

OSVALDO PARADELA FILHO

**"COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE ENDOSPERMA DE MILHO
(*Zea mays* L.) EM RELAÇÃO AO *Fusarium moniliforme* Sheld."**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia Vegetal.

CAMPINAS, SP

1982

P211c

4544/BC



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: OSVALDO PARADELA FILHO

Nº de Identificação:

Endereço para Correspondência: Av. Barão de Itapura, 1481 - Campinas

Curso: Biologia Vegetal

Nome do Orientador: Prof. Dr. William José da Silva

Título da Dissertação ou Tese: Comportamento de mutantes de endosperma de milho (*Zea mays* L.) em relação ao *Fusarium moniliforme* Sheld.

Data proposta para a Defesa: 22.06.1982

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

06/05/82

Data

Osvaldo Paradelo Filho
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

OSVALDO PARADELA FILHO

**"COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE ENDOSPERMA DE MILHO
(*Zea mays* L.) EM RELAÇÃO AO *Fusarium moniliforme* Sheld."**

Orientador: Prof. Dr. WILLIAM JOSÉ DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia Vegetal.

**CAMPINAS, SP
1982**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

Aos meus pais, irmãs,
esposa e filhos

Dedico

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, e especialmente:

Ao Instituto Agronômico do Estado de São Paulo e ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas através de seu Departamento de Genética e Evolução, que possibilitaram a realização do curso e a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, Chefe do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo estímulo, auxílio, orientação decisiva, pelo conhecimento científico transmitido, e sobretudo pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias pela revisão dos originais e sugestões apresentadas.

Ao Dr. Jaciro Soave, Dr. Sérgio Almeida de Moraes, Eng^o. Agr^o. M.S. Mauro Hideo Sugimori, Eng^o. Agr^o. M.S. Ivan J. A. Ribeiro, Eng^o. Agr^o. M.S. Maria Angélica P. Geraldi, Eng^o. Agr^o. Adhair Ricci Júnior e a Biologista Margarida F. Ito, pelo incentivo, sugestões e auxílio durante a realização do presente trabalho.

À Biologista Valdete Zorate dos Santos pelo

auxílio prestado na realização dos trabalhos de laboratório.

Aos colegas de curso que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

	pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Isolamento de fungos de semente	4
2.2. Variabilidade em <i>F. moniliforme</i>	6
2.3. Crescimento micelial do fungo	8
2.4. <i>Fusarium moniliforme</i> em milho	9
3. OBJETIVO	16
4. MATERIAL E MÉTODO	18
4.1. Variantes em <i>F. moniliforme</i>	18
4.2. Coloração de núcleo de microconídio de <i>F. moniliforme</i>	19
4.3. Germoplasma	20
4.3.1 -Populações sintéticas	20
4.3.2 -Características dos genes mutan tes de endosperma	22
4.3.3 -Introdução de genes mutantes de endosperma nas populações origi nais	24
4.4. Ensaio de campo para inoculação de <i>F.</i> <i>moniliforme</i> em espiga	26
4.5. Frequência de <i>F. moniliforme</i>	27
4.5.1 -Sementes com pré-tratamento ...	27
4.5.2 -Sementes sem pré-tratamento ...	29
4.6. Crescimento micelial de <i>F. moniliforme</i> em meio líquido	29

4.7. Produção de micélio de <i>F. moniliforme</i> em meio de cultura	31
4.8. Crescimento radial de <i>F. moniliforme</i> ...	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Variantes em <i>F. moniliforme</i>	34
5.2. <i>F. moniliforme</i> em sementes com pré-tratamento pelo frio	36
5.3. <i>F. moniliforme</i> em sementes sem pré-tratamento	38
5.4. Crescimento de <i>F. moniliforme</i> em meio de cultura	43
6. DISCUSSÃO	49
6.1. Variabilidade de <i>F. moniliforme</i>	49
6.2. Ocorrência de <i>F. moniliforme</i> em sementes	51
7. CONCLUSÕES	62
8. RESUMO	64
9. SUMMARY	69
10. LITERATURA CITADA	73
11. APÊNDICE	83

1. INTRODUÇÃO

Vários aspectos de interesse econômico da cultura do milho têm sido estudados no Brasil. O setor de melhoramento tem contribuído decisivamente para o aumento de produtividade do cereal no país (PATERNIANI, 1980). Nessa área tem-se acumulado conhecimentos capazes de permitir a duplicação da produção de grão em áreas recomendadas para a cultura. Uma grande contribuição tem sido dada pela iniciativa oficial e pelas companhias de sementes, com a síntese contínua de híbridos comerciais. Para se ter uma idéia desse efeito basta citar que hoje cerca de 3 milhões de sacas de sementes, suficientes para o plantio de 7,5 milhões de ha, são distribuídas anualmente aos agricultores do país. Isso representa 60% do total de sementes necessárias para o plantio da área de milho no Brasil. Apesar do grande envolvimento de Instituições públicas de pesquisa e uma dezena de companhias de sementes, pouco se

tem feito na área de patologia do cereal. Aspectos de genética de tolerância de plantas aos patógenos do milho são apenas incipientes (MOURA, 1978; PEREIRA, 1976). Raros são os trabalhos referentes à ação de fungos causadores de podridões de espigas e do colmo (PARADELA, 1972; FERNANDES, 1975).

As podridões da espiga causadas principalmente pelo *Fusarium moniliforme*, além de acarretarem diminuição da produção, danificam as sementes e deterioram a qualidade do grão (KOEHLER, 1959), constituindo-se em eficiente veículo de disseminação de agentes de moléstias (NOBLE & RICHARDSON, 1968). Esse mesmo patógeno causa podridões do colmo que têm grande significado econômico, por acarretar o quebramento do colmo e reduzir a produtividade das plantas. Com o quebramento estimado entre 10 e 15%, e em alguns casos atingindo 30%, torna-se difícil e onerosa a colheita do cereal, acarretando sensíveis aumentos no custo de produção. (*) Espigas de plantas quebradas são difíceis de serem colhidas, permanecendo no terreno ou apodrecendo em contacto com o solo. Nos E.E.U.U. as podridões podem causar reduções na produção de grãos de até 10%, devido as perdas durante a colheita (KOEHLER, 1960).

Nos últimos anos, tem havido um certo interesse para a utilização de vários mutantes de endosperma de mi-

(*) SILVA, W.J. da. Informação sobre quebramento e custo de produção. Campinas, IAC, 1973 (Comunicação Verbal).

lho, que alteram significativamente a composição química do grão, dando-lhe excelente valor nutritivo. Com a melhoria da qualidade nutritiva da semente abre-se a possibilidade do cereal ficar mais vulnerável aos agentes causadores de podridões na espiga.

Torna-se, pois, importante o estudo do comportamento dos vários mutantes de endosperma do milho em relação ao *Fusarium moniliforme* Sheld., causador da podridão da espiga, para a orientação de programas de seleção e desenvolvimento de técnicas fitossanitárias para a proteção dos mutantes de alto valor nutritivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Isolamento de fungos de sementes

Várias técnicas têm sido empregadas para o isolamento de microrganismos de sementes. Essas técnicas variam principalmente com o patógeno e com o tipo de hospedeiro.

Diferentes métodos têm sido usados para o isolamento dos fungos de sementes de milho. Com referência ao substrato utilizado para o isolamento, várias alternativas já foram estudadas. Assim SCOTT (1971) fez uso do papel toalha, NWIGWE (1974) de papel mata-borrão e BOOTHROYD (1971) de papel de filtro. Por outro lado, MELCHERS (1956) utilizou meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar), enquanto que MEW & KOMMEDAHL (1972) lançaram mão de outro meio de cultura. BEDENDO (1978) usou ainda

um substrato de agar-água.

A desinfestação das sementes, assim como o isolamento do fungo, são bastante variáveis e vêm sendo feitos com técnicas não bem definidas. Assim, as substâncias empregadas, as concentrações e o tempo de imersão, são variáveis. WARMKE & SCHENCK (1971) utilizaram hipoclorito de sódio à 0,525% durante 30 minutos. Usando o mesmo sal, KUCHAROCK & KOMMEDAHL (1966) utilizaram uma concentração de 1% durante 1 minuto. MEW & KOMMEDAHL (1972) usaram o mesmo produto a 1% durante 2 minutos. PRITCHARD (1974), à 0,5% durante 10 minutos. CROSIER & BRAVERMAN (1971) à 1,5% durante 10 minutos. TUIE & CALDWELL (1971) à 5% durante 1 minuto, MELCHERS (1956) à 1% durante 2 minutos e BOOTHROYD (1971) usou uma solução comercial do sal, durante 5 minutos.

Na tentativa de estudar outros sais, SUMNER (1968) usou bicloreto de mercúrio à 1% durante 3 a 5 minutos e MOHAMED *et al.* (1967) o mesmo sal à 1% durante 2 minutos. FOLEY (1962) usou hipoclorito de cálcio à 4% e BEDENDO (1978) à 1% durante 10 minutos.

As temperaturas de incubação são também bastante variáveis. FOLEY (1962) usou 10 e 15°C, enquanto SUMNER (1968) optou por 20 e 25°C. MELCHERS (1956) usou de 23 a 27°C, OOKA *et al.* (1972) usaram 24°C, CROSIER & BRAVERMAN (1971) usaram 25°C, MOHAMED *et al.* (1967) usaram 27°C, enquanto NWIGWE (1974) preferiu 28°C. Finalmente BEDENDO (1978) testou várias temperaturas: 20, 25, 28 e

30°C e concluiu que 28°C é a melhor delas.

O tempo de incubação também tem sido muito variável. MORGAN (1971) usou 5 e 7 dias, PRITCHARD (1974) 7 dias, SUMNER (1968) de 7 a 21 dias, MOHAMED *et al.* (1967) 10 dias, WARMKE & SCHENCK (1971) usaram 9 e 10 dias, SCOTT (1971) usou de 10 a 14 dias e NWIGWE (1974) usou 18 dias. BEDENDO (1978) recomenda 5 dias, depois de estudar períodos de 3, 4, 5, 7 e 10 dias.

A inativação da semente através de agentes químicos ou físicos em alguns casos tem sido recomendada, dependendo do patógeno e do hospedeiro. Duas técnicas são frequentemente empregadas: tratamento pelo frio (-20°C) por um período de 12 a 24 horas, ou tratamento das sementes com 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) em diferentes concentrações e vários tempos de imersão. BEDENDO (1978) usou temperatura de -20°C em pré-tratamento e demonstrou que essa temperatura provoca a morte da semente sem causar inibição significativa no desenvolvimento do fungo presente no interior da semente.

2.2. Variabilidade em *Fusarium moniliforme*

O fungo *F. moniliforme* pertence a divisão *Eumicota*, sub-divisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Tuberculariaceae*.

Os primeiros estudos referentes à variabilidade de fungos do gênero *Fusarium* foram iniciados por

LEONIAN (1929). Esse autor trabalhou com 96 espécies diferentes e estudou cerca de 220 culturas. Analisando os setores dessas culturas mostrou que havia variação entre elas. Entre as espécies estudadas estava o *Fusarium moniliiforme*.

Paralelamente a esse trabalho, no mesmo ano, Brierly, citado por LEONIAN (1930), sugeriu que uma das causas da segregação setorial entre colônias de bactérias e fungos, poderia ser explicada pelo fenômeno da "mixoquimera" onde tubos germinativos e hifas de diferentes estirpes, variedades e mesmo espécies, poderiam fundir-se e dar origem a micélio contendo citoplasma e núcleo de diferentes tipos. Baseado nessa idéia, LEONIAN (1930) estudou a possibilidade de sintetizar novas estirpes de *Fusarium moniliiforme*, através da associação artificial de diferentes linhagens, em placas de Petri. Esse pesquisador trabalhou com três tipos de cultura designadas: tipo A, de cor roxa e micélio submerso, tipo B, de cor laranja e micélio aéreo e tipo C, intermediário entre os dois, e ora dando um tipo, ora outro. Verificou que a mixoquimera não era um fator capaz de explicar o aparecimento de novos tipos, atribuindo esse efeito ao fenômeno de dissociação.

HANSEN & SMITH (1932), estudando o mecanismo de variação de alguns fungos imperfeitos, inclusive uma espécie de *Fusarium*, sugeriram que a heterocariose deveria ser um fenômeno comum na fase assexuada de fungos.

Vários outros autores como HANSEN (1938),

BUXTON (1954), COY & TUVESON (1961), DHILLON *et al.* (1961), GARBER *et al.* (1961), BUXTON & WARD (1962), PARMETER *et al.* (1963), CAMARGO (1976) e SANCHEZ *et al.* (1976), estudando espécies de *Fusarium*, demonstraram a ocorrência de heterocariose, obtendo heterocários entre culturas de fungos desse gênero.

MING *et al.* (1966) isolaram através de ponta de hifa de formas selvagens de *F. fujikuroi*, três tipos nucleares diferentes. Esses tipos foram designados por roxo, vermelho e branco baseado na coloração produzida no meio de cultura desenvolvido por LEONIAN (1930). Prova-ram que a heterocariose pode ocorrer com todos os tipos nucleares. Com isso demonstraram a ocorrência de heterocariose para a forma selvagem de *F. fujikuroi*, e a implicação da variabilidade na patogenicidade do fungo. Os resultados obtidos indicaram que o tipo nuclear roxo foi o mais virulento, enquanto que o tipo branco foi o menos virulento. O tipo nuclear vermelho apresentou reação intermediária entre o tipo roxo e o tipo branco. A virulência do tipo selvagem ficou dentro dos limites de variação do tipo roxo e do branco.

2.3. Crescimento micelial do fungo

Dois são os critérios recomendados por LILLY & BARNETT (1951) para se medir crescimento de fungos. São eles o crescimento linear ou radial e o peso seco. O crescimento linear é avaliado em placas de Petri, medindo-se o

diâmetro da colônia em crescimento, ou a área da colônia. O método do peso seco consiste na avaliação do peso do micélio após secá-lo até peso constante, a uma temperatura de 80-100°C. O micélio geralmente é produzido em meio líquido podendo, entretanto, ser produzido em meio sólido. SOAVE (1972) com o fungo *Piricularia oryzae* e OOKA & KOMMEDAHL (1977) com *Fusarium moniliiforme* usaram crescimento linear, CHI & HANSON (1964) com *Fusarium* spp e HSIEH *et al.* (1979) com *Fusarium moniliiforme* usaram crescimento linear e peso seco para avaliar o desenvolvimento vegetativo dos respectivos fungos.

2.4. *Fusarium moniliiforme* em milho

Uma das causas do baixo rendimento da cultura do milho é sem dúvida a incidência de pragas e moléstias (GALLI *et al.*, 1968). Entre as mais importantes moléstias que afetam essa gramínea estão aquelas que causam a podridão do colmo e da espiga, cujos agentes são os fungos *Diplodia zeae* e *Fusarium moniliiforme*.

Em condições de campo o *Fusarium moniliiforme* causa, em plântulas, o amarelecimento das folhas, alongação anormal da parte aérea, lesões escuras no mesocótilo e raízes e, em casos mais severos, a seca das folhas e a morte do indivíduo (MOHAMED *et al.*, 1968).

Em condições de laboratório esse fungo afeta a emergência e o vigor das plântulas e, conseqüentemente, a densidade de plantio (DJAKAMIHARDJA *et al.*, 1970).

A redução do número de plantas por área, causa da por *F. moniliiforme*, em culturas comerciais de milho no Estado de Mississippi, E.E.U.U., foi demonstrada por FUTRELL & KILGORE (1969). Além da infecção no estágio de plântula, com conseqüente redução da densidade de plantio, esse fungo também afetou as plantas de milho em estágios mais avançados.

Na Pensilvânia, E.E.U.U., AYERS *et al.* (1972) mostraram a importância de *F. moniliiforme* como agente causador de podridão do colmo. Em amostras exibindo esse sintoma, constataram a presença do fungo em 88 e 64% das plantas, nos anos de 1970 e 1971, respectivamente.

A presença do fungo no interior da planta, é caracterizada por desintegração do tecido parenquimatoso, principalmente dos internódios (FOLEY, 1960 e GALLI *et al.*, 1968). Essa deterioração é gradual variando com a época e local da infecção. Com a desintegração do tecido de sustentação, o transporte nos feixes vasculares é bloqueado, causando um enfraquecimento imediato do colmo e da planta. Como conseqüência ocorre o quebramento da planta, com porcentagens que variam de 10 a 15%, podendo em certos cultivares atingir até 30%. O quebramento, além de diminuir a produção da cultura, aumenta o custo da colheita, cuja operação é uma das mais caras no cultivo do cereal. (*)

(*) SILVA, W.J. da. Informação sobre quebramento e custo de produção. Campinas, IAC, 1973 (Comunicação Verbal).

Além do efeito direto que o fungo causa à planta, ele pode atuar de maneira indireta através de seus metabólitos. Plantas cultivadas sobre culturas do fungo têm seu desenvolvimento inibido e o número de raízes secundárias reduzido. Se a cultura do fungo for inativada pelo calor, as plantas cultivadas nesse substrato mostrarão ainda um número menor de raízes secundárias, quando comparadas com aquelas cultivadas sobre cultura do fungo vivo. O efeito da toxina no comprimento das raízes primárias é tão severo quanto o fungo vivo (FUTRELL & KILGORE, 1969). MOHAMED *et al.*, 1968, mostraram que plantas regadas com filtrado do fungo apresentam os mesmos sintomas induzidos pelo fungo vivo.

O desenvolvimento de todo o processo de podridão do colmo foi estudado detalhadamente por KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966). Eles mostraram que em algumas variedades de milho, a incidência de sementes infectadas pode ser desprezada como importante fonte primária para infecção de raízes e colmo. Afirmam esses autores que inóculos existentes no ar e no solo, são provavelmente, em termos epidemiológicos, mais importantes do que aqueles existentes na semente. Seus dados indicam que a infecção do colmo pode se originar tanto da semente infectada como do solo. Esses autores mostraram ainda que não houve discrepâncias significativas entre as porcentagens de raízes infectadas com as porcentagens de sementes infectadas. Esses dados confirmam os resultados de MELCHERS & JOHNSTON (1924) que determinaram que as sementes livres do fungo não asseguram

um satisfatório vigor das plântulas do milho, nem um número razoável de plantas por área, pois, as sementes analisadas com *F. moniliiforme*, nesse trabalho, apresentaram alta porcentagem de germinação.

Embora KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966) tenham considerado desprezível o efeito da semente infectada como fonte primária de infecção, a presença de *F. moniliiforme* é sempre constatada em milho. O fungo mais prevalente em sementes de milho tem sido o *F. moniliiforme* (MELCHERS & JOHNSTON, 1924). Esses mesmos autores em 1923 mostraram que dos fungos encontrados, o *F. moniliiforme* era o mais frequente, chegando a atingir 95% das sementes testadas na germinação.

Estudos de patologia de sementes efetuados por MEW & KOMMEDAHL (1972) demonstraram por outro lado, que em diferentes lotes de sementes de milho, a porcentagem de fungos isolados variou de 14 a 71%. Em três lotes de sementes, a porcentagem predominante de *F. moniliiforme* e *F. roseum* atingiu 41%. Em outra amostra de 22 lotes de sementes, a porcentagem de sementes infectadas com *F. moniliiforme* variou de 0 a 57%.

Em 95 amostras de sementes de milho estudadas por TUIITE & CALDWELL (1971) em Indiana, coletados em 20 localidades diferentes, o fungo isolado com maior frequência (44,6%) foi o *F. moniliiforme*.

Isolamentos realizados por MELCHERS (1956) mostraram que *F. moniliiforme* foi o fungo mais prevalente

em sementes de híbridos nos anos de 1952 a 1954, nos E.E.U.U. Em amostras de milho híbrido amarelo, em 1954, esse autor encontrou 75,6% de *F. moniliforme* nas sementes, sendo que em amostras de híbridos de cor branca essa porcentagem foi de 69%. Considerando-se os três anos de estudo e os dois tipos de híbridos, a porcentagem média de *F. moniliforme* foi de 40%.

Na República Árabe Unida, MOHAMED *et al.* (1967) estudaram a ocorrência de fungos em 42 amostras de diferentes regiões. Sete gêneros do fungo foram isolados, sendo a espécie *F. moniliforme* a mais importante, atingindo quase 90% das sementes infectadas na região nordeste. Houve variação de região para região com relação à porcentagem de fungos isolados. Todavia o *F. moniliforme* sempre predominou em praticamente todas as localidades.

Esses estudos de frequência de *F. moniliforme* foram inicialmente realizados em sementes de milho de endosperma normal ou comum, de cultivares e de híbridos. Posteriormente eles foram realizados em germoplasma com citoplasma que condiciona a esterilidade masculina e também em mutantes de endosperma. Assim, SENN (1932) estudou o efeito do gene *sugary* na requeima de plântulas de milho afetadas por *Gibberella saubineti*. Foi mostrado que em plântulas provenientes de sementes normais, encontradas em praticamente todas as espigas segregantes, ocorreria um alto índice de resistência à requeima. Plântulas produzidas a partir de sementes *sugary*, entretanto, manifestaram os sintomas típicos da doença.

Nessa mesma linha, ULLSTRUP (1971), estudando técnicas para inoculação de espiga com *Gibberella zeae* e *Diplodia maydis*, verificou que a suscetibilidade a esses dois patógenos era evidente em híbridos e linhagens puras, com alto teor de lisina. O autor atribuiu a maior suscetibilidade das plantas aos fungos, ao efeito do gene *opaque-2*, que eleva sensivelmente o nível de aminoácidos essenciais na semente. OOKA & KOMMEDAHL (1977) trabalharam com endosperma *opaque-2* e citoplasma Texas (T) que causa a andro esterilidade. Num levantamento de 24 campos de milho normal, encontraram correlação entre infecção de semente e infecção de colmo. Em 22 lotes de sementes com citoplasma normal ou macho-estéril, o número de sementes infectadas com *F. moniliforme* foi aproximadamente de 5% em ambos os tipos de citoplasma. Testes efetuados em dois anos, em condições naturais de infecção, em 8 pares de linhas isogênicas, diferindo apenas para o gene *opaque-2*, indicaram não existir diferenças apreciáveis na incidência de *F. moniliforme* nas sementes normais e no mutante de alta lisina. Mesmo em condições de inoculação artificial não foram encontradas diferenças entre os dois tipos de endospermas. Todavia com a aplicação de adubação nitrogenada os autores mostraram que houve uma diminuição, estatisticamente significativa, na incidência de sementes infectadas. Essa redução foi de 5% nas linhagens normais e 10% nas linhas com endosperma *opaque-2*.

Em outro estudo comparativo, WARREN (1978) mostrou que endospermas normais e *opaque-2*, diferem signifi-

cativamente nas suas respostas à inoculação de *F. moniliforme*. A variação em suscetibilidade a esse fungo foi mais evidente entre linhas isogênicas com endosperma normal e *opaque-2*. Em oito linhagens testadas, com ambos os tipos de endospermas, cinco delas, com endosperma *opaque-2*, foram significativamente mais suscetíveis que seus pares normais. Esse autor determinou também que a melhor época para a inoculação das espigas com *F. moniliforme* era de 6 a 18 dias após a polinização. A pulverização de inóculo nos estiloestigmas, naquele estágio, produziu uma alta incidência de infecção, com efeitos bastante claros.

3. OBJETIVO

Vários trabalhos têm sido realizados com mutantes de endosperma de milho, visando principalmente o conhecimento de mecanismos de ação desses genes na produção de alterações químicas e nutricionais no endosperma. Como o valor nutritivo da semente é função de sua composição química, esses genes poderiam também afetar a resposta do grão a agentes patogênicos. Foi realmente, essa possibilidade, que se constituiu no principal objetivo desse trabalho. Fez-se uma análise comparativa de onze mutantes e seus respectivos endospermas normais em relação ao *F. moniliforme*. Foram estudados os tipos *sugary* (*su*), *sugary-2* (*su2*), *dull* (*du*), *brittle* (*bt*), *brittle-2* (*bt2*), *waxy* (*wx*), *opaque-2* (*o2*), *shrunken* (*sh*), *shrunken-2* (*sh2*), *amylose extender* (*ae*) e *floury* (*fl*).

O trabalho foi realizado em várias etapas, ini-

ciando-se pela caracterização do patógeno, inoculação em experimento de campo, isolamento do fungo dos onze mutantes de endosperma para conhecimento da frequência de sementes desses germoplasmas com o patógeno, análise do efeito do fungo na redução da porcentagem de germinação das sementes, determinação do efeito do valor nutritivo dos vários endospermas no crescimento de *F. moniliforme* e finalmente o estudo de alterações físicas, químicas e nutricionais desses mutantes, na patogenicidade, e conseqüentemente na germinação.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Variantes em *F. moniliforme*

Sete culturas de *F. moniliforme* foram estudadas com o objetivo de se isolar variantes, conforme a técnica de MING *et al.* (1966). A importância da identificação dos variantes prende-se a necessidade de se padronizar a técnica de inoculação. Empregando-se uma única cultura esperar-se-ia a manutenção das características do fungo, principalmente a sua patogenicidade, pelo menos por um período determinado. De cada uma das sete culturas foram efetuados aproximadamente 30 isolamentos individuais de ponta de hifa. Para este isolamento cada cultura selvagem foi cultivada em agar-água por um período de 4 a 5 dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico as pontas das hifas, na periferia da colônia, foram então cortadas com o auxílio de lâmina de barbear. Após o corte,

usando-se uma agulha histológica, cada ponta foi removida para um tubo individual de cultura com meio BDA.

Os conídios produzidos nessas culturas individuais foram, em seguida, transferidos para uma placa de Petri, em meio de Leonian, assim preparado: peptona - 5g, dextrose - 20g, KH_2PO_4 - 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 1g, agar-agar - 15g e água destilada - 1000ml. Esse meio é específico para caracterizar a coloração das colônias (MING *et al.*, 1966). As suspensões de conídios eram bastante diluídas para a obtenção de, aproximadamente, 20 a 30 colônias por placa.

4.2. Coloração de núcleo de microconídio de *F. moniliforme*

Para se determinar o número de núcleos em microconídios de *F. moniliforme* empregou-se a técnica recomendada por HRUSHOVETZ (1956). Conídios de sete culturas selvagens de *F. moniliforme* foram tratados com o fixador Carnoy e o corante Giemsa. Essa característica do conídio é importante para o estudo de mecanismos geradores de variabilidade genética do fungo.

Nesse trabalho os fungos foram inicialmente cultivados em BDA por um período de 5 a 7 dias. Das culturas retiraram-se pequenos cubos com aproximadamente 0,5 cm de altura. Em seguida esses cubos foram pressionados em lamínulas para que os microconídios ficassem aderentes às mesmas.

As lamínulas foram então colocadas no fixador Carnoy durante 10 minutos. Logo após foram lavadas em álcool etílico 95% e a seguir em água. As lamínulas foram então colocadas em HCl N a frio por 5 minutos. Após esse tratamento foram colocadas em HCl N a 60°C por 7 minutos. A seguir foram colocadas em água destilada, em tampão fosfato (pH 6,7) e finalmente submetidas ao Giemsa por 1 hora.

Após coloração, as lamínulas foram retiradas do corante, enxaguadas em água estéril e colocadas em recipientes com tampão fosfato.

Os núcleos dos microconídios assim preparados, foram então examinados em microscópios com objetiva de imersão.

4.3. Germoplasma

Foram estudadas 11 linhagens homozigotas para 11 genes que condicionam características de endosperma. Essas linhagens foram obtidas de várias populações sintéticas de milho.

4.3.1 - Populações sintéticas

As populações originais, com endosperma normal, foram sintetizadas objetivando alta adaptação às condições do Estado de São Paulo. Uma descrição sumária de cada população é dada a seguir.

Múltiplos: Sintético obtido na Seção de Genética do IAC a partir de híbridos experimentais desta instituição, e híbridos duplos comerciais de companhias particulares em distribuição no ano de 1962. Apresenta endosperma do tipo semi-dentado e coloração amarelo-laranja.

MEB: Sintético do tipo dentado de coloração amarela, de menor porte e maior precocidade, produzido pela Seção de Genética do IAC, a partir de linhagens elites de porte pequeno. Essas linhagens com menor número de internódios foram obtidas através de um programa de retrocruzamento cujos pais não recorrentes eram linhagens americanas do *Cornbelt*.

SRRDuro: Sintético obtido na Seção de Genética do IAC, a partir de germoplasma originário das Antilhas, da Colômbia, do Peru, e de algumas linhagens do tipo *flint* de alta capacidade de combinação com a variedade Asteca. Apresenta endosperma duro, cristalino, de coloração amarela.

Asteca Prolífico: Cultivar selecionado pela Seção de Genética do IAC, para maior prolificidade e produtividade. A variedade sintética Asteca foi produzida no IAC pela Seção de Cereais, a partir de linhagens dentadas amarelas de San Luiz Potosi, México. As espigas são de porte médio, com sabugo de diâmetro reduzido e grãos profundos.

Cateto Prolífico: Variedade melhorada

na Seção de Genética do IAC, para aumento do número de espigas por planta a partir de germoplasma Cateto. Apresenta sementes de endosperma duro, de aparência cristalina e coloração amarelo-laranja.

Tuxpan La Posta: População de germoplasma da raça Tuxpeño, também denominado Composto La Posta, com sementes brancas do tipo dentado.

Piramex: Sintético originário do México obtido de cruzamentos de 20 linhagens S_1 de Tuxpeños amarelos. Uma amostra da população resultante foi introduzida no Instituto de Genética, em Piracicaba, em 1956, local onde a variedade foi posteriormente melhorada.

4.3.2 - Características dos genes mutantes de endosperma

Os mutantes de endosperma foram originalmente cedidos pelo professor R. Creech da Universidade da Pensilvânia ao Dr. William José da Silva, que em 1971 iniciou um programa de introdução desses genes nas populações mencionadas adaptadas à nossa latitude.

As características de cada um desses genes são as seguintes, segundo ALEXANDER & CREECH (1977).

dull (du) - Apresenta endosperma pouco translúcido e altera a proporção de amilose e amilopectina, aumentando o teor de amilose a níveis ao redor de 50%. Efeito aparentemente desprezível nas frações proteicas.

Foi introduzido no germoplasma *Cateto Prolífico*.

floury (fl) - Apresenta aspecto opaco. Altera apenas a granulometria do amido. Não afeta as frações proteicas e nem os carboidratos. Foi introduzido no germoplasma *Asteca Prolífico*.

brittle (bt) - Apresenta-se bastante enrugado devido a um forte bloqueio na síntese de amido. Altera as frações proteicas produzindo aumentos nos teores de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. Eleva o teor de açúcares a níveis ao redor de 17%, onde a sacarose é o principal componente. Foi introduzido no germoplasma *Múltiplos*.

shrunken-2 (sh2) - Tem características semelhantes ao *brittle (bt)*. Foi introduzido no germoplasma *Múltiplos*.

brittle-2 (bt2) - É também semelhante ao *brittle (bt)* e ao *shrunken-2 (sh2)*. Foi introduzido no germoplasma *MEB*.

shrunken (sh) - Apresenta-se pouco enrugado e com textura mais amilácea. Apresenta teor de açúcares intermediário entre o endosperma normal e *shrunken-2*. O bloqueio na síntese de amido não é tão severo. Foi introduzido no germoplasma *Asteca Prolífico*.

sugary (su) - Apresenta-se enrugado e com textura vítrea. Mostra maior teor de açúcares que o milho normal e é caracterizado por um significativo aumen-

to no teor de um polissacarídeo solúvel em água, denominado fitoglicogênio. Foi introduzido no germoplasma *Piraxmex*.

sugary-2 (su2) - Apesar do nome, não apresenta grandes modificações nos teores de açúcares aumentando, um pouco, a amilose no endosperma. Foi introduzido no germoplasma *SRRDuro*.

amylose-extender (ae) - aumenta a síntese de amilose para níveis ao redor de 55%, reduzindo obviamente a quantidade de amilopectina. Foi introduzido no germoplasma *Múltiplos*.

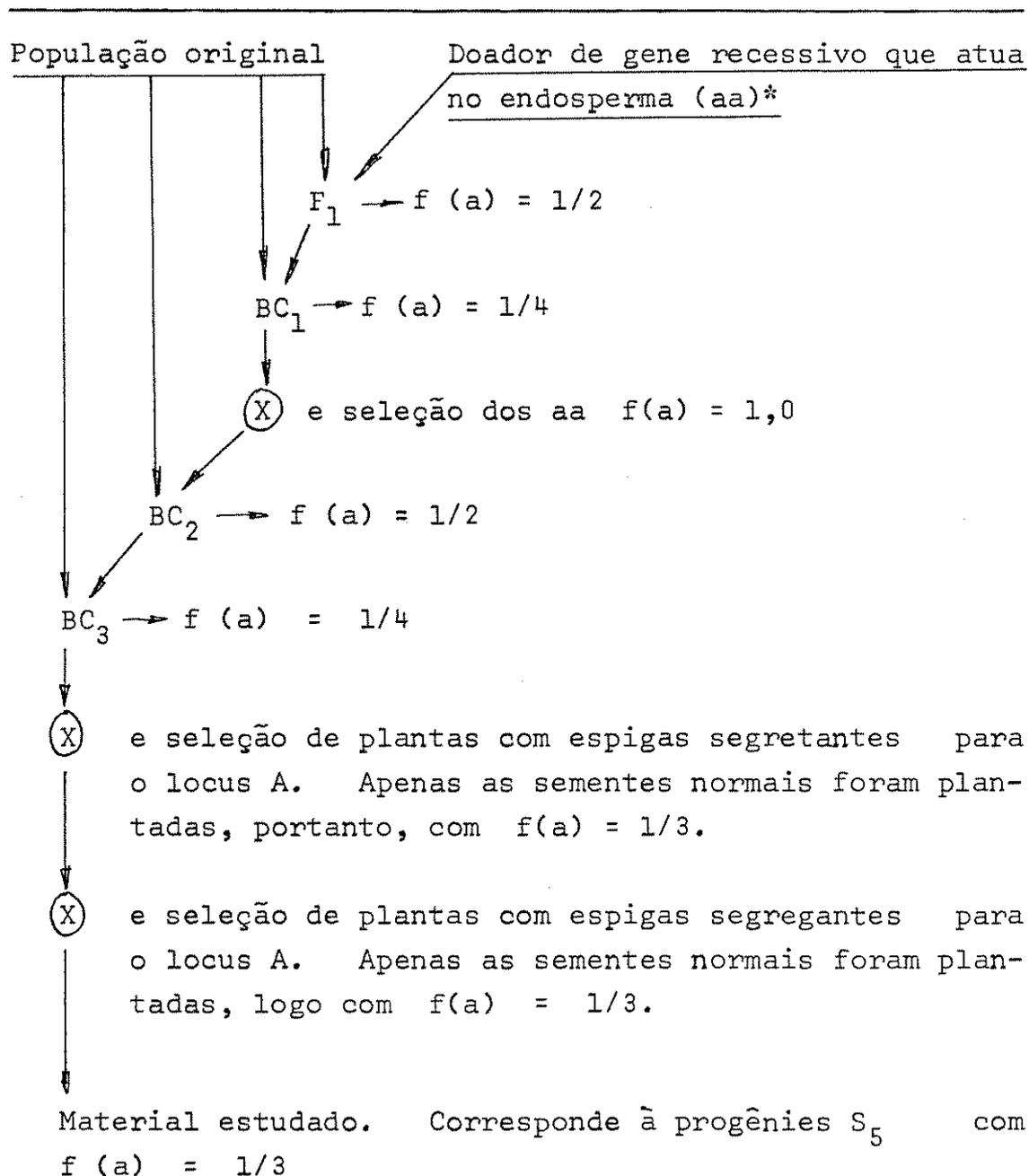
opaque-2 (o2) - Altera a composição das frações proteicas do endosperma, reduzindo zeína e elevando albuminas, globulinas e glutelinas. Com isso há um aumento nos teores de lisina e triptofano na semente. Foi introduzido no germoplasma *Múltiplos*.

waxy (wx) - Apresenta-se com endosperma opaco e bastante duro. Produz apenas amilopectina. Foi introduzido no germoplasma *Tuxpan La Posta*.

4.3.3 - Introdução de genes mutantes de endosperma nas populações originais

Os genes mutantes de endosperma foram introduzidos nas populações sintéticas originais, de endosperma normal, através de um esquema de retrocruzamentos e seleção, ilustrado na Fig. 1.

FIGURA 1 - Esquema de retrocruzamento e seleção utilizado para a introdução dos genes mutantes de endosperma nas populações originais de endosperma normal.



(*) Linhas puras do 'CORNBELT'; portanto de má adaptação às nossas condições tropicais, homozigotas para cada um dos seguintes genes: *du*, *fl*, *bt*, *sh2*, *bt2*, *sh*, *su*, *su2*, *ae*, *o2* e *wx*, obviamente com frequência gênica, $f(a) = 1,0$. BC_i indica o i ésimo retrocruzamento e (X) corresponde a autofecundação.

4.4. Ensaio de campo para inoculação de *F. monili- forme* em espiga

Nesse experimento, com delineamento em blocos ao acaso, com 4 repetições, foram estudadas onze progênies S_5 envolvendo os genes *du*, *fl*, *bt*, *sh2*, *bt2*, *sh*, *su*, *su2*, *ae*, *o2* e *wx*.

Essas progênies S_5 , com frequência gênica de 1/3 para o gene que atua no endosperma, foram autofecundadas, no ensaio, e produziram 1/3 de espigas homozigotas normais (tipo selvagem) e 2/3 de espigas heterozigotas para um determinado gene.

A unidade experimental correspondeu a uma linha de 10 metros de comprimento com plantas no espaçamento de 1,0m x 0,40m. Em cada cova plantou-se 3 sementes, deixando-se duas plantas após o desbaste. O *stand* ideal foi portanto, de 50 plantas/10m, ou 50.000 plantas/ha. A adubação foi na base de 60 kg de N, 60 kg de P_2O_5 e 30 kg de K_2O por hectare. A bordadura do ensaio foi feita com plantas do cultivar Nutrimaiz. Em cada parcela, no florescimento, foram autofecundadas aproximadamente 40 plantas. Com a autofecundação obtiveram-se plantas com espigas 100% normais, na proporção de 1/3, e aproximadamente 2/3 de plantas com espigas segregando sementes normais e mutantes na proporção de 3:1.

Para garantir que todas as espigas fossem expostas ao efeito do *F. moniliforme*, foi feita a inocu-

lação artificial no material. Usou-se a cultura M-28 de *F. moniliforme*, do tipo roxo, na forma de suspensão de conídios com concentração aproximada de 10^8 conídios por ml (KOEHLER, 1936). A inoculação artificial foi feita sete dias após a autofecundação, pulverizando-se os estíloestigmas.

Devido a algumas diferenças no florescimento das várias progênes, a autofecundação e conseqüentemente as inoculações foram realizadas em dias diferentes. A colheita das espigas foi realizada após o secamento das plantas no campo. No laboratório as sementes normais e mutantes foram então separadas em dois lotes, formando-se um composto de cada tipo para os próximos experimentos.

4.5. Frequência de *F. moniliforme*

4.5.1 - Sementes com pré-tratamento

A semente de milho é considerada o mais eficiente veículo de disseminação do *F. moniliforme* (KOEHLER, 1930). Torna-se, pois, importante o conhecimento da frequência de ocorrência do fungo nas sementes. Outro ponto é a deterioração, pelo patógeno, da qualidade da semente na alimentação animal. Duas técnicas de isolamento foram empregadas comparativamente. Uma envolvendo o pré-tratamento das sementes a -19°C , para inibir a germinação, e a outra, usando a semente intacta, para permitir germinação normal.

Para a preparação do ensaio com pré-tratamento, foram usadas sementes oriundas de ensaio de campo, cujas plantas foram autofecundadas e as espigas foram inoculadas com *F. moniliforme* conforme descrito no item 4.4.

As sementes estudadas foram retiradas apenas de espigas segregantes. Foram utilizadas 150 sementes para cada tipo de endosperma, em 3 repetições. Cada lote constituído de 50 sementes, correspondeu a uma repetição do material de campo. As sementes foram colocadas em placas de Petri, com 5 folhas de papel de filtro 80 g, molhadas com água estéril. A amostragem foi feita com o auxílio de uma colher, sendo utilizado 10 sementes por placa. Antes do plaqueamento as sementes foram mergulhadas em álcool etílico e em seguida tratadas durante 10 minutos com hipoclorito de cálcio à 1% para desinfestação superficial.

Vinte e quatro horas após o plaqueamento foi efetuado o pré-tratamento pelo frio, em congelador comercial, durante 24 horas a uma temperatura de -19°C . Após o pré-tratamento as placas foram colocadas em prateleiras de uma câmara com temperatura de aproximadamente 25°C , e regime de 10 horas de luz e 14 horas de escuro, com lâmpadas de luz fluorescente de 40w. A avaliação da frequência de sementes com *F. moniliforme* foi efetuada de 7 a 9 dias após o plaqueamento, com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

4.5.2 - Sementes sem pré-tratamento

A amostragem foi semelhante à empregada no experimento com pré-tratamento. Foram retiradas, de cada uma das três repetições do campo, 50 sementes de cada um dos endospermas contrastantes. As sementes foram mergulhadas em álcool etílico e posteriormente tratadas, durante 10 minutos, com hipoclorito de cálcio a 1%. Após o tratamento as sementes foram colocadas, individualmente, em tubos de ensaio contendo agar-água a 1%. Os tubos foram colocados em suportes próprios, distribuídos ao acaso em prateleiras, a uma temperatura de aproximadamente 25°C, em regime de 10 horas de luz e 14 horas de escuro, com luz fluorescente, produzidas por lâmpadas de 40w.

A contagem de frequência de sementes com *F. moniliforme* foi efetuada com o auxílio de um microscópio estereoscópico 7 a 9 dias após a colocação das sementes nos tubos. Essa avaliação foi feita em sementes distribuídas em três classes principais: sementes com germinação normal, não germinadas e com germinação deficiente, isto é, com crescimento deficiente do epicótilo e anomalias na radícula.

4.6. Crescimento micelial de *F. moniliforme* em meio líquido

Para estudar o efeito da composição química do endosperma de milho na patogenicidade de *F. moniliforme*, efe-

tuou-se um teste preliminar para crescimento micelial em meio líquido, preparado de endosperma normal. Esse teste serviu de base para padronização da metodologia no estudo do comportamento do fungo em diferentes meios de mutantes de endosperma. Utilizou-se para o teste preliminar sementes de endosperma normal do cultivar Maya. Inicialmente fez-se uma cuidadosa moagem das sementes. Essa operação é importante nesse estudo, porque os vários endospermas apresentam texturas diferentes.

As sementes foram inicialmente trituradas em liquidificador com copo de aço inoxidável. Após a trituração, a moagem foi executada em uma superfície lisa, com o auxílio de uma garrafa, até o ponto em que toda a farinha resultante ultrapassava uma peneira Granutest com 0,71mm. Em seguida a farinha era cozida em água desmineralizada a uma temperatura de aproximadamente 70°C, durante 30 minutos. Após o cozimento completava-se o volume perdido e o material era passado por uma peneira Granutest de 0,250mm. Do meio de cultura assim obtido, retirava-se 50 ml que era colocado em Erlenmeyer de 250 ml. O meio com pH entre 6,5 e 7,0 era em seguida esterilizado em autoclave a 120°C, durante 20 minutos.

Como nos casos anteriores, a única cultura utilizada no teste foi a M-28. O fungo foi inicialmente cultivada em agar-água em placa de Petri por 5 dias. Com o auxílio de uma alça de platina de 0,3 cm de diâmetro eram retirados pequenos cilindros iguais da placa de agar-água, contendo o fungo. Para que o micélio do fungo fosse sem-

pre de mesma idade, os cilindros eram retirados sempre a 2 cm do ponto de repicagem no centro da placa. Cada um desses cilindros era colocado em um Erlenmeyer de 250 ml.

Estudou-se cinco concentrações: 5, 10, 20, 40 e 80 gramas de milho por litro de meio de cultura. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições em condições de repouso e de agitação. O tratamento com agitação foi feito em agitador, regulado para agitar 15 minutos por hora.

Dez dias após a repicagem do fungo, os conteúdos dos frascos foram individualmente filtrados em tecido de nylon sendo o micélio colocado em canaletas de papel de alumínio e deixado secar até peso constante, em estufa a 80°C (LILLY & BARNETT, 1951). Após peso constante efetuou-se a pesagem do micélio seco.

4.7. Produção de micélio de *F. moniliforme* em meio de cultura

A fim de estudar o efeito da composição do endosperma na patogenicidade do *F. moniliforme*, usou-se milho como fonte de nutrientes do fungo, para produção de micélio em meio líquido. Foram analisados meios de onze diferentes mutantes de endosperma e suas versões normais. A moagem das sementes e os meios de cultura foram feitos como descrito no item 4.6. Empregou-se aqui também a mesma cultura M-28, do *F. moniliforme*.

Utilizou-se nesse experimento, 50 ml de meio

de cultura por Erlenmeyer de 250 ml. Os tratamentos foram de 5, 10, 20, 40 e 80 gramas de milho por litro de meio. O delineamento foi do tipo inteiramente casualizado com 4 repetições. A repicagem do fungo para os Erlenmeyers foi feita conforme descrito no item 4.6. Os frascos foram colocados, ao acaso, em prateleiras a aproximadamente 25°C de temperatura com regime de 10 horas de luz fluorescente e 14 horas no escuro, como descrito anteriormente.

O ensaio foi concluído 10 dias após a repicagem do fungo. O conteúdo dos frascos foi filtrado em tecido de nylon e o micélio colocado em canaletas de papel alumínio para secagem a 80°C até peso constante.

4.8. Crescimento radial de *F. moniliforme*

Além do peso seco, estudou-se também o crescimento radial como uma outra alternativa para se medir o crescimento do fungo. Foi analisado o crescimento do *F. moniliforme* em meios de cultura sólido, obtidos dos diferentes endospermas de milho e em respectivos normais.

O meio de cultura foi obtido como descrito no item 4.6. O agar-agar foi fundido separadamente em água desmineralizada e posteriormente juntado ao meio de cultura ainda quente. O meio com pH entre 6,5 e 7,0 era então, colocado em placas de Petri na base de 20 ml por placa. Em seguida as placas eram esterilizadas a 120°C durante 20 minutos.

O fungo utilizado foi também da cultura M-28, inicialmente desenvolvido em agar-água por 5 dias. Com auxílio de uma alça de platina de 0,3 cm de diâmetro, pequenos cilindros eram retirados das placas de agar-água e colocados no centro das placas contendo os diferentes meios de milho. Os cilindros com o inóculo eram sempre retirados de uma região da placa de mesmo raio, para uniformizar a idade do micélio.

A concentração de milho usada para todos os mutantes e suas versões normais foi de 20 gramas por litro. Cada tratamento foi analisado em ensaio delineado na forma de experimento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo a placa a unidade experimental.

Após a repicagem do fungo as placas eram deixadas a aproximadamente 25°C em regime de 10 horas de luz fluorescente e 14 horas de escuro.

A avaliação do crescimento foi feita diariamente, anotando-se o diâmetro das culturas por um período de 7 dias.

5. RESULTADOS

5.1. Variantes em *F. moniliforme*

Sete culturas selvagens de *F. moniliforme* foram analisadas para o estudo da ocorrência de variantes descritos por MING *et al.* (1966). Dessas sete originais, obtiveram-se 197 culturas a partir de pontas de hifa que revelaram os tipos roxo (R), branco (B) e vermelho (V). Também as combinações roxo + branco, vermelho + branco e roxo + vermelho + branco foram observadas. A distribuição dos tipos, entre as culturas selvagens é apresentada no Quadro 1.

As culturas selvagens CS-1, 2, 3 e 5 apresentaram o tipo roxo; a cultura CS-4 os tipos roxo, branco, roxo + branco e vermelho + branco; a cultura CS-6 os tipos vermelho, branco, roxo + branco e vermelho + roxo +

QUADRO 1 - Culturas de ponta de hifa de *F. moniliforme* e distribuição dos variantes encontrados.

Cultura Selvagem	Nº de culturas de ponta de hifa	Variantes*
CS - 1	21	R
CS - 2	30	R
CS - 3	26	R
CS - 4	6	R
	21	B
	3	R + B
	8	V + B
CS - 5	27	R
CS - 6	9	R
	10	B
	6	R + B
	1	V + R + B
CS - 7	24	V
	5	B

* R = roxo

B = branco

V = vermelho

branco; e a cultura CS-7 apresentou os tipos vermelho e branco.

Das 197 culturas estudadas, 110 foram do tipo roxo, 36 do tipo branco, 33 do tipo vermelho, 9 do tipo roxo + branco, 8 do tipo vermelho + branco e 1 do tipo vermelho + roxo + branco. Devido a predominância do tipo roxo, selecionou-se a cultura M-28 (roxo), para ser utilizada em todos os testes desse trabalho.

Observou-se um total de 6.560 conídios, verificando-se que todos os microconídios eram uninucleados.

5.2. *F. moniliforme* em sementes com pré-tratamento pelo frio

As porcentagens de sementes com *F. moniliforme* observadas nos onze mutantes de endosperma, pré-tratados a -19°C por 24 horas, estão listadas no Quadro 2. A porcentagem foi calculada baseada na soma de 3 repetições, totalizando 150 sementes por tratamento. O contraste da porcentagem de sementes normais e mutantes, com *F. moniliforme*, foi analisado pelo teste χ^2 .

Os dados indicam que os mutantes de endosperma envolvendo os genes *bt2*, *o2* e *sh2* apresentaram diferenças altamente significativas quando comparados com os tipos normais correspondentes. Os mutantes *bt2* e *o2* revelaram, respectivamente, aumento de 36% e 25% em relação aos tipos normais e o mutante *sh2* apresentou 4,3 vezes

QUADRO 2 - Prevalência de *F. moniliforme* em sementes normais e mutantes. Teste com pré-tratamento (-19°C por 24 horas).

Gene	Porcentagem de <i>F. moniliforme</i> em sementes		Nível de significância do χ^2
	normais	mutantes	
<i>du</i>	85,3	85,3	NS
<i>fl</i>	78,6	78,6	NS
<i>bt</i>	78,0	83,3	NS
<i>su</i>	75,3	83,3	NS
<i>su2</i>	81,3	90,0	*
<i>ae</i>	57,3	68,0	NS
<i>bt2</i>	66,6	90,6	**
<i>o2</i>	70,6	88,0	**
<i>sh2</i>	8,6	36,6	**
<i>wx</i>	90,6	88,0	NS
<i>sh</i>	87,3	81,3	NS
Média	70,8	79,3	

mais fungo que o tipo normal. O mutante *su2* mostrou significância ao nível de 5% com aumento de 11% de sementes infectadas com *F. moniliforme*.

Os demais mutantes de endosperma não mostraram diferenças nas comparações entre o tipo normal e o endosperma mutante.

As porcentagens de sementes com *F. moniliforme* em endospermas normais, de linhagens geneticamente diferentes, oscilaram entre 8,6 e 90,6%. A linhagem *Múltiplos* onde foi introduzido o gene *sh2*, apresentou-se altamente resistente ao *F. moniliforme* revelando apenas 8,6% de sementes com o fungo.

5.3. *F. moniliforme* em sementes sem pré-tratamento

No Quadro 3 são apresentadas as porcentagens de sementes normais e mutantes, com *F. moniliforme*, do teste sem o pré-tratamento pelo frio, o que, obviamente, permitiu a germinação das sementes. A porcentagem foi calculada com base na soma de três repetições e os dados foram analisados pelo teste do χ^2 .

Os mutantes de endosperma *bt*, *su*, *bt2* e *sh2* mostraram diferenças altamente significativas a 1% em relação aos tipos normais. Os aumentos de sementes mutantes infectadas foram respectivamente de 2,1; 2,5 e 10,8 vezes para os mutantes *bt*, *bt2* e *sh2*.

Para o mutante de endosperma *su* o aumento de

QUADRO 3 - Prevalência de *F. moniliforme* em sementes normais e mutantes. Teste com sementes intactas (sem pré-tratamento).

Gene	Porcentagem de <i>F. moniliforme</i> em sementes		Nível de signi- ficância do χ^2
	normais	mutantes	
<i>du</i>	46,0	50,0	NS
<i>fl</i>	26,0	24,6	NS
<i>bt</i>	22,0	46,6	**
<i>su</i>	42,6	60,6	**
<i>su2</i>	29,3	38,6	NS
<i>ae</i>	28,6	32,0	NS
<i>bt2</i>	26,6	67,3	**
<i>o2</i>	40,6	53,3	*
<i>sh2</i>	1,3	14,0	**
<i>wx</i>	52,6	54,6	NS
<i>sh</i>	54,0	58,0	NS
Média	33,6	45,4	

semente mutante infectada, em relação ao tipo normal foi de 42%.

O mutante *o2* apresentou diferença significativa ao nível de 5% revelando 31% a mais de sementes infectadas em relação ao tipo normal.

Aqui também foi observado que a linhagem *Múltiplos*, portadora do gene *sh2* constitui-se em excelente fonte de resistência ao *F. moniliforme* revelando, mesmo no mutante (14%) uma porcentagem de infecção menor do que qualquer um dos outros endospermas normais.

As porcentagens de *F. moniliforme* nesse teste, tanto nos endospermas normais como nos mutantes, são bem mais baixas que aquelas apresentadas no Quadro 2, onde as sementes sofreram um pré-tratamento a -19°C , durante 24 horas.

No teste que não sofreu pré-tratamento (Quadro 3) os endospermas normais revelaram uma média de 33,6% contra 45,4% do endosperma mutante. No teste que recebeu o pré-tratamento pelo frio (Quadro 2) essas médias foram respectivamente de 70,8% e 79,3%, mostrando claramente que quando a germinação é impedida as porcentagens de sementes com *F. moniliforme* aumentam em mais de 100% nas sementes normais.

Além da comparação entre endospermas normais e mutantes, para porcentagem de sementes com *F. moniliforme*, foi feito também um estudo comparativo contrastando-

-se as porcentagens de germinação nos dois tipos de endospermas, nas onze linhagens.

Após a germinação as sementes foram classificadas em três classes. Uma de sementes com germinação normal, outra com sementes que não germinavam e a terceira que apresentava plântulas anormais.

O resultado da análise, com teste de χ^2 , encontra-se no Quadro 4. Nos endospermas normais a porcentagem média de germinação foi de 68,3%, variando de 54,6% a 84,6%. Nos endospermas mutantes, a média de germinação foi menor, 48,2%, variando de 15,3% a 74,6%.

Os mutantes de endosperma *bt*, *su*, *bt2*, *sh2* e *sh*, apresentaram diferenças altamente significativas, com porcentagens de germinação bem inferiores às encontradas em endospermas normais. Os tipos normais foram, respectivamente, 4; 2,3 e 4,3 vezes superiores aos endospermas mutantes para os tipos *bt*, *su* e *bt2*. Nos tipos *sh2* e *sh* os normais foram respectivamente 59% e 39% superiores nos endospermas mutantes. O mutante do endosperma *o2* mostrou diferença significativa ao nível de 5% sendo a semente normal 28% superior ao mutante.

Para outros mutantes de endospermas não houve diferenças para porcentagem de germinação, em relação aos tipos normais.

A análise de χ^2 dos dados de porcentagem de sementes germinadas, não germinadas, e com germinação deficiente, com e sem *F. moniliforme*, para cada tipo de

QUADRO 4 - Porcentagens de sementes germinadas, com endospermas normais e mutantes.

Gene	Normal	Mutante	Nível de significância do χ^2
<i>du</i>	54,6	53,3	NS
<i>fl</i>	68,0	74,6	NS
<i>bt</i>	84,6	21,3	**
<i>su</i>	64,6	28,0	**
<i>su2</i>	76,6	74,0	NS
<i>ae</i>	66,6	62,6	NS
<i>bt2</i>	66,0	15,3	**
<i>o2</i>	70,0	54,6	*
<i>sh2</i>	72,0	45,3	**
<i>wx</i>	69,3	58,0	NS
<i>sh</i>	60,0	43,3	**
Média	68,3	48,2	

endosperma normal e mutante correspondente é apresentada nos Quadros I a XI do apêndice.

Diferenças significativas foram encontradas entre tipos normais, heterozigotos para os genes *o2* e *sh*, quando se compara sementes com e sem *Fusarium*. Numa análise comparativa dos endospermas mutantes, na presença e ausência do fungo, foram detectadas diferenças altamente significativas para os tipos *fl*, *su*, *su2*, *bt2*, *o2* e *sh*.

5.4. Crescimento de *F. moniliforme* em meio de cultura

Inicialmente num trabalho preliminar fez-se um estudo comparativo de dois métodos de cultura, com e sem agitação do meio, para crescimento do *F. moniliforme*. O resultado desse teste é apresentado no Quadro 5. Os pesos de micélio obtidos para os tratamentos que permaneceram sem agitação, foram em geral superiores aos tratamentos que receberam agitação. Observa-se que o peso do micélio não é alterado nas diferentes concentrações de milho nas culturas com agitação. Ao contrário, nas culturas em repouso, o peso do micélio está diretamente correlacionado com a quantidade de milho no meio a partir de 10 g/l. A fim de dar oportunidade para o aparecimento de interações do tipo crescimento do fungo x concentração de milho no meio, as onze comparações de mutantes e normais foram avaliadas também em cinco concentrações de farinha de milho. Os resultados de peso seco de micélio em g/l no experimen-

QUADRO 5 - Efeito de concentração de milho e de agitação do meio no peso seco de micélio de *F. moniliforme*.

Farinha de milho (g/l)	Peso seco de micélio (mg)	
	Repouso	Com agitação
5	22	23
10	25	13
20	47	36
40	97	41
80	199	39

to para estudo do crescimento de *F. moniliforme*, em meio de cultura com farinha dos onze mutantes de endosperma e os tipos normais correspondentes, estão apresentados nos Quadros XII a XXII do apêndice. Para melhor visualização desses resultados, os mesmos dados são apresentados no Gráfico 1. Uma comparação dos contrastes dos endospermas normais e respectivos mutantes nas cinco concentrações indicam de uma maneira geral, que é na concentração de 20g de milho/l que ocorrem as maiores diferenças em peso seco de micélio, entre o endosperma normal e mutante.

Os mutantes de endospermas que mostraram as maiores diferenças em relação ao endosperma normal, nas cinco concentrações foram *o2*, *sh2*, *su* e *bt2*. Na concentração de 20g/l os mutantes *o2*, *su* e *bt2*, apresentaram respectivamente 82, 100 e 82% de crescimento a mais que os tipos normais correspondentes. O mutante *sh2* foi 2,2 vezes superior ao tipo normal. Os mutantes *bt*, *du* e *sh* apresentaram diferenças menores em relação aos endospermas normais com acréscimos respectivos de 42, 70 e 42% na concentração de 20 g/l.

O mutante *wx* foi o que apresentou a menor diferença em relação ao endosperma normal na concentração de 20 g/l. O endosperma *su2* apesar de apresentar uma vantagem de 30% em relação ao normal, não diferiu significativamente do normal nas cinco concentrações. Finalmente os genes *ae* e *fl* condicionam endospermas que não apresentam qualquer vantagem em relação ao endosperma normal para fator de crescimento do fungo. Contrariamente aos outros

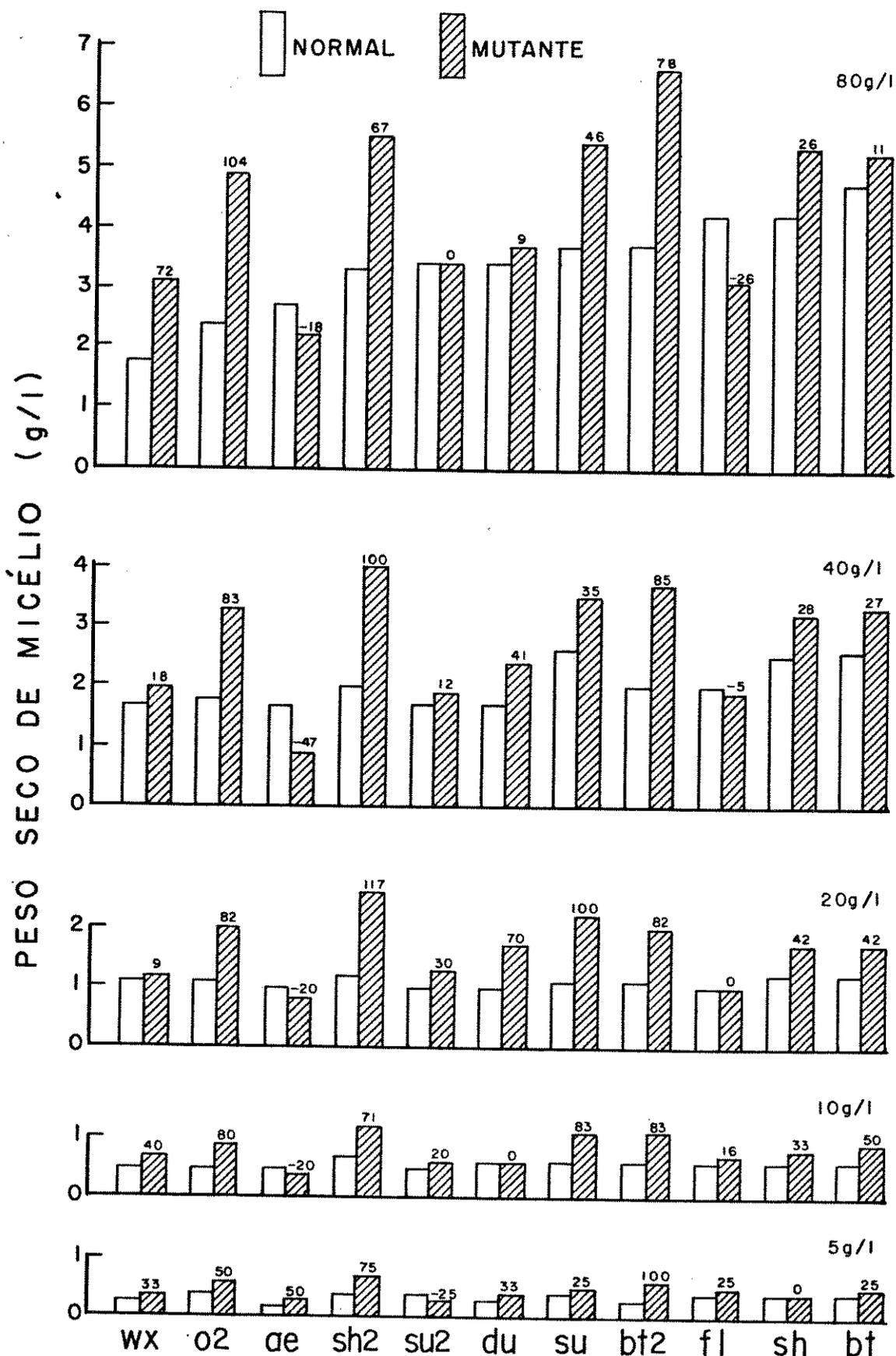


GRÁFICO 1-Peso seco de micélio de *F. moniliforme*(g/l) obtido em meio de cultura líquido com 5, 10, 20, 40 e 80gramas de milho/litro de 11 mutantes de endosperma e seus correspondentes normais.

endospermas o tipo normal apresentou maior crescimento que o mutante.

O crescimento radial de *F. moniliforme* em um meio de cultura contendo somente milho como fonte de nutriente na concentração de 20 g/l é apresentado no Quadro 6. Os dados observados indicaram não haver diferenças entre os onze mutantes e os respectivos endospermas normais.

QUADRO 6 - Crescimento radial (cm) de *F. moniliforme* (diâmetro de colônia) em endospermas normais (N) e nos mutantes (M) de endosperma, em meio com 20 g de farinha de milho por litro.

Tipo de endosperma		H o r a s					
		48	72	96	120	144	168
du	N	1,6	2,9	4,1	5,5	6,8	8,1
	M	1,5	2,8	4,0	5,4	6,7	8,0
fl	N	1,6	2,8	4,1	5,5	6,8	8,1
	M	1,5	2,7	4,0	5,3	6,6	7,8
bt	N	1,7	2,9	4,1	5,4	6,7	7,9
	M	1,7	2,8	4,1	5,4	6,6	7,8
su	N	1,6	3,1	4,5	5,9	7,2	8,3
	M	1,6	3,0	4,3	5,7	6,6	8,0
su2	N	1,3	2,6	3,9	5,3	6,6	7,8
	M	1,4	2,7	4,0	5,4	6,7	7,9
ae	N	1,5	2,7	4,1	5,4	6,7	8,0
	M	1,5	2,7	4,1	5,3	6,7	8,0
bt2	N	1,6	2,8	4,0	5,6	6,9	8,2
	M	1,7	2,9	4,1	5,7	6,9	8,2
o2	N	1,6	2,9	4,2	5,5	6,8	8,2
	M	1,4	2,7	3,9	5,4	6,7	8,1
sh2	N	1,6	2,9	4,4	5,9	7,1	8,4
	M	1,4	2,7	4,1	5,4	6,7	7,8
wx	N	1,4	2,7	4,0	5,3	6,6	7,8
	M	1,3	2,6	3,9	5,2	6,3	7,6
sh	N	1,9	3,0	4,3	5,7	6,9	8,1
	M	1,8	3,0	4,3	5,6	6,8	8,0
BDA		1,5	2,8	4,2	5,5	6,6	7,6

6. DISCUSSÃO

6.1. Variabilidade de *F. moniliforme*

Os resultados aqui obtidos assemelham-se àqueles encontrados por LEONIAN (1930) e principalmente àqueles obtidos por MING *et al.* (1966). Aparentemente em *F. moniliforme* ocorrem três formas distintas ou três variantes distintas, que segundo as técnicas de MING *et al.* (1966) foram caracterizadas como os tipos roxo, vermelho e branco.

LEONIAN (1930) observou o fenômeno da dissociação em *F. moniliforme* e demonstrou a existência de três tipos de colônias, as quais foram designadas A, B e C. O tipo A apresentou micélio submerso e cor roxa, o tipo B micélio aéreo e cor laranja, enquanto que o tipo C era constituído de uma mistura dos outros dois tipos. É pro-

vável que os três tipos de cultura estudadas por LEONIAN (1930), correspondam aos três tipos nucleares estudados por MING *et al.* (1966), devido à semelhanças nas suas características.

Por outro lado, MING *et al.* (1966) isolaram em *F. fujikuroi* três tipos nucleares diferentes, e designaram esses tipos de roxo, vermelho e branco. Também demonstraram que a heterocariose pode ocorrer com todos os três tipos.

Verifica-se pelos dados do Quadro 1 que os variantes podem ocorrer isolados na natureza, como foi o caso das culturas CS-1, CS-2, CS-3 e CS-5. Todas essas culturas pertencem ao tipo roxo. A ocorrência isolada dos outros dois tipos, o vermelho e o branco, não foi detectada na amostra estudada. Isto não significa que esses tipos, não possam ocorrer isoladamente na natureza, pois o número de culturas estudadas foi relativamente pequeno. É provável que amostrando-se um número maior de culturas se possa detectar a ocorrência isolada desses tipos.

O variante roxo foi o mais frequente com 55% de ocorrência enquanto os outros ocorreram com 18% e 16%. Isto dá uma idéia da predominância desse tipo sobre os demais, fato esse que determinou a escolha de uma cultura do tipo roxo, a cultura M-28, derivada da cultura selvagem CS-2, para o desenvolvimento do presente trabalho.

Além de MING *et al.* (1966), vários outros

(HANSEN & SMITH, 1932; HANSEN, 1938; BUXTON, 1954; COY & TUVESON, 1961; DHILLON *et al.*, 1961; GARBER *et al.*, 1961; BUXTON & WARD, 1962; PARMETER *et al.*, 1963; CAMARGO, 1976 e SANCHEZ *et al.*, 1976) demonstraram a ocorrência de heterocários entre culturas de espécies de *Fusarium*.

Embora nenhuma preocupação tenha havido para a obtenção de heterocários constatou-se que eles ocorrem naturalmente, como mostram as culturas CS-4 e CS-6. Na primeira encontrou-se dicários do tipo roxo + branco e vermelho + branco, e na segunda, dicário do tipo roxo + branco e um tricário do tipo vermelho + roxo + branco.

6.2. Ocorrência de *F. moniliforme* em sementes

Com a descoberta dos mutantes de endosperma que alteram a composição química da semente e a utilização desses mutantes em programas de melhoramento de milho, aumentou-se a preocupação com o efeito do *F. moniliforme* em sementes de maior valor nutritivo.

Os resultados apresentados no presente trabalho contribuem para o conhecimento do comportamento de onze tipos de endospermas mutantes, analisados comparativamente com seus tipos normais correspondentes. O estudo desses contrastes em espigas segregantes de linhagens bem uniformes, em condições normais de germinação e também em sementes com germinação inibida, contribuiu decisivamente para a qualidade dos dados coletados.

Essas técnicas, com e sem tratamento de semen-

tes, são atualmente bastante empregadas pelos patologistas. Eles alegam que a inibição da germinação é feita para facilitar o trabalho de isolamento do patógeno em estudo de frequência de sementes com os fungos.

Verifica-se pelo Quadro 2, no experimento com germinação inibida, que ocorrem diferenças na frequência de sementes com *F. moniliforme* nos endospermas normais e em alguns mutantes. Assim os tipos *su2*, *bt2*, *o2* e *sh2* foram significativamente diferentes dos endospermas normais correspondentes. O efeito dos genes *o2* e *su*, aqui registrados, confirmam, pois, as observações de SENN (1932), ULLSTRUP (1971), LOESCH *et al.* (1976) e WARREN (1978). Os mutantes de endosperma que mostraram as maiores diferenças em relação aos endospermas normais foram *bt2*, *o2* e *sh2*. Essas diferenças foram, respectivamente, de 24,0, 17,4 e 28,0%. Entretanto, nem sempre a presença do gene mutante propicia um aumento da frequência do fungo, como foram os casos dos mutantes *du*, *fl*, *bt*, *su*, *ae*, *wx* e *sh*.

Calculando-se a diferença porcentual relativa, entre os endospermas normais e os endospermas mutantes, elimina-se o efeito do componente genético da linhagem, permitindo uma análise comparativa dos mutantes. Os resultados mostram que os genes *su2*, *bt2*, *o2* e *sh2* foram responsáveis por um aumento no número de sementes com fungo, em relação aos endospermas normais. Os genes *su2*, *bt2* e *o2* revelaram aumentos respectivos de 11, 36 e 25%. enquanto que o gene *sh2* foi 4,3 vezes superior ao tipo normal.

Por outro lado uma análise comparativa dos endospermas normais revela que existe um componente genético bastante significativo que condiciona o comportamento da planta em relação ao *F. moniliforme*. Como todas as espigas foram submetidas ao *F. moniliforme* em condições de infecção artificial, as diferenças encontradas entre os endospermas normais dão uma idéia do grau de tolerância que existe entre esses germoplasmas. A linhagem *Múltiplos*, portadora do gene *sh2*, apresentou uma resposta completamente diferente das demais, com apenas 8,6% de sementes com o fungo, o que a torna uma excelente fonte de resistência ao *F. moniliforme*, para ser usada em programas de melhoramento.

Por outro lado, no Quadro 3, quando se compara as diferenças entre os endospermas normais e mutantes, no teste que não sofreu inibição de germinação, verifica-se que os mutantes que apresentam as maiores diferenças são os *bt*, *su*, *bt2* *o2* e *sh2*. As diferenças percentuais relativas foram, respectivamente, de 42 e 31% para os tipos *su* e *o2*. Para os tipos *bt*, *bt2* e *sh2* as diferenças foram de 2,1; 2,5 e 10,8 vezes maiores, indicando que esses mutantes são bem mais suscetíveis que os respectivos endospermas normais.

Assim como no caso do pré-tratamento pelo frio, aqui também os endospermas mostraram-se bastante variáveis com relação a presença de *F. moniliforme*. A porcentagem de sementes com o fungo variou de 1,3 a 54,0%. Confirmou-se, também, nesse teste com sementes intactas,

a excepcional tolerância da linhagem *Múltiplos (sh2)* ao patógeno.

Contrastando-se os dados dos Quadro 2 e 3 observa-se que as porcentagens de sementes com fungo são bastante superiores às aquelas registradas no teste com tratamento pelo frio. Esses resultados demonstram que o emprego de temperatura baixa para inibir a germinação provoca um grande aumento na frequência de sementes com *F. moniliforme*. As médias de porcentagens de sementes com o fungo que foram de 70,8 e 79,3 para os endospermas normais e mutantes respectivamente, no tratamento de temperatura baixa, foram reduzidas para 33,6 e 45,4%, respectivamente, no experimento com sementes intactas. Portanto o teste pelo frio aumentou mais de 100% a quantidade de sementes de endosperma normal com o fungo. As diferenças percentuais relativas foram bastante superiores no teste com sementes intactas, quando o mutante é significativamente mais suscetível que o endosperma normal. As diferenças percentuais que no teste pelo frio foram de 0,4; 0,2 e 4,3 vezes superior para os genes *bt2*, *o2* e *sh2*, passaram respectivamente para 2,5; 0,3 e 10,8 vezes, quando as sementes não sofreram qualquer tratamento antes da germinação.

Esses resultados diferem daqueles encontrados por BEDENDO 1978, que encontrou uma menor incidência do fungo, nos lotes de semente que receberam o pré-tratamento pelo frio.

Para esse autor, o emprego de temperatura a

-20°C provocaria a morte da semente sem, no entanto, causar uma inibição no desenvolvimento do fungo presente no interior do grão. Entretanto, o tratamento pelo frio aparentemente transforma a semente num simples substrato, facilitando a colonização pelo fungo. Com isso haveria um aumento na frequência de sementes com o fungo. Por outro lado as sementes intactas produzem plântulas que podem produzir substâncias que as protegem da ação de patógenos. Assim BEMILLER & PAPPELIS, 1965, citam WAHLROON & VIRTANEN que isolaram um glicosídeo de plântulas de milho de dez dias. Esse glicosídeo quando hidrolizado por enzimas na seiva da planta produz glicose e o "aglucon" 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-ona (DMBO). Quando aquecida a substância DMBO produz o ácido fórmico e o MBOA (6-methoxy-2(3)-benzoxazolinone). Tanto o DMBO quanto o MBOA tem ação inibidora no crescimento do *F. nivale*, efeito esse tão alto quanto ao do BOA (benzoxazolinona) que é uma substância antifúngica e antibactericida. O DMBO tem efeito principalmente fungistático. Do mesmo modo a ocorrência de DMBO ou outras substâncias em plântulas de milho, poderia explicar as menores frequências de sementes com *F. moniliforme* encontradas no teste de sementes intactas quando comparadas com o de sementes com baixa temperatura.

A presença de fungos patogênicos na semente não só afetaria o valor nutritivo do produto como também poderia afetar o processo de germinação. Entretanto nos vários mutantes de endosperma ocorrem grandes modificações

no peso e na composição química das sementes, características essas que também afetam a germinação. Para avaliar esses efeitos o trabalho foi então dirigido no sentido de permitir a decomposição do efeito de endosperma na germinação em efeitos devido às propriedades físicas e químicas do endosperma e efeitos devido à patogenicidade. NASS & CRANE, 1970a, por exemplo, não tiveram essa preocupação e estudaram a germinação dos mutantes *ae*, *su*, *su2*, *du*, *fl*, *o2*, *sh* e *h* (*horny*) em comparações com os endospermas normais correspondentes. Todos os mutantes apresentaram porcentagem de germinação um pouco mais baixa que o endosperma normal. A diferença foi mais acentuada para os mutantes *su* e *sh*. Além dos oito mutantes estudados por NASS & CRANE 1970a, em nosso trabalho foram também analisados os tipos *bt*, *bt2* e *sh2*. Nesse trabalho os resultados obtidos (Quadro 4) mostram que os seis mutantes de endosperma que apresentaram germinação de sementes significativamente inferior aos tipos normais foram os tipos *bt*, *su*, *bt2*, *o2*, *sh* e *sh2*. Todos esses, com exceção do *sh*, foram os mesmos que apresentaram as maiores porcentagens de sementes com *F. moniliforme* (Quadro 3). Isso, aparentemente, sugere que o fungo é um dos componentes que afeta a germinação dessas sementes. Entretanto, como essas sementes são pouco ou fortemente enrugadas, poderia, muito bem, parte do efeito da redução na germinação ser atribuída às transformações físicas e químicas ocorridas nos endospermas mutantes. De fato NASS & CRANE 1970b já haviam mostrado que nos mutantes *ae*, *su*, *su2*, *h*, *du*, *sh* e *wx*, no período de 35 a 77 dias após a polinização, a

acumulação de matéria seca era menor do que no endosperma normal. Somente no mutante de endosperma *fl* a acumulação de matéria seca foi levemente superior ao endosperma normal. Os mutantes de endosperma que mostraram maiores reduções no acúmulo de matéria seca foram o *sh* e o *su*.

Para se evitar o confundimento do efeito de alterações na quantidade e qualidade das substâncias de reserva e efeito de patogenicidade nas sementes, estudou-se a germinação de sementes dos mutantes comparativamente com os tipos normais, em sementes com e sem *F. moniliforme*. Aplicando-se os dados à expressão:

1 - $\left[\frac{\text{(porcentagem de sementes germinadas com } F. \text{ moniliforme)}}{\text{(porcentagem de sementes germinadas sem } F. \text{ moniliforme)}} \right]$ pode-se estimar a porcentagem de redução na germinação devido à presença do fungo na semente. Nas onze linhagens de endosperma normal apenas duas, portadoras dos genes *o2* e *sh*, apresentaram redução na porcentagem de germinação devido a presença de *F. moniliforme*. Essa redução foi de 27,0 e 37,8% para os tipos normais heterozigotos para os genes *o2* e *sh*, respectivamente. Pode-se concluir daí que os endospermas normais das linhagens portadoras dos genes *o2* e *sh*, são mais suscetíveis que todas as outras nove linhagens estudadas. Isso possivelmente ocorre em função da maior suscetibilidade da planta ao patógeno.

Nos mutantes, entretanto, o efeito do fungo no endosperma parece ser bem mais acentuado. Assim, nos ca-

sos onde ocorreram diferenças significativas, utilizando-se a mesma expressão anterior, os tipos *fl*, *su*, *su2*, *bt2*, *o2* e *sh*, tiveram reduções de 2,9; 41,0; 10,6; 68,9; 31,5 e 20,6% na germinação em consequência da presença do fungo na semente. Isso indica, de um modo geral, que nos mutantes o efeito do *F. moniliforme* é bem mais evidente sobre a germinação das sementes, do que nas sementes com endosperma normal.

Por outro lado, em consequência das mudanças físicas e químicas nos endospermas mutantes, ocorreram também significativas reduções na porcentagem de germinação dos mutantes *bt*, *su*, *bt2*, *o2*, *sh2* e *sh*, em relação aos tipos normais. Essas reduções, estimadas obviamente em semente sem *Fusarium*, foram respectivamente de 74,4; 47,4; 56,3; 16,4; 32,8 e 34,7%. Comparando-se o efeito do *F. moniliforme* e os efeitos das alterações estruturais e químicas na germinação de sementes, observa-se que nos endospermas *su*, *bt2*, *o2* e *sh*, o efeito do *F. moniliforme* é bastante significativo para explicar o comportamento das sementes na germinação. Nesses casos o efeito do *F. moniliforme* nos mutantes *su*, *bt2*, *o2* e *sh*, é bastante significativo causando uma redução média da ordem de 40% na porcentagem de germinação.

Os mutantes *bt*, *bt2*, *sh*, *sh2* e *o2*, aumentam a quantidade de lisina e triptofano na semente. Os quatro primeiros também aumentam significativamente o teor de açúcares no grão. O mutante *su* tem um efeito bem específico produzindo uma grande quantidade de um polissaca-

rídeo solúvel em água (WSP) (ALEXANDER & CREECH, 1977).

Em nosso caso todos os cinco mutantes que apresentaram redução altamente significativa na porcentagem de germinação, alteraram fenotipicamente as sementes, causando um enrugamento que é consequência da diminuição na acumulação de matéria seca no endosperma. NASS & CRANE 1970b mostraram que os mutantes de endospermas que produzem menos matéria seca são aqueles que acumulam as maiores quantidades de açúcares e polissacarídeos solúveis em água (WSP).

Os resultados aqui obtidos indicam que os mutantes ricos em lisina e triptofano, que acumulam as maiores quantidades de açúcares e as maiores quantidades de WSP e que apresentam as maiores porcentagens de água nas sementes, com exceção do *sh*, foram aqueles que apresentam as maiores porcentagens de infecção por *F. moniliforme*, principalmente *sh2* e *bt2* (Quadro 3). Isto sugere que a qualidade química da semente, isto é, altos teores de aminoácidos essenciais, de açúcares e WSP, associados a uma maior quantidade de água, poderiam favorecer o desenvolvimento do fungo nos endospermas mutantes.

De fato, nos resultados apresentados no gráfico 1, observa-se que os mutantes de endosperma ricos em lisina e triptofano, com altos teores de açúcares e grandes quantidades de polissacarídeos solúveis em água, ou sejam, *bt2*, *bt*, *sh*, *sh2*, *o2* e *su*, apresentaram os maiores crescimentos em peso seco, quando comparados com os

endospermas normais.

A melhor concentração estudada foi a de 20 g de milho/litro, onde além de ocorrerem as maiores diferenças em peso seco de micélio, entre o endosperma normal e mutante, os endospermas normais de várias linhagens têm efeito semelhante no crescimento do fungo. Na comparação do Quadro 3 com o Gráfico 1 observa-se que há uma alta correlação entre sementes com fungo e crescimento micelial em meio de mutantes de endosperma. Na concentração de 20 g/l os mutantes de endosperma *o2*, *sh2*, *su* e *bt2*, apresentaram as maiores diferenças em crescimento. Essas diferenças foram respectivamente de 82, 100 e 82% para os mutantes *o2*, *su* e *bt2*, em comparação com o endosperma normal. O mutante de endosperma *sh2* foi 2,2 vezes superior ao tipo normal. Como se observa no Quadro 3 são exatamente nesses mutantes que foram encontradas as mais altas porcentagens de sementes com o fungo. Como foi demonstrado anteriormente foram nesses mutantes, com exceção do *sh2*, que o efeito do *F. moniliforme* é mais drástico na redução da porcentagem de germinação.

O fato do endosperma *sh2* não ter dado efeito significativo do fungo na germinação, pode perfeitamente ser atribuído a excelente fonte de tolerância que é a linhagem portadora desse gene.

Os mutantes de endosperma *bt*, *du* e *sh*, apresentaram respectivamente crescimento médio de 42, 70 e 42% em relação aos tipos normais correspondentes.

Praticamente não houve diferenças entre endospermas mutantes e normais, para os tipos *fl*, *ae*, *su2* e *wx*, para crescimento do fungo, e também para ausência de diferenças de infecção.

Somente nos endospermas normais, portadores dos genes *ae* e *fl*, ocorreu uma tendência para um maior crescimento micelial em relação aos endospermas mutantes respectivos. Em todos os outros casos, porém, os mutantes foram superiores aos tipos normais nas várias concentrações. Numa comparação do crescimento micelial nos endospermas normais à 20 g/l, observa-se uma grande uniformidade na resposta, sugerindo que as diferenças entre os mutantes devem ser atribuídas ao efeito dos genes que atuam nesses endospermas condicionando o seu valor químico-nutricional. Esses resultados mostram, pois, que a patogenicidade manifestada nos endospermas mutantes deve-se aparentemente ao maior valor nutritivo dessas sementes em relação aos tipos normais.

Finalmente observou-se que o sistema de avaliação de crescimento através do crescimento radial não é diferente para *F. moniliforme* em qualquer dos endospermas estudados (Quadro 7), confirmando assim os resultados obtidos por OOKA & KOMMEDAHL, 1977, com o mutante *o2* e sua versão normal. Essa resposta, entretanto, poderia ser alterada em concentrações mais baixas de milho no meio de cultura. A quantidade de 20 g de milho por litro poderia ser tão alta nos tipos normais que seria suficiente para fornecer as quantidades necessárias de nutrientes bem acima daqueles encontrados num meio mínimo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O fungo *Fusarium moniliforme* ocorre em sementes de milho sob a forma de diferentes variantes e provavelmente na forma de heterocários.

- O emprego de temperatura baixa (-19°C) para inibir a germinação provoca um significativo aumento na frequência de sementes com *F. moniliforme*, não sendo, portanto, adequado para estudo de patogenicidade em sementes.

- A composição química do endosperma do milho, favorece a incidência de *F. moniliforme* na semente. As sementes normais de valor nutritivo inferior apresentaram, em média, 40% a menos do patógeno que os mutantes

estudados. Contrariamente os mutantes de endosperma que apresentam melhor qualidade nutritiva, apresentaram uma maior frequência de sementes com *F. moniliforme*, que os endospermas normais correspondentes, quer em condições normais de germinação ou em condições de germinação inativada. Os mutantes *bt*, *su*, *bt2*, *o2* e *sh2* revelaram as maiores frequências de sementes com o fungo, e sendo os tipos que apresentam as maiores concentrações de lisina, triptofano, açúcares e polissacarídeos solúveis, por essa razão produziram os maiores crescimentos do *F. moniliforme* em meio de cultura.

- O fungo *F. moniliforme* causa uma redução média de 36% na porcentagem de germinação de sementes homozigotas para os genes mutantes de endospermas *su*, *bt2*, *o2* e *sh*. Em onze linhagens de endosperma normal, apenas em duas, as sementes com *F. moniliforme*, causaram uma redução na porcentagem de germinação.

- Além do efeito do patógeno na germinação, os genes *bt*, *su*, *bt2*, *o2*, *sh2* e *sh* que alteram as propriedades químicas e físicas do endosperma, acarretam uma redução de 74,4; 47,4; 56,3; 16,4; 32,8 e 34,7% respectivamente na porcentagem de germinação dos mutantes em relação aos endospermas normais.

- A avaliação de crescimento através da técnica de crescimento radial não é adequada para *F. moniliforme* em meio de cultura contendo milho como fonte de nutriente, pelo menos na concentração de 20 g/l.

8. RESUMO

Um estudo comparativo envolvendo diferentes mutantes de endosperma de milho e seus correspondentes endospermas normais, foi realizado para analisar o efeito de genes do endosperma na patogenicidade do *F. moniliforme*. Os mutantes estudados foram: *shrunken (sh)*, *shrunken-2 (sh2)*, *floury (fl)*, *brittle (bt)*, *brittle-2 (bt2)*, *waxy (wx)*, *dull (du)*, *sugary (su)*, *sugary-2 (su2)*, *opaque-2 (o2)* e *amylose extender (ae)*. Os efeitos desses genes foram avaliados em linhagens homozigotas, obtidas de várias populações sintéticas de milho. Os genes mutantes de endosperma foram introduzidos nessas populações através de um esquema de retrocruzamento.

Numa primeira fase analisou-se a ocorrência de variantes em diferentes culturas do fungo, isoladas de sementes de milho. Nesse estudo, com 197 culturas, ficou

evidenciado que o patógeno ocorre na natureza sob a forma de tipos diferentes, onde predominou o tipo roxo com frequência de 55%. É provável que esses tipos ocorram na natureza sob a forma de heterocários.

Realizou-se um ensaio de campo com delineamento em blocos ao acaso com 4 repetições onde as onze linhagens portadoras dos genes mutantes de endosperma foram autofecundadas, e em seguida suas espigas inoculadas com *F. moniliforme*. As sementes colhidas nesse ensaio foram utilizadas para os estudos do presente trabalho.

O estudo da patogenicidade em sementes foi efetuado com o isolamento do fungo dos onze mutantes de endospermas e suas versões normais. Dois testes foram realizados. Em um as sementes receberam pré-tratamento a -19°C e no outro as sementes não receberam esse pré-tratamento.

O pré-tratamento pelo frio que inibe a germinação das sementes mostrou que os genes *su*, *bt2*, *o2* e *sh2* foram responsáveis por significativos aumentos no número de sementes infectadas. O *su*, *bt2* e *o2* com respectivos aumentos de 11, 36 e 25%, enquanto que o efeito do gene *sh2* foi ainda mais intenso, revelando um aumento de 4,3 vezes no número de sementes com fungo, em relação aos endospermas normais. Os demais mutantes de endosperma não mostraram diferenças nas comparações entre o tipo normal e o endosperma mutante.

A comparação das diferenças entre os endospermas normais e mutantes, no teste que não sofreu inibição de

germinação, mostrou que os mutantes *bt*, *su*, *bt2*, *o2* e *sh2* foram os que apresentaram as maiores porcentagens de sementes infectadas em relação aos tipos normais. Essas diferenças foram de 42 e 31% respectivamente para os mutantes *su* e *o2*. Os tipos *bt*, *bt2* e *sh2*, apresentaram aumentos de 2,1; 2,5 e 10,8 vezes em relação aos tipos normais. Esses dados indicam que esses mutantes são bem mais suscetíveis que os respectivos endospermas normais.

O emprego de temperatura baixa para inibir a germinação provocou um grande aumento na frequência de sementes com *F. moniliforme*. No tratamento de temperatura baixa as médias de porcentagens de sementes com o fungo foram de 70,8 e 79,3% para os endospermas normais e mutantes, respectivamente. No tratamento com sementes intactas as médias foram reduzidas para 33,6 e 45,4% respectivamente. Portanto, o teste pelo frio superestima a quantidade de sementes de milho com o fungo.

O estudo da germinação mostrou que os tipos *bt*, *su*, *bt2*, *o2*, *sh2* e *sh*, apresentaram valores significativamente inferiores aos correspondentes normais. Os tipos normais heterozigotos para os genes *bt*, *su* e *bt2* foram respectivamente, 4,0; 2,3 e 4,3 vezes superiores aos endospermas mutantes. Os tipos normais heterozigotos para os genes *o2*, *sh2* e *sh* foram respectivamente 28, 59 e 39% superiores aos endospermas mutantes. Todos esses mutantes com exceção do *sh*, apresentaram também as maiores porcentagens de sementes com *F. moniliforme*. Isto, aparentemente, sugere que o fungo é um dos componentes que

afeta a germinação dessas sementes.

O estudo comparativo da germinação em sementes dos tipos normais das onze linhagens, com e sem *F. moniliforme*, mostrou que apenas as linhagens portadoras dos genes *o2* e *sh*, apresentaram redução significativa na porcentagem de germinação da ordem de 27,0 e 37,8% respectivamente. Nos mutantes, entretanto, os tipos *fl*, *su*, *su2*, *bt2*, *o2* e *sh* tiveram reduções na germinação de 2,9; 41,0; 10,6; 68,9; 31,5 e 20,6%, respectivamente, em consequência da presença do fungo na semente.

Os resultados encontrados indicam que os mutantes ricos em lisina e triptofano, que acumulam maiores quantidades de açúcares e polissacarídeos solúveis em água, e que apresentam altas porcentagens de água nas sementes, com exceção do *sh*, foram aqueles que apresentaram as maiores porcentagens de infecção por *F. moniliforme*, principalmente *sh2* e *bt2*.

Outra evidência que confirma o efeito da qualidade química das sementes na patogenicidade ao grão foi dada através do estudo de crescimento de *F. moniliforme* em meio de cultura com farinhas dos onze mutantes de endosperma e correspondentes tipos normais. O peso seco de micélio indicou que no meio com concentração de 20 g de farinha/litro, ocorreram as maiores diferenças entre os vários mutantes e normais. Nessa concentração, os mutantes de endosperma, que revelaram as maiores porcentagens de infecção, ou seja, *o2*, *sh2*, *su* e *bt2*, apresentaram também

as maiores diferenças em crescimento. Essas diferenças foram respectivamente de 82, 100 e 82% em relação ao endosperma normal, para os endospermas *o2*, *su* e *bt2*. O tipo *sh2* foi 2,2 vezes superior ao tipo normal.

Os resultados desse trabalho indicam claramente que a composição química do grão, condicionada por vários genes que atuam no endosperma do milho, favorece o desenvolvimento do *F. moniliforme* na semente.

9. SUMMARY

A comparative study involving 11 different endosperm mutants of maize and their correspondent normal counterparts was carried out to study the effect of endosperm mutant genes on pathogenicity of *F. moniliforme*. The following mutants were studied: *shrunk* (*sh*), *shrunk-2* (*sh2*), *floury* (*fl*), *brittle* (*bt*), *brittle-2* (*bt2*), *waxy* (*wx*), *dull* (*du*), *sugary* (*su*), *sugary-2* (*su2*), *opaque-2* (*o2*) and *amylose extender* (*ae*).

Those genes were introduced in several synthetic varieties through a backcross procedure and were studied in S_5 inbred lines derived from them.

In a preliminary step it was studied the presence of variants among cultures of *F. moniliforme* isolated from corn seeds. It was found that the pathogen occur in nature with different types being

predominant the purple type. Apparently the types occur in nature by heterocaryosis.

A randomized complete block experiment involving 11 inbred lines segregating only for the endosperm gene, with 5 replications, was planted at the experimental field. At flowering the 10 m long plots were selfed and the segregating ears were artificially inoculated with spores from a purple colony of *F. moniliforme*.

The study of seed pathogenicity was carried out by the isolation of the fungus from 11 endosperm mutants and their normal kernels of the segregating ears. Two tests were made. One, with deep-freezing treatment at -19°C and the other with intact seeds.

The inhibition of seed germination by deep-freezing showed that *su2*, *bt2*, *o2* and *sh2* genes were responsible by an increase of seeds with fungus. The *su2*, *bt2* and *o2* increased the number of seeds infected with *F. moniliforme* of 11, 36 and 25% respectively. The *sh2* gene increased 4.3 times the number of seeds with the fungus. The other mutants did not differ from the normal types on this respect.

The test with intact seeds showed that *bt*, *du*, *bt2*, *o2* and *sh2* mutants presented the highest percentage of infected seeds. The mutants *du* and *o2* showed respectively 42 and 31% more seeds with *F. moniliforme* than their normal counterparts. The *bt*, *bt2* and *sh2* genes increased the number of seeds with fungus in 2.1,

2.5 and 10.8 times respectively. These results indicated that the abovementioned mutants are far more susceptible than the respective normal endosperms. Low temperature inhibits seed germination and promotes a large increase in the frequency of seeds with *Fusarium*. The average percentage of seeds with the fungus in the freeze treatment was 70.8 for the normal and 79.3% for the mutant endosperms, while in germinating seeds were 33.6 and 45.5% respectively. This data clearly showed that the low temperature seed treatment overestimated the effect of *F. moniliforme* in maize seeds.

The germination study showed that the *bt*, *su*, *bt2*, *o2*, *sh2* and *sh* types presented a significant lower germination than the correspondent normal types. The normal endosperms carrying *bt*, *su* and *bt2* were respectively 4.0, 2.3 and 4.3 times higher than the mutant endosperms. The normal types carrying the genes *o2*, *sh2*, and *sh* were respectively 28, 59 and 39% superior to their mutant endosperms. All these mutants but *sh*, presented also a higher percentage of seeds with *F. moniliforme* indicating that germination is affected by the presence of the fungus in the seeds.

A comparative study of germination in normal seeds of the 11 inbreds with and without *F. moniliforme*, showed that progenies carrying the *o2* and *sh* genes, reduce germination in 27.0 and 37.8%, respectively. However, the mutant *fl*, *su*, *su2*, *bt2*, *o2* and *sh*, reduced the germination in 2.9, 41.0, 10.6, 68.9, 31.5 and

20,6%, respectively, due to the presence of the fungus in the seeds.

Results indicated that endosperm mutants rich in lysine and triptophan, accumulating a high amount of sugar and water soluble polysaccharides and therefore a high percentage of water in the seeds, with exception of *sh*, were the same that presented the highest percentages of infection by *F. moniliforme*, mainly *sh2* and *bt2*.

Other evidence that chemical properties of the kernels is associated with seed pathogenicity was given by studying growth of *F. moniliforme* in culture media with corn meal of the 11 endosperm mutants and their normal counterparts. Dry weight of mycelium show that a medium with 20 g of corn/liter showed the best separation of mutants from the normal endosperms. At this concentration, the mutants that presented the highest percentage of seed infection, *i. e.*, *o2*, *sh2*, *su* and *bt2*, also presented the best growth. The *o2*, *su* and *bt2* were 82, 100 and 82% superior to the normal endosperms. The *sh2* mutant was 2.2 times superior to the normal type.

The abovementioned results indicated that the chemical composition of the seeds conditioned by the various endosperm mutant genes clearly determine the development of *F. moniliforme* in the seeds.

10. LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, D.E. & R.G.CREECH, 1977. Breeding Special industrial and nutritional types. In: SPRAGUE, G.F., ed. Corn and corn improvement. American Society of Agronomy, Inc. Publisher. Madison, Wisconsin, U.S.A.
- AYERS, J.E.; P.E.NELSON & R.A.KRAUSE, 1972. Fungi associated with corn stalk rot in Pennsylvania in 1970 and 1971. Plant Dis. Repr., 56:836-839.
- BEDENDO, I.P., 1978. Metodologia para a detecção de *Fusarium moniliforme* Sheld, e sua ocorrência em sementes de milho (*Zea mays* L.) produzidos no Estado de São Paulo. Piracicaba, ESALQ - USP, 68 p. (Dissertação de Mestrado).
- BEMILLER, J.N. & A.J.PAPPELLIS, 1965. 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside in corn. I.

- Relation of water-soluble, 1-Butanol-Soluble glycoside fraction content of pith cores and stalk rot resistance. *Phytopathology*, 55:1237-1240.
- BOOTHROYD, C.W., 1971. Transmission of *Helminthosporium maydis* race T by infected corn seed. *Phytopathology*, 61:747-748.
- BUXTON, E.W., 1954. Heterocaryosis and variability in *Fusarium oxysporum* f. *gladioli* (Snyder & Hansen). *J. Gen. Microbiol.*, 10:71-84.
- BUXTON, E.W. & VALERIE WARD, 1962. Genetic relationships between pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and an isolate of *Nectria haematococca*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 45:261-273.
- CAMARGO, LILIA M.P.C.A., 1976. Estudos sobre heterocariose e virulência de *Fusarium moniliiforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr & Rg e *Fusarium moniliiforme* Sheld. Campinas, UNICAMP - 67 p. (Tese de Doutorado).
- CHI, E.C. & E.W.HANSON, 1964. Relation of temperature, pH, and nutrition to growth and sporulation on *Fusarium* spp. from red clover. *Phytopathology*, 54:1053-1058.
- COY, D.O. & R.W. TUVESON, 1961. Heterocaryosis between presumed species of *Fusarium*. *Genetics*, 46:860. (Abstr.)

- CROSIER, W.F. & S.W. BRAVERMAN, 1971. *Helminthosporium maydis* in seeds of Minnesota - Grown field corn. *Phytopathology*, 61:427-428.
- DHILLON, T.S.; E.D. GARBER & ELLEN G. WYTTENBACH, 1961. Genetics of phytopathogenic fungi. VI. Heterocaryosis involving *Gibberella fujikuroi* and formae of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Botany*, 39:785-792.
- DJAKAMIHARDJA, S.; G.E. SCOTT & M.C. FUTRELL, 1970. Seedling reaction of inbreds and single crosses of maize to *Fusarium moniliforme*. *Plant Dis. Repr.*, 54:307-310.
- FERNANDES, F.T., 1975. Avaliação de cultivares de milho (*Zea mays* L.) quanto à suscetibilidade a *Fusarium moniliforme* e *Diplodia maydis* após a inoculação artificial dos colmos. Piracicaba, U.S.P., 66 p. (Dissertação de Mestrado).
- FOLEY, D.C., 1960. The response of corn to inoculation with *Diplodia zeae* and *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 50:146-150.
- FOLEY, D.C., 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 52:870-872.
- FUTRELL, M.C. & MARCIA KILGORE, 1969. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*. *Plant Dis. Repr.*, 53:213-215.

- GALLI, F.; H. TOKESHI; P.C.T. de CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI, C.O.N. CARDOSO & C.L. SALGADO, 1968. Manual de Fitopatologia. Editora Agronômica Ceres - São Paulo. 640 p.
- GARBER, E.D.; ELLEN G. WYTTENBACH & T.S. DHILLON, 1961. Genetics of phytopathogenic fungi. V. Heterocarions involving formae of *Fusarium oxysporum*. Am. J. Botany, 48:325-329.
- HANSEN, H.N., 1938. The dual phenomenon in imperfect Fungi. Mycologia, 30:442-455.
- HANSEN, H.N. & R.E. SMITH, 1932. The mechanism of variation in the fungi imperfecti: *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 22:953-964.
- HRUSHOVETZ, S.B., 1956. Cytological studies of *Helminthosporium sativum*. Can. J. Botany, 34:321-327.
- HSIEH, W.H.; W.C. SNYDER & S.N. SMITH, 1979. Influence of carbon sources, amino acids, and water potential on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 69:602-604.
- KOEHLER, B., 1930. Corn diseases in Illinois. University of Illinois Agric. Exp. Sta. Bull., 354.
- KOEHLER, B., 1936. Entry of *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium* into growing corn ears.

- Phytopathology, 26:98-99 (Abstr.).
- KOEHLER, B., 1959. Corn ear rots in Illinois. University of Illinois. Agric. Exp. Sta. Bull., 639.
- KOEHLER, B., 1960. Corn stalk rots in Illinois. University of Illinois. Agric. Exp. Sta. Bull., 658 (90 p.)
- KUCHAREK, T.A. & T. KOMMEDAHL, 1966. Kernel infection and corn stalk caused by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 56:983-984.
- LEONIAN, L.H., 1929. Studies on the variability and dissociations in the genus *Fusarium*. Phytopathology, 19:753-868.
- LEONIAN, L.H., 1930. Attempts to induce "mixochimaera" in *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 20:895-901.
- LILLY, V.G. & H.L. BARNETT, 1951. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill Book Company Inc. 464 p.
- LOESCH, P.J. Jr.; D.C. FOLEY & D.F. COX, 1976. Comparative resistance of opaque-2 and normal inbred lines of maize to ear-rotting pathogens. Crop Science, 16:841-842.
- MELCHERS, L.E. & C.D. JOHNSTON, 1923. Corn root, stalk and ear rot disease investigations in Kansas: Report of

- progress 1922. *Phytopathology*, 13:52 (Abstr.).
- MELCHERS, L.E. & C.D. JOHNSTON, 1924. Second progress report on studies of corn seed germination and the prevalence of *Fusarium moniliforme* and *Diplodia zeae*. *Phytopathology*, 14:45 (Abstr.).
- MELCHERS, L.E., 1956. Fungi associated with Kansas hybrid seed corn. *Plant Dis. Repr.*, 40:500-506.
- MEW, I-pin. C. & T. KOMMEDAHL, 1972. Interaction among microorganisms occurring naturally and applied to pericarps of corn kernels. *Plant Dis. Repr.*, 56:861-863.
- MING, Y.N.; P.C. LIN & T.F. YU, 1966. Heterocaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw) Wr. *Scientia Sinica*, 15:371-378.
- MOHAMED, H.A.; W.E. ASHOUR; A.R. SIRRY & S.M. FATHI, 1967. Fungi carried by corn seed and their importance in causing corn diseases in the United Arab Republic. *Plant Dis. Repr.*, 51:53-56.
- MOHAMED, H.A.; W.E. ASHOUR; A.R. SIRRY & S.M. FATHI, 1968. Fungi causing seedling blight of corn in the United Arab Republic. *Plant Dis. Repr.*, 52:84-86.
- MORGAN, O.D., 1971. Sclerotial formations by *Helminthosporium maydis* race T on corn seed. *Plant Dis.*

Reptr., 55:755-756.

MOURA, CERES B., 1978. Efeito do *Helminthosporium turcicum* Pass. em duas linhagens de milho (*Zea mays* L.), uma resistente e outra susceptível e nas gerações derivadas desses germoplasmas. Campinas, UNICAMP, 50 p. (Dissertação de Mestrado).

NASS, H.G. & P.L. CRANE, 1970a. Effect of endosperm mutants on germination and early seedling growth rate in maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 10:139-140.

NASS, H.G. & P.L. CRANE, 1970b. Effect of endosperm genes on dry matter accumulation and moisture loss in corn (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 10:276-280.

NOBLE, MARY & M.J. RICHARDSON, 1968. An annotated list of seed-borne diseases. Surrey, England. The Gresham Press Unwin Brothers Limited, Woking 191 p.

NWIGWE, C., 1974. Occurrence of *Phomopsis* on maize (*Zea mays* L.). *Plant Dis. Repr.*, 58:416-417.

OOKA, J.J.; T. KOMMEDAHL & R.E. STUCKER, 1972. Natural occurrence of *Fusarium moniliforme* in corn kernels with opaque endosperm. *Phytopathology*, 62:781. (Abstr.).

OOKA, J.J. & T. KOMMEDAHL, 1977. Kernels infected with *Fusarium moniliforme* in corn cultivars with opaque-2

- endosperm or male-sterile cytoplasm. Plant Dis. Reprtr., 61:162-165.
- PARADELA Fº, O., 1972. Avaliação do comportamento de populações de milho (*Zea mays* L.) inoculadas artificialmente com os agentes das podridões do colmo e da espiga. Piracicaba, U.S.P., 44 p. (Tese de M.S.).
- PARMETER JR., J.R.; W.C. SNYDER & R.E. REICHLE, 1963. Heterokaryosis and variability in plant-pathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopathology, 1:51-76.
- PATERNIANI, E., Coord., 1980. Melhoramento e produção de milho no Brasil. Piracicaba/ESALQ, Marprint, 2ª impressão. 650 p.
- PEREIRA, W.S.P., 1976. Patogenicidade de *Helminthosporium turcicum* Pass. em milho (*Zea mays* L.) e em sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.). Piracicaba. ESALQ-USP. 69 p. (Dissertação de Mestrado).
- PRITCHARD, D.W., 1974. Eradication of *Helminthosporium maydis* inside popcorn seed. Phytopathology, 64:757-758.
- SANCHEZ, L.E.; J.V. LEARRY & R.M. ENDO, 1976. Heterokaryosis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Jour. of Gen. Microbiol., 93:219-226.

- SCOTT, D.J., 1971. The importance to New Zealand of seedborne infection of *Helminthosporium maydis*. Plant Dis. Reptr., 55:966-968.
- SENN, P.H., 1932. The effect of the sugary gene in corn on resistance to seedling blight caused by *Gibberella saubineti*. Phytopathology, 22:675-697.
- SOAVE, J., 1972. Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação em meios de cultura de diferentes composições, de *Piricularia aryzae* Cav., agente do Brusone do Arroz. Piracicaba - ESALQ-USP. 53 p. (Tese de Doutorado).
- SUMNER, D.R., 1968. Ecology of corn stalk rot in Nebraska. Phytopathology, 58:761-765.
- TUITE, J. & R.W. CALDWELL, 1971. Infection of corn seed with *Helminthosporium maydis* and other fungi in 1970. Plant Dis. Reptr., 55:387-389.
- ULLSTRUP, A.J., 1971. Hyper susceptibility of high-lysine corn to kernel and ear rots. Plant Dis. Reptr., 55:1046.
- WARMKE, H.E. & N.C. SCHENCK, 1971. Occurrence of *Fusarium moniliiforme* and *Helminthosporium maydis* on and in corn seed as related to T cytoplasm. Plant Dis. Reptr., 55:486-489.

WARREN, H.L., 1978. Comparison of normal and high-lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 68:1331-1335.

11. APENDICE

QUADRO I - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *dull* (*du*), e níveis de significâncias nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	46,4	20,3	33,3	NS
	Sem	61,8	17,3	20,9	
Mutante	Com	46,7	29,3	24,0	NS
	Sem	60,0	13,3	26,7	

QUADRO II - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *floury* (*fl*), e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	66,7	20,5	12,8	NS
	Sem	68,5	15,3	16,2	
Mutante	Com	73,0	24,3	2,7	**
	Sem	75,2	8,0	16,8	

NS

QUADRO III - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliiforme*, em endospermas normal e *brittle (bt)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliiforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	72,8	12,1	15,1	NS
	Sem	88,0	5,1	6,9	
Mutante	Com	20,0	58,6	21,4	NS
	Sem	22,5	53,8	23,7	

**

QUADRO IV - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *sugary (su)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância	
		G	NG	GD		
Normal	Com	56,2	15,7	28,1	NS	**
	Sem	70,9	11,6	17,5		
Mutante	Com	22,0	50,5	27,5	**	
	Sem	37,3	22,0	40,7		

QUADRO V - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme* em endospermas normal e *sugary-2 (su2)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	79,5	11,4	9,1	NS
	Sem	75,5	9,4	15,1	
Mutante	Com	69,0	22,4	8,6	**
	Sem	77,2	3,3	19,5	

NS

QUADRO VI - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *amylose extender* (ae), e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância	
		G	NG	GD		
Normal	Com	67,5	23,2	9,3	NS	NS
	Sem	66,3	11,2	22,5		
Mutante	Com	56,2	16,7	27,1	NS	
	Sem	65,7	8,8	25,5		

QUADRO VII - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *brittle-2 (bt2)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	67,5	22,5	10,0	NS
	Sem	65,4	20,0	14,6	
Mutante	Com	8,9	79,2	11,9	**
	Sem	28,6	59,2	12,2	

**

QUADRO VIII - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *opaque-2 (o2)*, e níveis de significância dos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	57,4	36,1	6,5	**
	Sem	78,6	12,4	9,0	
Mutante	Com	45,0	43,8	11,2	**
	Sem	65,7	11,4	22,9	

*

QUADRO IX - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *shrunken-2 (sh2)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância
		G	NG	GD	
Normal	Com	100,0	0,0	0,0	NS
	Sem	71,6	14,2	14,2	
Mutante	Com	28,6	42,8	28,6	NS
	Sem	48,1	26,3	25,6	

**

QUADRO X - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliforme*, em endospermas normal e *waxy* (wx), e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliforme</i>	Germinação			Níveis de Significância	
		G	NG	GD		
Normal	Com	70,9	16,4	12,7	NS	NS
	Sem	67,6	9,9	22,5		
Mutante	Com	57,3	19,6	23,1	NS	
	Sem	58,8	19,1	22,1		

QUADRO XI - Porcentagens de sementes germinadas (G), não germinadas (NG) e com germinação deficiente (GD), com e sem *F. moniliiforme*, em endospermas normal e *shrunken (sh)*, e níveis de significância nos testes de χ^2 .

Tipos de Endosperma	<i>Fusarium moniliiforme</i>	Germinação			Níveis de Significância	
		G	NG	GD		
Normal	Com	46,9	23,5	29,6	**	**
	Sem	75,4	10,1	14,5		
Mutante	Com	39,1	47,1	13,8	**	
	Sem	49,2	20,6	30,2		

QUADRO XII - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *waxy (wx)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice *
5	0,31	0,39	25,8
10	0,52	0,71	36,5
20	1,07	1,22	14,0
40	1,74	2,04	17,2
80	1,80	3,14	74,4

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XIII - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *opaque-2 (o2)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice *
5	0,37	0,58	56,8
10	0,55	0,92	67,3
20	1,08	1,98	83,3
40	1,79	3,34	86,6
80	2,41	4,93	104,6

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XIV - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *amylose extender* (ae), em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,24	0,27	12,5
10	0,48	0,42	-12,5
20	0,96	0,83	-13,5
40	1,68	0,92	-45,2
80	2,75	2,25	-18,2

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XV - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *shrunken-2 (sh2)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,40	0,71	77,5
10	0,73	1,20	64,4
20	1,17	2,60	122,2
40	2,03	4,05	99,5
80	3,27	5,53	69,1

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XVI - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *sugary-2 (su2)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,36	0,33	-8,3
10	0,51	0,57	11,8
20	1,05	1,32	25,7
40	1,67	1,92	15,0
80	3,38	3,44	1,8

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XVII - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *dull* (*du*), em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,32	0,38	18,7
10	0,62	0,64	3,2
20	0,97	1,70	75,3
40	1,67	2,39	43,1
80	3,45	3,71	7,5

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XVIII - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *sugary (su)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,43	0,54	25,6
10	0,65	1,14	75,4
20	1,14	2,21	93,9
40	2,59	3,49	34,7
80	3,73	5,36	43,7

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XIX - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *brittle-2 (bt 2)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,35	0,59	68,6
10	0,57	1,06	86,0
20	1,12	2,04	82,1
40	2,00	3,69	84,5
80	3,73	6,62	77,5

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XX - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *floury (fl)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,43	0,48	11,6
10	0,64	0,69	7,8
20	1,05	0,98	-6,7
40	2,05	1,87	-8,8
80	4,18	3,14	-24,9

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco de micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XXI - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *shrunken (sh)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,37	0,44	18,9
10	0,65	0,77	18,5
20	1,22	1,70	39,3
40	2,48	3,19	28,6
80	4,17	5,33	27,8

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.

QUADRO XXII - Peso seco de micélio de *F. moniliforme* obtido em meio líquido com farinhas de endospermas normal e mutante *brittle (bt)*, em diferentes concentrações de milho.

Concentração de milho (g/l)	Peso seco de micélio (g/l)		
	Normal	Mutante	Índice*
5	0,42	0,55	31,0
10	0,62	0,90	45,2
20	1,21	1,74	43,8
40	2,57	3,29	28,0
80	4,75	5,20	9,5

* O índice corresponde a porcentagem do peso seco do micélio no mutante, acima do observado no endosperma normal.