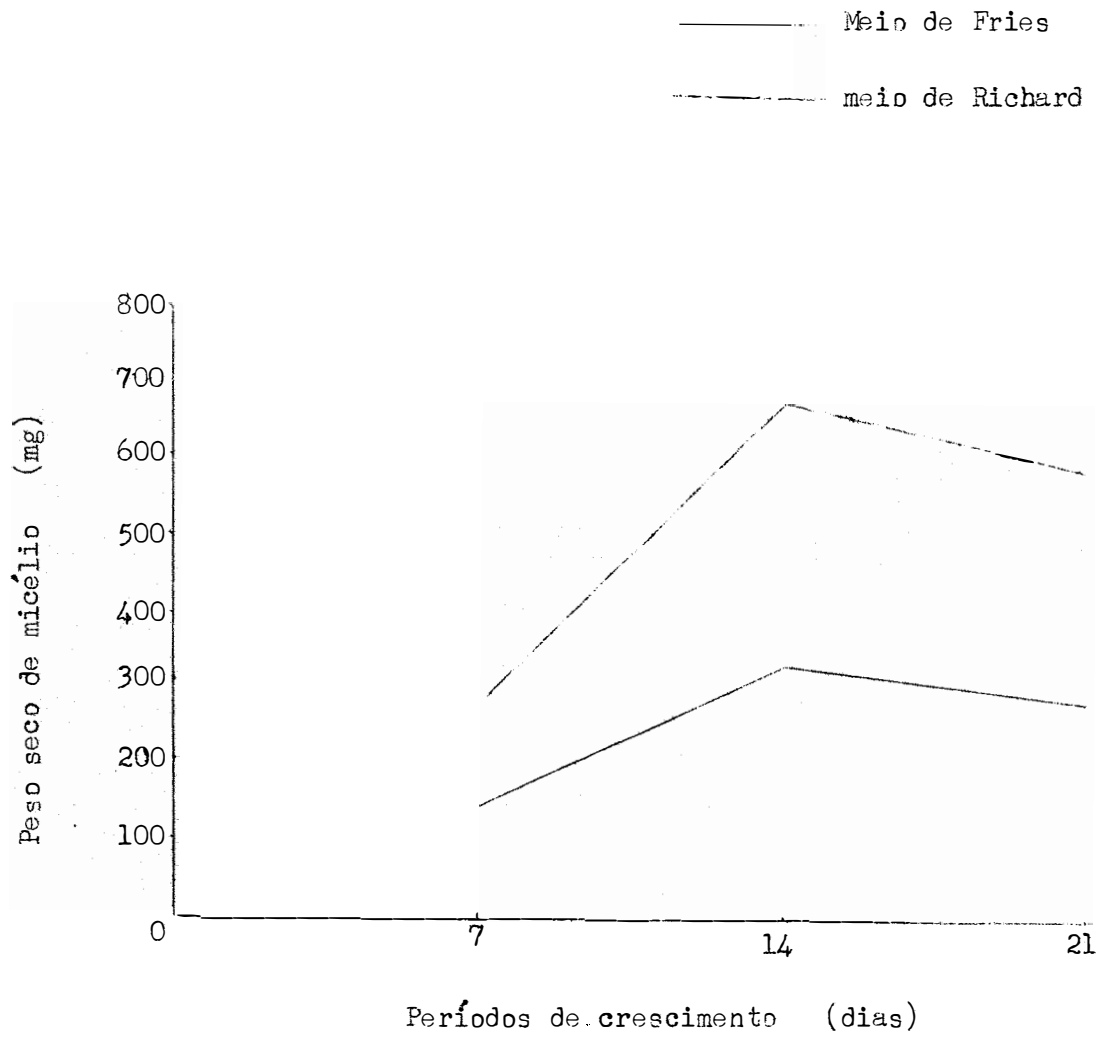


Gráfico n.º 1 - Crescimento de Fusarium moniliforme em diferentes meios de cultura e períodos de cultivo

As médias para a interação, expressas em mg de peso seco de micélio, são apresentadas a seguir:

Meios de Cultura	Períodos de cultivo		
	7 dias	14 dias	21 dias
Richard	284	685	593
Fries	146	337	286

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 141,47 mg de peso seco.

Comparando-se as médias para períodos dentro de cada meio, nota-se que o peso seco de micélio obtido para o período de 7 dias, tanto para o meio de Richard, como para o meio de Fries, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, para aqueles obtidos para os períodos de 14 e 21 dias, os quais não diferiram entre si.

#### 4.1.2 - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o pH do filtrado de cultura

Os resultados obtidos para as determinações feitas são apresentadas no Quadro IV do Apêndice e no Gráfico n.º 2 do texto.

Os resultados revelaram que, em ambos os meios, houve um aumento no pH para os três períodos testados, sendo que o maior aumento foi observado entre os períodos de 7 e 14 dias.

O meio de Fries foi o que revelou maior mudança na concentração hidrogen-iônica durante os períodos testados.

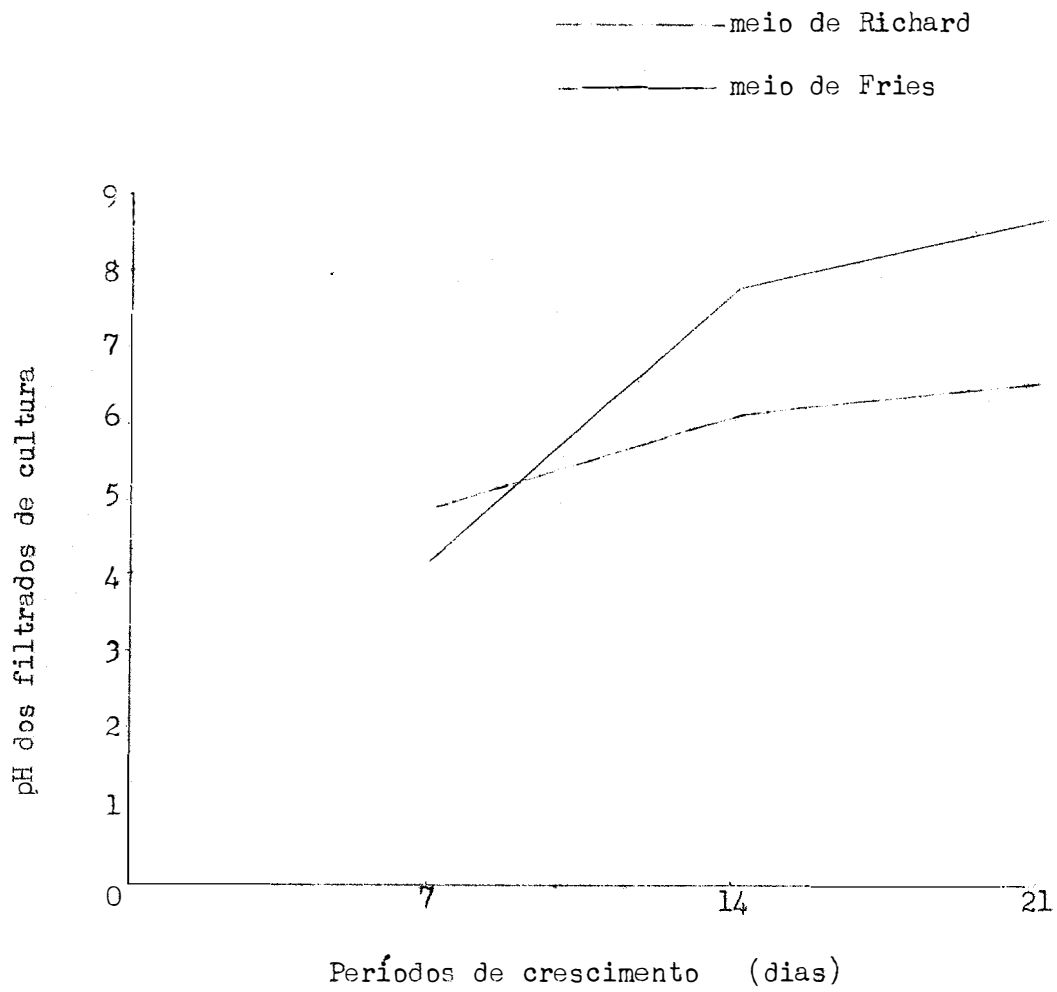


Gráfico n.º 2 - Concentração hidrogen-iônica para os diferentes meios de cultura e períodos de cultivo de Fusarium moniliforme

4.1.3 - Efeito do período de cultivo e composição do meio sobre a produção de toxina

4.1.3.1 - Bioensaio I

Os resultados obtidos para o alongamento das raízes principais e sua análise da variância são apresentados, respectivamente, nos Quadros V e VI do Apêndice.

A análise da variância revelou diferenças altamente significativas para os efeitos de meios, períodos, diluições, interações e tratamentos adicionais.

As médias dos comprimentos da raiz principal para os meios de cultura, períodos de cultivo e diluições, expressas em cm, foram:

$\hat{m}_{\text{Richard}} = 3,45$	$\hat{m}_{7 \text{ dias}} = 3,32$	$\hat{m}_{1:10} = 2,52$
$\hat{m}_{\text{Fries}} = 3,30$	$\hat{m}_{14 \text{ dias}} = 3,18$	$\hat{m}_{1:50} = 3,58$
$\hat{m}_{\text{cevada}} = 3,18$	$\hat{m}_{21 \text{ dias}} = 3,43$	$\hat{m}_{1:100} = 3,82$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, tanto para meios como para períodos e diluições, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,18$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,20$  cm.

O teste de Tukey revelou que o alongamento das raízes principais no meio de cevada diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, daquele observado no meio de Richard, enquanto que os dados obtidos para os meios de Richard e de Fries não mostraram diferença significativa entre si.

Quanto aos períodos de cultivo, foi observado que o alongamento das raízes principais verificado para o período de 14 dias diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, daquele observado para o período de 21 dias, sendo que os dados obtidos para este último caso não diferiram dos obtidos para o período de 7 dias.

Com relação as diluições, todas as três mostraram-se diferentes entre si, ao nível de 1% de probabilidade.

Desdobrando-se os graus de liberdade obtidos para as interações meios x períodos e períodos, meios x diluições e meios, períodos x diluições e períodos, foram obtidas as análises apresentadas, respectivamente, nos Quadros VII, VIII e IX do Apêndice.

As médias para as interações meios x períodos, para os estudos dos efeitos de períodos de cultivo dentro de meios de cultura, são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Médias para o comprimento da raiz principal, em cm, para interações meios x períodos

Períodos de Cultivo	Meios de cultura		
	Richard	Fries	Cevada
7 dias	3,32	3,04	3,61
14 dias	3,20	3,33	3,02
21 dias	3,82	3,54	2,93

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,27$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,34$  cm

Comparando-se as médias obtidas para o alongamento das raízes para períodos dentro de cada meio, foi observado que o período de 21 dias, dentro do meio de Richard, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos períodos de 7 e 14 dias, os quais não diferiram entre si. Para o meio de Fries, o dado obtido para o período de 7 dias diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, do período de 21 dias e ao nível de 5% de probabilidade do período de 14 dias, enquanto que no meio de cevada, o dado obtido para o período de 7 dias diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos períodos de 14 e 21 dias, os quais não diferiram entre si.

As médias para a interação meios x diluições, para os estudos dos efeitos de meios dentro de diluições, são apresentadas no Quadro 2 .

Quadro 2 - Médias, para o comprimento da raiz principal, em cm, para a interação meios x diluições

Meios de Cultura	Diluições		
	1 : 10	1 : 50	1 : 100
Richard	2,83	3,66	3,86
Fries	2,51	3,61	3,78
Cevada	2,23	3,49	3,83

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,27$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,34$  cm

O teste de Tukey revelou que os alongamentos de raízes principais observados para os três meios de cultura, dentro da diluição 1:10, diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, ao passo que para as diluições 1:50 e 1:100 não foram observadas diferenças significativas. O meio de Richard dentro da diluição 1:10, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade do meio de cevada.

As médias para a interação períodos x diluições, para os estudos dos efeitos de períodos de cultivo dentro de diluições, são apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Médias, para o comprimento da raiz principal, em cm, para a interação períodos x diluições

Períodos de Cultivo	Diluições		
	1:10	1:50	1:100
7 dias	2,65	3,62	3,70
14 dias	2,21	3,49	3,84
21 dias	2,70	3,65	3,93

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,27$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,34$  cm

Comparando-se as médias de períodos dentro de cada diluição, foi observado que o período de 7 dias na diluição 1:10 diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos períodos 14 e 21 dias, os quais não diferiram entre si. Não foram notadas diferenças significativas entre os períodos dentro das diluições 1:50 e 1:100.

As médias para os tratamentos do fatorial e tratamentos adicionais, considerados como testemunhas, são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Médias, para o comprimento das raízes principais, expressas em cm, obtidas para extratos de meios de cultura com toxina, sem toxina e água

Meios de Cultura	Diluições	Extratos com toxina			Extratos sem toxina (Tratamentos adicionais)
		Períodos de cultivo			
		7 dias	14 dias	21 dias	
Richard	1:10	2,45	2,29	3,75	3,96
	1:50	3,74	3,41	3,81	
	1:100	3,78	3,91	3,87	
Fries	1:10	2,23	2,55	2,75	2,41
	1:50	3,35	3,54	3,93	
	1:100	3,53	3,89	3,93	
Cevada	1:10	3,28	1,79	1,61	3,84
	1:50	3,75	3,51	3,20	
	1:100	3,79	3,74	3,97	
Água					3,69



As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,24$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,27$  cm

O teste de Tukey revelou que o extrato obtido para o meio de Fries sem toxina, tratamento adicional, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos tratamentos meio de Richard, meio de cevada, extratos sem toxina, e água, os quais não diferiram significativamente entre si. Este teste também revelou que, na diluição 1:10, o alongamento das raízes obtidos para o meio de Fries sem toxina, usado como testemunha, não diferiu significativamente para os dados obtidos para os três períodos de cultivo. Por outro lado, o alongamento das raízes observado para o meio de Richard, sem toxina, também na diluição 1:10, só não diferiu significativamente daquele observado para o extrato do mesmo meio onde foi cultivado o fungo durante um período de 21 dias. O alongamento de raízes observados no meio de cevada sem toxina, usado como testemunha, na diluição 1:10, diferiu significativamente dos dados obtidos para o extrato do mesmo meio onde foi cultivado o fungo para os três períodos de cultivo.

#### 4.1.3.2 - Bioensaio II

Os resultados obtidos neste ensaio e sua análise da variância são apresentados, respectivamente, nos Quadros X e XI do Apêndice.

A análise da variância revelou diferenças altamente significativas para os efeitos de meios, períodos, diluições, interações e tratamentos adicionais.

As médias para os meios de cultura, períodos de cultivo e diluições, expressas em cm, foram:

$\hat{m}_{\text{Richard}} = 3,40$	$\hat{m}_{7 \text{ dias}} = 3,32$	$\hat{m}_{1:10} = 2,45$
$\hat{m}_{\text{Fries}} = 3,32$	$\hat{m}_{14 \text{ dias}} = 3,16$	$\hat{m}_{1:50} = 3,63$
$\hat{m}_{\text{cevada}} = 3,13$	$\hat{m}_{21 \text{ dias}} = 3,36$	$\hat{m}_{1:100} = 3,77$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, tanto para meios como para períodos e diluições, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,11$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,14$  cm

O teste de Tukey revelou que os alongamentos das raízes principais observados para o meio de cevada com toxina, diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos dados obtidos para os meios de Fries e Richard, os quais não diferiram entre si.

Com relação aos períodos de cultivo, foi observado que o alongamento das raízes observado para o período de 14 dias diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, daqueles observados para o período de 21 dias e, ao nível de 5% de probabilidade, do período de 7 dias, enquanto que os dados obtidos para os períodos de 7 e 21 dias não diferiram significativamente entre si.

Quanto as diluições, estas apresentaram diferenças altamente significativas entre si.

As médias para os tratamentos do fatorial e tratamentos adicionais, considerados como testemunhas, são apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5 - Médias, expressas em cm, para o alongamento de raízes obtidas em extratos de meios de cultura com e sem toxina e água

Meios de Cultura	Diluições	Extratos com toxina			Extratos sem toxina (Tratamentos adicionais)
		Períodos de cultivo			
		7 dias	14 dias	21 dias	
Richard	1 : 10	2,42	2,13	3,39	3,72
	1 : 50	3,67	3,83	3,77	
	1 : 100	3,70	3,85	3,88	
Fries	1 : 10	2,03	2,49	2,85	2,21
	1 : 50	3,58	3,87	3,82	
	1 : 100	3,65	3,77	3,80	
Cevada	1 : 10	3,03	1,93	1,75	3,82
	1 : 50	3,97	3,03	3,17	
	1 : 100	3,93	3,57	3,82	
Água					3,80

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

- 1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,17$  cm
- 2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,19$  cm

O teste de Tukey revelou que o dado obtido para o extrato obtido do meio de Fries sem toxina, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, dos dados obtidos para os tratamentos meio de Richard, meio de cevada, ambos sem toxina, e água, os quais não di-

feriram ente si. Também foi observado que o alongamento das raízes obtido, na diluição 1:10 para o meio de Fries sem toxina, usado como testemunha, não diferiu significativamente daquele obtido para o extrato do mesmo meio onde foi cultivado o fungo, durante o período de 7 dias de cultivo, porém, diferindo significativamente dos dados obtidos para o extrato onde o fungo foi cultivado durante os períodos 14 e 21 dias de cultivo. Os resultados dos demais tratamentos adicionais diferiram significativamente daqueles obtidos para os extratos dos meios correspondentes, onde o fungo foi cultivado durante três períodos de cultivo, para as diluições correspondentes.

#### 4.2 - Experimento II - Efeito da Toxina no Desenvolvimento da Raiz Principal de Sementes Germinadas de Oito Cultivares de Milho

Os resultados obtidos para este experimento e sua análise da variância são apresentados, respectivamente, nos Quadros XII e XIII do Apêndice.

A análise da variância revelou diferenças altamente significativas para o alongamento das raízes principais dos cultivares e efeitos da toxina no desenvolvimento das raízes principais.

As médias para os cultivares, expressas em cm, foram:

$\hat{m}_{\text{centralmex}}$	= 3,01	$\hat{m}_{\text{Hmd 7479}}$	= 3,13
$\hat{m}_{\text{Ag - 25}}$	= 3,72	$\hat{m}_{\text{Cateto São Simão}}$	= 3,37
$\hat{m}_{\text{Ag - 28}}$	= 3,23	$\hat{m}_{\text{ESALQ HV - 1}}$	= 3,72
$\hat{m}_{\text{Ag - 157}}$	= 2,72	$\hat{m}_{\text{Piramex}}$	= 3,28

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,69$  cm

2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,84$  cm

O teste de Tukey revelou que o alongamento de raízes principais observado para Ag - 25 e ESALQ HV - 1 diferiram daquele observado para Ag - 157 , ao nível de 1% de probabilidade, e de centralmex , ao nível de 5% de probabilidade. Os demais cultivares não diferiram entre si.

As médias para o alongamento das raízes principais para os tratamentos com toxina e sem toxina, expressas em cm , foram:

$$\hat{m}_{\text{com toxina}} = 2,22$$

$$\hat{m}_{\text{sem toxina}} = 4,33$$

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, foi de 0,29 cm. Este teste revelou que o alongamento das raízes para os tratamentos com toxina diferiram significativamente daqueles obtidos para tratamentos sem toxina.

#### 4.3 - Experimento III - Efeito do Período de Conservação da Toxina sobre sua Atividade

Os resultados referentes ao experimento, realizado oito meses após a obtenção dos extratos, com relação ao efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade, são apresentados no Quadro XIV do Apêndice, juntamente com os dados correspondentes obtidos em bioensaios anteriores.

A análise da variância em conjunto é apresentada no Quadro XV do Apêndice.

A análise da variância revelou diferenças altamente significativas, no tocante ao desenvolvimento das raízes para os efeitos de meios de cultura, não sendo observadas diferenças significativas para períodos de conservação das "soluções de toxina" e interação meios x períodos.

As médias para os meios de culturas, expressas em cm, foram:

$$\hat{m}_{\text{Richard}} = 2,18$$

$$\hat{m}_{\text{cevada}} = 1,78$$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1 - Ao nível de 5% de probabilidade  $\Delta = 0,24$  cm

2 - Ao nível de 1% de probabilidade  $\Delta = 0,31$  cm

O teste de Tukey revelou que os meios diferiram significativamente entre si, sendo que no meio de cevada foi observado uma maior inibição das raízes principais.

## 5 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os efeitos do período de cultivo sobre o desenvolvimento do fungo Fusarium moniliforme Sheld., considerando-se os dois meios de cultura usados, mostraram que o fungo apresentou um ganho em peso seco de micélio até aos 14 dias. Aos 21 dias, de um modo geral, houve uma redução, embora não significativa, que provavelmente se deva a autólise, manifestando-se um declínio no peso seco do micélio. A curva obtida, considerando-se o longo intervalo entre observações, apresenta alguns pontos semelhantes àqueles descritos por COCHRANE (3). Segundo ele, a curva típica de crescimento para um fungo é caracterizada por três fases principais:

- a) uma fase de nenhum crescimento aparente ;
- b) uma fase de crescimento rápido e aproximadamente linear ;
- c) uma fase de nenhum crescimento ou autólise e declínio em peso seco de micélio.

Quanto aos efeitos da composição dos meios de cultura no desenvolvimento do fungo, estes apresentaram diferenças altamente significativas entre si, sendo observado um maior desenvolvimento no meio de Richard quando comparado com aquele no meio de Fries. Isto, provavelmente, seja decorrência do fato do meio de Richard ser mais rico em carboidrato e outros elementos mais facilmente utilizáveis pelo fungo.

Com relação ao efeito da concentração hidrogen-iônica, foi verificado que a mesma diminuiu durante os primeiros 14 dias, ocasião, em que foi verificado um aumento no peso seco de micélio, de aproximadamente 10 a 1.000 vezes, respectivamente, nos meios de Richard e Fries. Para os 7 dias seguintes, ocasião em que foi notado uma redução no peso seco do micélio, a diminuição da concentração hidrogen-iônica nos dois meios foi menor quando comparada à diminuição observada nos 14 primeiros dias. Conforme COCHRANE (3), este fato provavelmente se deva a absorção de ions ou liberação de amônia dos compostos nitrogenados.

De um modo geral, comparando-se o desenvolvimento do fungo nos dois meios de cultura usados no presente trabalho com a concentração hidrogen-iônica, foi verificado que a concentração hidrogen-iônica, apresentou uma diminuição durante os três períodos de cultivo estudados, inclusive quando o fungo entrou em autólise, enquanto que o peso seco de micélio aumentou até aos 14 dias, havendo em seguida um declínio.

Os resultados para o alongamento da raiz principal de sementes germinadas, obtidos no bioensaio I, mostraram efeitos diferentes para os extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura.

Embora ainda não tivesse sido testada para Fusarium moniliforme, até o presente momento, a capacidade produtora de toxina no meio



de Fries, esta já era conhecida para outros gêneros de fungos, segundo PRINGLE & SCHEFFER (18) , LUKE & WHEELER (14) , COMSTOCK & SCHEFFER (4) e YODER (29). Por outro lado, já é conhecido o emprego do meio de Richard para produção de toxina, não só para Fusarium moniliforme GAUMANN (9) , VIDHYASERKARAN et alii (26) , como também para outras espécies de Fusarium WINSTEAD & WALKER (27) , GAUMANN (9) , FAHMY (7) e WOLF & WOLF (28).

SMEDEGARD - PETERSEN & NELSON (22) , estudando o efeito da toxina do fungo Cochliobolus heterostrophus na inibição do alongamento de raízes de plântulas de milho, observou que o meio de Fries apresentou um efeito na inibição do alongamento das raízes, mesmo quando o fungo não tenha sido cultivado no meio. Fato semelhante foi verificado no presente trabalho, quando o extrato do meio sem toxina foi usado como testemunha na diluição 1:10 . Isto, provavelmente, pode ser atribuído à concentração de sais no meio.

O meio de cevada em grãos, embora não fosse encontrada na literatura referência quanto ao seu emprego para produção de toxinas de fungo, revelou ser um bom substrato para a produção de toxina por Fusarium moniliforme , podendo substituir com vantagens os meios de Richard e Fries.

De maneira geral, comparando-se os períodos de cultivo com a produção de toxina nos diferentes meios de cultura, foi verificado que no meio de Richard a maior inibição do alongamento da raiz principal ocorreu aos 14 dias, quando foi determinado o maior peso seco de micélio. Após este período, houve um declínio no peso seco e uma diminuição do princípio tóxico, o qual não foi detectado aos 21 dias de cultivo. Tal fato sugere, que durante este período, a toxina tenha sido

metabolizada pelo próprio fungo ou inativada de alguma maneira.

Com relação ao meio de Fries, foi verificado que a maior inibição do alongamento da raiz principal ocorreu aos 7 dias, sendo o maior peso seco de micélio determinado aos 14 dias. Como já discutido anteriormente, este meio é capaz de inibir raízes de plântulas mascarando um possível efeito da toxina de Fusarium moniliforme. A maior inibição verificada aos 7 dias de cultivo, possivelmente seja atribuída aos sais que ainda não foram metabolizados pelo fungo.

Quanto ao meio de cevada, embora não possa ser determinado o crescimento do fungo neste meio, foi verificado que a maior inibição do alongamento da raiz principal ocorreu aos 21 dias. Ao contrário dos extratos obtidos dos meios de Richard e Fries, foi verificado que os extratos do meio de cevada provocou um aumento gradativo da inibição do alongamento da raiz principal durante os três períodos de cultivo. Estes resultados mostram que é de grande importância o conhecimento do período de cultivo nos diferentes meios de cultura para produção de toxina. É possível que o máximo de produção de toxina em meio de cevada não tenha sido alcançado após 21 dias de cultivo.

Com relação as diluições, estas apresentaram grandes diferenças entre si, no tocante a inibição das raízes. Considerando-se todos os meios de cultura e períodos de cultivo, foi verificado que para diluição 1:10 a inibição do alongamento das raízes principais das plântulas foi aproximadamente de 50%, enquanto que para as diluições 1:50 e 1:100 não foi evidenciado nenhuma diferença significativa, quanto ao efeito sobre o tamanho das raízes. Isto é atribuído a uma drástica redução do princípio tóxico nas diluições 1:50 e 1:100 fa-

zendo com que a atividade da toxina não possa ser detectada a estas concentrações.

Quanto as interações, os resultados obtidos para os estudos dos efeitos dos períodos de cultivo dentro dos meios de cultura, mostraram que, para o meio de Richard, os períodos de 7 e 14 dias mostraram as mesmas tendências não havendo diferenças significativas entre suas médias. Porém, diferiram significativamente do período de 21 dias. Para o meio de Fries, foi verificado que o período de 7 dias diferiu significativamente do período de 21 dias, havendo porém uma menor redução quando comparado com o período de 14 dias. Quanto aos períodos dentro do meio de cevada, foi verificado que houve uma maior produção de toxina durante o período de 21 dias, quando comparado com os períodos de 7 e 14 dias. Estes dados revelaram que a quantidade de toxina produzida nos diferentes períodos diferiu para os diferentes meios de cultura.

Com referência aos efeitos dos meios de cultura dentro das diluições, considerando-se todos os períodos de cultivo, os resultados obtidos mostraram que para a diluição 1:10, o meio de cevada apresentou uma maior inibição do alongamento de raízes de plântulas, enquanto que para as diluições 1:50 e 1:100 todos os meios apresentaram resultados semelhantes, não apresentando diferenças significativas.

Os resultados obtidos para os efeitos dos períodos de cultivo dentro das diluições, considerando-se todos os meios de cultura, mostraram que para a diluição 1:10 a maior detecção ocorreu aos 14 dias de cultivo, enquanto que para as diluições 1:50 e 1:100 todos os períodos não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados obtidos para o bioensaio II , confirmaram os resultados do bioensaio I . Isto mostra que, embora sendo realizados em épocas diferentes, mas nas mesmas condições, os efeitos dos extratos obtidos dos meios de cultura e períodos de cultivo usados no presente trabalho foram semelhantes.

Quanto ao experimento II , sobre o efeito da toxina sobre o desenvolvimento da raiz principal de oito cultivares de milho, foi verificado que o cultivar Ag - 157 , mostrou-se mais sensível a toxina, apresentando maior inibição no alongamento das raízes principais das plântulas. Por outro lado, os demais cultivares comportaram-se semelhantemente, não apresentando diferenças significativas.

Já que existe uma diferença quanto ao comportamento de cultivares de milho em relação a inibição do alongamento da raiz principal, será interessante saber se este comportamento está relacionado com a resistência do colmo ao patógeno em questão.

No experimento III , foi estudado o efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade, sendo analisados os dados obtidos nos bioensaios I , II e experimento III . Não foi evidenciado nenhuma diferença significativa quanto a variação do tamanho das raízes principais para os períodos de conservação da toxina estudados no presente trabalho. Os resultados obtidos mostraram que não foi detectada perda na atividade da toxina, após um período de armazenamento por oito meses a  $- 18^{\circ}\text{C}$  . Este fato é importante, pois permite a utilização da toxina durante um período suficientemente longo para a realização de testes biológicos como também trabalhos visando melhor compreender a natureza da toxina produzida. Como já demonstrado por KIRSEY et alii (11) ,

foi detectada a produção de "moniliformina" por Fusarium moniliforme, ao passo que GAUMANN (9) revelou a possibilidade de produção de mais de uma toxina. No presente trabalho não foi possível detectar a natureza da toxina, uma vez que os trabalhos foram realizados com uma solução de toxina parcialmente purificada. É de alto interesse que se desenvolvam trabalhos no sentido de purificar e melhor conhecer a natureza da(s) toxina(s) em questão.

## 6 - CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir o que se segue:

- 1 - O crescimento do fungo variou com os períodos de cultivo e composição de meios de cultura, sendo que, o crescimento máximo foi determinado no meio de Richard durante o período de 14 dias de cultivo.
- 2 - A concentração hidrogen-iônica variou consideravelmente durante o crescimento nos três períodos de cultivo, sendo que a maior diminuição foi observada entre os períodos de 7 e 14 dias.
- 3 - A produção de toxina variou com a composição do meio e idade das culturas, sendo que, a maior produção foi detectada no meio de cevada, durante o período de 21 dias de cultivo.

- 4 - Considerando-se a composição dos meios de cultura, verificou-se que no meio de Richard a produção máxima de toxina ocorreu aos 14 dias, ocasião em que foi determinado o maior peso seco de micélio, enquanto que os extratos obtidos do meio de Fries, devem ter mascarado um possível efeito da toxina, uma vez que este meio, sem toxina, na diluição 1:10, causou inibição do alongamento das raízes principais das plântulas.
- 5 - Os cultivares reagiram diferentemente em presença da toxina.
- 6 - A toxina pode ser conservada a  $-18^{\circ}\text{C}$  sem perder sua atividade, pelo menos, cerca de oito meses.

## 7 - RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos o estudo dos efeitos do período de cultivo, composição do meio de cultura e pH do mesmo sobre o desenvolvimento e produção de toxina pelo fungo Fusarium moniliforme Sheldon.

O fungo foi cultivado sob condições de escuro e temperatura controlada para 27°C, em meios de composição química diferente, durante três diferentes períodos de cultivo.

O crescimento do fungo foi determinado através do peso seco do micélio, após este ter sido removido dos meios líquidos, por filtração a vácuo, mediante a utilização de um funil de Buchner e secado em estufa a 80°C durante 24 horas. O crescimento máximo foi observado no meio de Richard durante o período de 14 dias de cultivo.



O pH do filtrado de cada cultura, foi determinado, mediante o uso de um potenciômetro, tendo sido observado um aumento do pH durante os três períodos de cultivo, nos dois meios testados.

Para o estudo da produção de toxina, foram colocadas sementes de milho para germinar em placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água destilada. Após 48 horas, foram selecionadas as sementes germinadas que apresentavam raiz principal medindo aproximadamente 5 mm de comprimento, as quais foram colocadas em número de cinco por placa, contendo 5 ml de toxina diluída em água. As diluições utilizadas, testadas separadamente, foram: 1:10, 1:50 e 1:100.

O método de avaliação utilizado consistiu em medir o comprimento das raízes principais das sementes germinadas, após 48 horas do início do tratamento com toxina.

Os resultados obtidos revelaram uma inibição aproximadamente de 50% do alongamento da raiz principal para a diluição 1:10.

Foi encontrado entre os diferentes meios de cultura e períodos de cultivo, diferença na produção de toxina, tendo sido detectada maior produção no meio de cevada, durante o período de 21 dias.

O extrato do meio de Fries, sem toxina, apresentou uma inibição do alongamento das raízes principais das plântulas, semelhante aquela apresentada pelo extrato do mesmo meio onde o fungo foi cultivado.

Quanto a conservação da toxina, foi demonstrado ser possível mantê-la a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ , sem perda de atividade, pelo menos durante um período de oito meses.

8 - SUMMARY

The objectives of this research were to study the effects of length of growth period, composition of three culture media on the development of Fusarium moniliforme Sheldon , pH of the media and the toxin produced.

The fungus was increased in dark and at controlled temperature of 27<sup>0</sup>C in media of different chemical composition under three different growth periods.

The growth of the fungus was determined by the dry weight of the mycelium, after removal from the liquid media by vacuum filtration using a Buchner funnel and dried in oven held at 80<sup>0</sup>C for 24 hours. The greatest growth was observed after a period of 14 days in Richard's medium.

The pH of the filtrate of each culture was determined by a pH meter. An increase of pH was observed throughout the three different growth periods in two media used.

To study the production of toxin, corn seeds placed in Petri dishes containing filter paper moistened with distilled water. After 48 hours, germinating seeds were selected that had main roots of approximately 5 mm in length. Five were placed in Petri dishes containing 5 ml of toxin dilution of either 1:10, 1:50 or 1:100.

Evaluation consisted of measurement of the main root length 48 hours after the inhibition of the toxin treatment.

The 1:10 dilution inhibited the main root elongation by 50%.

The highest production of toxin obtained in sterilized barley seed medium after a 21 days period.

The control extract of Fries medium, without toxin, resulted in about the same inhibition of growth of the main root of the seedlings as the inhibition by the extract of the same medium where the fungus was grown.

It was demonstrated that the toxin could be stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  without loss of activity for at least 8 months.

9 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - BOOTH, C. The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 238 pp. 1971.
- 2 - CHI, C. C. and W. HANSEN. Relation of temperature, pH and nutrition to growth and sporulation of Fusarium spp. from red clover. Phytopathology, 54: 1053-1058. 1964.
- 3 - COCHRANE, V. W. Physiology of Fungi. Ed. John Willey & Sons, Inc. New York. 524 pp. 1958.
- 4 - COMSTOCK, J. C. and R. P. SCHEFFER. Production and relative host-specificity of a toxin from Helminthosporium maydis race T. Plant Disease Reporter, 56: 247-251. 1972.
- 5 - DJAKAMIHARDJA, S. , G. E. SCOTT and M. C. FUTRELL. Seedling reaction on inbreds and single crosses of maize to Fusarium moniliforme. Plant Disease Reporter, 54: 307-310. 1970.

- 6 - EDWARDS, E. T. Studies on Gibberella fujikuroi var. subglutinans, the hitherto undescribed ascigerous stage of Fusarium moniliforme var. subglutinans, and on its pathogenicity on maize in New South Wales. The Review of Applied Mycology, 15: 359-360. 1936.
- 7 - FAHMY, T. The production by Fusarium solani of a toxic excretory substance capable of causing wilting plants. Phytopathology, 13: 543-550. 1923.
- 8 - FUTRELL, M. C. and M. KILGORE. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by Fusarium moniliforme. Plant Disease Reporter, 53: 213-215. 1969.
- 9 - GAUMANN, E. Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology 47: 342-357. 1957.
- 10 - HOOKER, A. L. , D. R. SMITH , S. M. LIM and J. B. BECKETT. Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to Helminthosporium maydis. Plant Disease Reporter 54: 708-712. 1970.
- 11 - KIRSEY, J. W. , H. G. CUTLER , B. L. DOUPNIK and J. C. PECHAM. Toxin from Fusarium moniliforme: Effects on Plants and Animals. Science, 179: 1324-1326. 1973.
- 12 - KUO, M. S. and R. P. SCHEFFER. Factors affecting activity of Helminthosporium carbonum toxin on corn plants. Phytopathology 59: 1770-1782. 1969.
- 13 - LUKE, H. H. and H. E. WHEELER. Toxin production by Helminthosporium victoriae. Phytopathology, 45: 453-458. 1955.
- 14 - \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ and A. T. WALLACE. Victoria-type resistance to crown rust separated from susceptibility to Helminthosporium blight in oats. Phytopathology, 50: 205-209. 1960.

- 15 - MESSIAEN, C. M. La systématique du genre Fusarium selon SNYDER et HANSEN. Revue de Patol. Veget. et d'Entom. Agr. 38: 253-266. 1959.
  
- 16 - ~~—————~~ and R. CASSINI. Recherches sur les fusarioses. IV. La systématique des Fusarium. Annales des Epiphyties, 19: 387-454. 1968.
  
- 17 - MOHAMED, H. A. , W. E. ASHOUR. , A. R. SIRRY and M. F. SAAD. Fungi causing seedlings blight of corn in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter, 52: 84-86. 1968.
  
- 18 - PRINGLE, R. B. and R. P. SCHEFFER. Purification of the selective toxin of Periconia circinata. Phytopathology, 53: 785-787. 1963.
  
- 19 - RUIZ - TAPIADOR y M. LORDUY. Metodos de cultivo e inoculacion de algunas enfermedades criptogamicas del maiz. Conf. Inst. Nac. Invest. Agron. (Madrid) 53-74. 1965.
  
- 20 - SAAD, S. M. , J. M. HALLOIN and D. J. HAGEDORNE. Production, Purification and Bioassay of Tentoxin. Phytopathology, 60: 415-418. 1970.
  
- 21 - SCOTT, G. E. and M. C. FUTRELL. Response of maize seedlings to Fusarium moniliforme and a toxic material extracted from this fungi. Plant Disease Reporter, 54: 483-486. 1970.
  
- 22 - SMEDEGARD - PETERSEN, V. and R. R. NELSON. The production of host-specific pathotoxin by Cochliobolus heterostrophus. Canadian Journal of Botany, 47: 951-957. 1969.
  
- 23 - SNYDER, W. C. and H. N. HANSEN. The species in Fusarium with reference to discolor and other section. American Journal of Botany, 32: 637-666. 1945.

- 24 - STEINER, G. W. and R. S. BYTHER. Partial characterization and use of a Host-Specific Toxin from Helminthosporium sacchari on Sugarcane. Phytopathology, 61: 691-695. 1971.
- 25 - TUIITE, J. Plant Pathological Methods. Fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 239 pp. 1969.
- 26 - VIDHYASERKARAN, P. , C. L. SUBRAMANIAN and C. V. GOVINDASWAMY. Production of toxins by seed-born fungi and its role in Paddy seed spoilage. Indian Phytopathology, 22: 518-528. 1970.
- 27 - WINSTEAD, N. N. and J. C. WALKER. Toxin metabolites of the pathogen in relation to Fusarium resistance. Phytopathology 44: 159-166. 1954.
- 28 - WOLF, F. T. and F. A. WOLF. A toxic metabolic product of Fusarium oxysporum var. nicotianae in relation to a wilting of tobacco plants. Phytopathology, 38: 292-298. 1948.
- 29 - YODER, O. C. A selective toxin produced by Phyllosticta maydis. Phytopathology, 63: 1361-1366. 1973.

10 -- APÉNDICE



Quadro I - Efeito do período de cultivo e composição dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de Fusarium moniliforme, medido em mg de peso seco de micélio

Meio de Cultura	Repetições	Períodos de cultivo		
		7 dias	14 dias	21 dias
Richard	I	211	733	584
	II	196	735	604
	III	379	752	594
	IV	350	519	591
Fries	I	158	353	277
	II	146	332	277
	III	142	313	302
	IV	138	351	289

Quadro II - Análise da variância para o efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento de Fusarium moniliforme

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Meios (M)	1	418.704	418.704	115,60 **
Períodos (P)	2	381.880	190.940	52,72 **
Interação (M x P)	2	49.395	24.697	6,82 **
Tratamentos	5	849.979	169.995	46,93 **
Resíduo	18	65.213	3.622	
Total	23	915.192		

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 15,51%

Quadro III - Análise da variância para o desdobramento dos graus de liberdade para o efeito de períodos dentro de meios

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Períodos dentro do meio de Richard	2	352.811	176.405	48,70 **
Períodos dentro do meio de Fries	2	78.463	39.231	10,83 **
Resíduo	18	65.192	3.622	

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quadro IV - Efeito da composição do meio e período de cultivo sobre a concentração hidrogen-iônica, expressa em pH

Meios de Cultura	Repetições	Períodos de cultivo		
		7 dias	14 dias	21 dias
Richard	I	4,90	6,30	6,50
	II	4,40	6,30	6,40
	III	5,40	6,00	6,80
	IV	5,10	6,20	6,50
Fries	I	4,00	8,00	8,60
	II	4,40	7,50	8,90
	III	4,50	7,50	8,80
	IV	4,00	8,50	8,60

Quadro V - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre a produção de toxina, expressa em inibição do alongamento da raiz principal.

Bioensaio I

Meios de Cultura	Repetições	Testemunhas	Períodos de Cultivo								
			7 dias		14 dias		21 dias				
			Diluições		Diluições		Diluições				
			1:10	1:50	1:100	1:10	1:50	1:100	1:10	1:50	1:100
Batata	I	4,30 <sup>++</sup>	2,18	3,76	3,72	2,30	3,50	3,84	4,08	3,70	3,90
	II	3,92	2,48	3,82	3,54	2,24	3,44	4,10	3,30	4,04	3,90
	III	3,66	2,70	3,64	4,08	2,34	3,30	3,78	3,88	3,70	3,86
Fries	I	2,70	2,08	3,74	3,38	2,64	3,70	3,90	2,44	3,86	3,96
	II	2,06	2,46	2,86	3,92	2,64	3,44	3,66	2,94	3,92	3,84
	III	2,46	2,14	3,46	3,30	2,38	3,48	4,10	2,86	4,02	3,98
Cevada	I	3,52	3,28	3,86	3,96	1,80	3,46	3,76	1,38	3,30	4,02
	II	3,72	3,20	3,84	3,90	2,12	3,56	3,54	1,54	3,22	4,18
	III	4,28	3,36	3,56	3,50	1,46	3,52	3,92	1,92	3,08	3,72
Água	I	3,80									
	II	3,60									
	III	3,60									

(+) Os extratos obtidos para meios de cultura sem cultivo do patógeno, considerados como testemunhas, foram diluídos para a diluição 1:10, com excesso do tratamento água.

(++) Cada valor representa a média dos comprimentos, expressos em cm, das raízes principais de cinco sementes germinadas em cada placa de Petri.

Quadro VI - Análise da variância para o efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre a produção de toxina, expressa em inibição do alongamento da raiz principal

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Meios (M)	2	0,95	0,48	8,00 **
Períodos (P)	2	0,82	0,41	6,83 **
Diluições (D)	2	25,87	12,94	215,67 **
Interação (M x P)	4	4,66	1,17	19,50 **
Interação (M x D)	4	0,86	0,22	3,67 **
Interação (P x D)	4	0,86	0,22	3,67 **
Interação (M x P x D)	8	4,61	0,58	9,67 **
Tratamentos	26	38,63	1,49	24,83 **
Tratamentos Adicionais	3	4,64	1,55	25,83 **
Resíduo	63	3,65	0,06	
Total	92	46,92		

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 7,24%

Quadro VII - Análise da variância para o desdobramento dos graus de liberdade para o efeito de períodos dentro de meios

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Período dentro de meio de Richard	2	1,90	0,95	15,83 **
Período dentro do meio de Fries	2	1,12	0,56	9,33 **
Período dentro do meio de cevada	2	2,45	1,225	20,42 **
Resíduo	63	3,65	0,06	

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quadro VIII - Análise da variância para o desdobramento dos graus de liberdade para o efeito de meios dentro de diluições

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Meio dentro de 1 : 10	2	1,64	0,82	13,67 **
Meio dentro de 1 : 50	2	0,14	0,07	1,17
Meio dentro de 1 : 100	2	0,03	0,015	0,25
Resíduo	63	3,65	0,06	

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quadro IX - Análise da variância para o desdobramento dos graus de liberdade para o efeito de períodos dentro de diluições

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Período dentro de 1 : 10	2	1,31	0,66	11,00 **
Período dentro de 1 : 50	2	0,13	0,07	1,17
Período dentro de 1 : 100	2	0,24	0,12	2,00
Resíduo	63	3,65	0,06	

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quadro X - Efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre a produção de toxina, expressa em inibição do alongamento da raiz principal.

Bioensaio II

Meio de Cultura	Repetições	Testemunhas (+)	Períodos de Cultivo								
			7 dias			14 dias			21 dias		
			Diluições			Diluições			Diluições		
			1:10	1:50	1:100	1:10	1:50	1:100	1:10	1:50	1:100
Richard	I	3,95 <sup>++</sup>	2,16	3,50	3,65	2,30	3,70	3,90	3,00	4,00	3,80
	II	3,70	2,60	3,80	3,60	2,00	3,80	3,85	3,80	3,70	3,85
	III	3,50	2,50	3,70	3,85	2,10	4,00	3,80	3,36	3,60	4,00
Fries	I	2,06	2,00	3,64	3,60	2,32	3,90	3,80	2,84	3,85	4,00
	II	2,10	2,50	3,50	3,56	2,66	3,90	3,60	2,92	3,70	3,60
	III	2,48	1,58	3,60	3,80	2,50	3,80	3,90	2,80	3,90	3,80
Cevada	I	3,85	3,20	4,00	3,90	1,80	3,00	3,50	1,76	3,20	3,70
	II	3,70	2,90	3,80	4,00	2,00	3,00	3,50	1,70	3,30	3,85
	III	3,90	3,00	3,90	3,90	2,00	3,10	3,70	1,80	3,00	3,90
Água	I	4,00									
	II	3,60									
	III	3,80									

(+) Os extratos obtidos para meios de cultura sem o cultivo do patógeno, considerados como testemunhas, foram diluídos para a diluição de 1:10, com exceção do tratamento água.

(++) Cada valor representa a média dos comprimentos, expressos em cm, das raízes principais de cinco sementes germinadas em cada placa.



Quadro XI - Análise da variância para o efeito do período de cultivo e composição do meio de cultura sobre a produção de toxina, mediante a inibição do alongamento da raiz principal

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Meios (M)	2	1,10	0,55	18,33 **
Períodos (P)	2	0,59	0,30	10,00 **
Diluições (D)	2	28,51	14,26	475,33 **
Interação (M x P)	4	4,52	1,13	37,67 **
Interação (M x D)	4	0,57	0,14	4,67 **
Interação (P x D)	4	0,63	0,16	5,33 **
Interação (M x P x D)	8	2,56	0,32	10,67 **
Tratamentos	26	38,48	1,48	49,33 **
Tratamentos Adicionais	3	5,53	1,84	61,33 **
Resíduo	63	2,01	0,03	
Total	92	46,02		

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 5,15%

Quadro XII - Efeito da toxina no desenvolvimento da raiz principal de sementes germinadas de oito cultivares, quando usados os extratos do meio de cevada com e sem toxina

Cultivares	Extratos de meio de cevada					
	Com toxina			Sem toxina		
	Repetições			Repetições		
	I	II	III	I	II	III
Centralmex	1,90 <sup>+</sup>	1,66	2,60	4,00	3,76	4,16
Ag - 25	2,28	2,84	2,90	5,32	4,48	4,50
Ag - 28	2,14	2,08	2,68	4,28	4,08	4,16
Ag - 157	2,04	1,90	1,90	3,50	3,74	3,26
Hmd 7479	2,02	2,26	2,16	4,10	4,08	4,18
Cateto São Simão	2,02	2,30	2,32	4,00	5,42	4,20
ESALQ HV - 1	2,02	2,30	2,56	5,74	4,60	5,10
Piramex	2,04	1,90	2,40	4,92	4,58	3,84

(+) Cada valor corresponde a média, expressa em cm, dos comprimentos das raízes principais de cinco sementes germinadas.

Quadro XIII - Análise da variância para o comprimento das raízes principais de sementes germinadas de oito cultivares de milho, em extratos com e sem toxina

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Cultivares (C)	7	4,81	0,69	4,93 **
Toxina (T)	1	53,72	53,72	383,71 **
Interação (C x T)	7	1,60	0,23	1,64
Tratamentos	15	60,13	4,00	28,64 **
Resíduo	32	4,48	0,14	
Total	47	64,61		

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 11,28%

Quadro XIV - Estudo da influência do período de conservação da toxina sobre sua atividade. (Bioensaios I e II, e Experimento III, para concentrações de soluções 1:10 .

Meios de Cultura	Repetições	Bioensaio	Bioensaio	Experimento
		I	II	III
Richard	I	2,30 <sup>+</sup>	2,30	2,10
	II	2,24	2,00	2,20
	III	2,34	2,10	2,00
Cevada	I	1,38	1,76	1,92
	II	1,54	1,70	2,02
	III	1,92	1,80	1,98
Água	I	3,80	4,00	3,70
	II	3,60	3,60	4,04
	III	3,60	3,80	3,80

(+) Cada valor corresponde a média, expressa em cm, dos comprimentos das raízes principais de cinco sementes germinadas.

Quadro XV - Análise da variância para o efeito do período de conservação da toxina sobre sua atividade

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Meios de cultura (M)	2	20,0	10,0	250,00 **
Período de conservação	2	0,07	0,04	1,00
Interação (M x P)	4	0,025	0,006	0,15
Tratamentos	8	20,09	2,51	62,75 **
Resíduo	18	0,64	0,04	
Total	26	20,73		

(\*\*) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 7,75%