

METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE *Fusarium moniliforme* SHELDT.
E SUA OCORRÊNCIA EM SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)
PRODUZIDAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

IVAN PAULO BEDENDO
- EMBRAPA -

Orientador: Prof. Dr. Caio Otávio Nogueira Cardoso

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Maio, 1978

A Deus por me conceder a graça de
ter mais uma aspiração concretizada, e
uma obrigação cumprida,

AGRADEÇO

Em reconhecimento aos meus pais Ivo e Lourdes
pelo esforço que jamais pouparam para
minha formação,

DEDICO

À minha namorada Ana Carolina, e à
minha irmã Ivana pelo constante
incentivo e compreensão,

OFEREÇO

O AUTOR EXPRESSA SEUS AGRADECIMENTOS ÀS SEGUINTE ENTIDA
DES E PESSOAS:

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo durante o referido curso.

Ao professor Dr. Caio Otávio Nogueira Cardoso pela amizade, apoio e orientação durante o curso, e na elaboração da dissertação.

Ao professor Dr. Décio Barbin do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - (ESALQ) pela orientação nos trabalhos de análise estatística.

À professora Dra. Elke J. B. N. Cardoso pelas sugestões e revisão do original deste trabalho.

Ao professor Dr. Tasso L. Krug pela revisão do original e colaboração na versão do resumo para o inglês.

Aos Engenheiros Agrônomos Oswaldo Bertinatto e Dirce Ortoni, da CATI; Carlos Alberto Gonçalves, da Agroceres; e ao Dr. Ernesto Paterniani, do Instituto de Genética da ESALQ, pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial aos professores Eric Balmer, Elke J. B. N. Cardoso, Hiroshi

Kimati, Clélio L. Salgado e Tasso L. Krug pela amizade e ensinamentos.

Aos colegas de curso pela amizade que mantivemos durante a realização do mesmo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ e às pessoas que, de um modo direto ou indireto, colaboraram para a elaboração deste trabalho.

I N D I C E

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODO	19
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	58
7. SUMMARY	60
8. LITERATURA CITADA	62

1. RESUMO

Há grande variação na metodologia empregada para análise fitossanitária de sementes de milho. Com a finalidade de se padronizar um método rápido para detecção de *Fusarium moniliforme* Sheld em sementes de milho, testou-se dois pré-tratamentos, quatro substratos, quatro temperaturas de incubação e cinco períodos de incubação. O pré-tratamento por temperatura baixa (-20°C), o substrato de ágar-água, a temperatura de incubação de 28°C e o período de 5 dias de incubação foram os tratamentos mais adequados para a mencionada finalidade. A partir destes resultados sugere-se o seguinte método de análise: empregar uma solução de hipoclorito de cálcio 1% (peso-volume), durante 10 minutos, para desinfecção superficial das sementes; pré-germinar as mesmas em água destilada esterilizada por 12 horas; submetê-las à temperatura de -20°C durante 12 horas; plaqueá-las sobre substrato de ágar-água e incubar por 5 dias, sob temperatura de 28°C.

Com o objetivo de se avaliar a capacidade de diferentes variedades de milho em veicular *F. moniliforme* através de sementes, a mostras de doze variedades, cultivadas num mesmo campo experimental, fo

ram submetidas à análise. Os resultados mostraram que determinadas variedades têm maior capacidade do que outras, em transmitir este fungo por meio das suas sementes.

Amostras de sementes de milho de uma mesma variedade foram colhidas em diferentes campos de produção no Estado de São Paulo, visando-se estudar a ocorrência de *F. moniliforme* nestes locais. Este estudo demonstrou que o fungo tem uma distribuição generalizada dentro da área amostrada, sendo a intensidade de sua ocorrência maior ou menor, dependendo do local onde a semente é produzida.

Não se observou uma correlação inversa entre a porcentagem de ocorrência de *F. moniliforme* nas sementes de milho e a porcentagem de germinação das mesmas, concluindo-se daí, que a presença deste fungo não afeta a germinação das sementes.

2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, a cultura do milho ocupa uma posição de desta que quando confrontada com outras culturas, seja pelo volume de sua produção, seja pela área cultivada que este cereal ocupa; no entanto, se e alto o volume produzido, o mesmo não acontece com o rendimento, pois o índice de volume de produção por área cultivada é baixo, quando comparado com outros países produtores, de acordo com AGROANALYSIS (1977).

Segundo GALLI et alii (1968), o uso de práticas culturais pouco adequadas, o ataque de pragas e a incidência de doenças são mencio nadas como causas do baixo rendimento desta gramínea em nosso país.

Considerando a cultura do milho sob o aspecto fitopatol^o gico, GALLI et alii (1968) apontam vários tipos de manchas foliares e po dridões como responsáveis pela redução na produção de grãos ou sementes. NOBLE & RICHARDSON (1968) mencionam que a maioria dos agentes causais das manchas foliares e podridões que ocorrem no milho podem ser transmi tidos pelas sementes.

DJAKAMIHARDJA et alii (1970) afirmam que *Fusarium monili*

forme é o fungo de maior ocorrência em áreas úmidas dos Estados Unidos, causando podridão de raízes, colmos e espigas. Em experimentos realizados por VALLEAU (1920) e por HOSNI et alii (1967) foi demonstrada a ocorrência deste fungo como agente causal de podridões, por ter sido o mesmo freqüentemente isolado de colmos de milho que apresentavam sintomas de podridão. AYERS et alii (1972) confirmam esta ocorrência generalizada de *F. moniliforme* em podridões de colmo, pois constataram a presença deste fungo em 88% e 64% das amostras de colmo com sintoma de podridão coletadas em campos de milho da Pensilvania, USA, em 1970 e 1971, respectivamente.

A sintomatologia da podridão do colmo causada por *F. moniliforme* se caracteriza, segundo FOLEY (1960) e GALLI et alii (1968), por uma gradual desintegração do tecido parenquimatoso dos internódios, o qual toma uma cor rosada, restando apenas os feixes vasculares.

Os danos provocados pelo ataque deste fungo em "seedlings" variam desde o subdesenvolvimento até a morte dos mesmos, de acordo com FUTRELL & KILGORE (1969). Estes mesmos autores demonstraram que o subdesenvolvimento e a morte de "seedlings" se constituem num fator negativo na obtenção de bons "stands" em campos de milho do Mississipi, nos Estados Unidos. DJAKAMIHARDJA et alii (1970) comprovaram que *F. moniliforme* causa redução na emergência e vigor dos "seedlings", o que resulta em "stands" de má qualidade. Esta comprovação foi feita pelos autores em experimentos de laboratório utilizando híbridos resistentes e suscetíveis, sendo que no primeiro caso o fungo reduziu em 28%, 31% e 10% a emergência, o vigor e o "stand", respectivamente; e no segundo caso em 65%, 40%

e 64%, respectivamente.

Com relação às condições ambientais, HOSNI et alii (1967), FUTRELL & KILGORE (1969) e DJAKAMIHARDJA et alii (1970) mencionam que a incidência de *F. moniliforme* é maior em áreas úmidas.

As sementes de milho, segundo NOBLE & RICHARDSON (1968), veiculam a maioria dos patógenos que atacam este cereal. De acordo com LANDAETA (1968) e NATH et alii (1970), as sementes, de um modo geral, são responsáveis pela disseminação e perpetuação de microorganismos e podem dar origem a focos de infecção primária.

Para o caso específico de sementes de milho, inúmeros fungos, saprofitos ou patogênicos podem ser disseminados através das mesmas segundo LE CLERG (1953), MELCHERS (1956), NOBLE & RICHARDSON (1968) e TUIITE & CALDWELL (1971), destacando-se principalmente *Fusarium* sp, *Helminthosporium* sp, *Cephalosporium* sp, *Nigrospora* sp, *Diplodia* sp, *Gibberella* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. Quanto à disseminação através dos grãos de milho, *F. moniliforme* pode ser veiculado externamente aos mesmos, sendo que neste último caso, este fungo já foi encontrado no embrião e no endosperma por SUMNER (1966 e 1968) e SALAMA & MISHRICKY (1973), e no pedicelo e camadas de abscisão por SUMNER (1966 e 1968).

VALLEAU (1920) e MELCHERS & JOHNSTON (1923) determinaram, em germinador, que 95% a 100% das sementes de milho testadas estavam naturalmente infectadas com *F. moniliforme*. MELCHERS (1956) constatou que 69 a 75% das sementes de milho produzidas no Kansas, USA, estavam infectadas por este fungo. TUIITE & CALDWELL (1971) coletaram sementes de mi

lho em campos comerciais do estado de Indiana, USA, e detectaram a presença de *F. moniliforme* em 44% das sementes amostradas. HOSNI et alii (1967) determinaram que 90% dos fungos isolados de grãos de milho produzidos na República Árabe Unida pertenciam a esta espécie. SUMNER (1968), estudando a ocorrência de podridão de raiz, colmo e espiga em plantas de milho cultivadas em Nebraska, USA, detectou *F. moniliforme* em aproximadamente 50% das sementes provenientes de espigas com sintomas de podridão. Em Minnesota, USA, KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966) trabalharam com sementes de milho infectadas naturalmente e determinaram a presença de *F. moniliforme* em 88 a 89% das sementes de determinados híbridos. Houve, entretanto, outros híbridos cujas sementes se mostraram praticamente livres deste fungo.

A ocorrência de *F. moniliforme* em sementes de milho é bastante variável como é demonstrado por MELCHERS (1956), WARMKE & SCHENCK (1971) e SALAMA & MISHRICKY (1973).

MELCHERS (1956) mostrou que em híbridos de sementes amarelas, a porcentagem de ocorrência de *F. moniliforme* era maior do que em híbridos de sementes brancas. No primeiro caso, 75,6% das sementes estavam infectadas por este fungo e no segundo caso 69,0% delas apresentavam este patógeno. Este mesmo autor demonstrou também que há variação na ocorrência do fungo dependendo do local onde a semente é produzida; no entanto, não é citado no seu trabalho, se as sementes utilizadas são todas de um mesmo híbrido ou de híbridos diferentes.

WARMKE & SCHENCK (1971), utilizando sementes de milho colhidas na Flórida, USA, demonstraram que híbridos com citoplasma Texas

eram acentuadamente mais suscetíveis à infecção do grão, causada por *F. moniliforme*, do que híbridos com citoplasma normal. Nas suas determinações, estes autores encontraram o fungo presente em 58,7% das sementes com citoplasma Texas e em 31,2% das sementes com citoplasma normal.

SALAMA & MISHRICKY (1973) realizaram um levantamento de fungos em grãos de milho produzidos em campos comerciais do Egito. Estes autores demonstraram que, embora houvesse variação na ocorrência de *F. moniliforme* entre as variedades testadas, este fungo se apresentou como um dos predominantes em todas elas.

F. moniliforme, quando presente nas sementes, pode provocar redução na germinação das mesmas e prejudicar o desenvolvimento das plantas provenientes destas sementes. No entanto, os trabalhos encontrados na literatura são bastante contraditórios no que diz respeito a estes prejuízos.

MELCHERS & JOHNSTON (1924), trabalhando com lotes de sementes de milho naturalmente infectadas, detectaram *F. moniliforme* em aproximadamente 95% das sementes colocadas em germinador. Estas sementes apresentaram 98% de germinação, contudo, o autor não menciona a porcentagem de germinação das sementes livres do fungo.

CUDDY & WALLEN (1965) coletaram sementes no campo e as plaquearam sobre ágar, com a finalidade de averiguar a presença de *F. moniliforme* e a germinação das mesmas. Os autores obtiveram dados nos quais lotes com 62% de sementes infectadas por este fungo apresentaram taxa de germinação de 28%, enquanto outros lotes de sementes sadias (porcentagem zero de infecção) apresentaram 94% de germinação.

WARMKE & SCHENCK (1971), utilizando sementes produzidas no campo e colocando-as em papel toalha, determinaram que lotes apresentando 72% de sementes infectadas por *F. moniliforme* germinaram numa taxa de 90%. Os autores não citam em seu trabalho dados que possibilitem comparar a germinação de lotes de sementes infectadas com lotes de sementes sadias.

VALLEAU (1920) menciona que a infecção de sementes por *F. moniliforme*, a não ser que seja muito severa, tem pequeno efeito sobre a germinação e o vigor de "seedlings". No entanto, CRISTENSEN & KAUFFMAN, citados por BRODNIK (1975), afirmam que sementes produzidas sob condições climáticas favoráveis a este fungo, têm diminuída sua capacidade germinativa.

Com relação ao desenvolvimento de plantas a partir de sementes infectadas por *F. moniliforme*, vários autores procuraram associar a ocorrência de podridão de colmo e raiz com nível de infecção de sementes por este fungo. Assim como no caso anterior os trabalhos se apresentam pouco conclusivos.

SUMNER (1966) colocou sementes de milho para germinar e posteriormente transplantou os "seedlings" para vasos de areia que permaneceram em câmara de crescimento até a maturidade das plantas. Este autor constatou que plantas provenientes de sementes infectadas por *F. moniliforme* apresentavam significativamente mais podridão de colmo e raiz, do que plantas originárias de grãos não infectados. Com respeito a este trabalho, deve-se dizer que as sementes utilizadas apresentavam *Cephalosporium* sp ocorrendo juntamente com *F. moniliforme*, embora não seja men

cionado o nível de ocorrência de um e de outro.

KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966) trabalharam com lotes de sementes que apresentavam diferentes níveis de infecção por *F. moniliforme*. Os grãos foram semeados no campo e estes autores comprovaram que não houve diferença apreciável entre as porcentagens de plantas apresentando podridão de raiz.

SUMNER (1968) realizou experimentos em condições de casa de vegetação e de campo, utilizando sementes colhidas em campos de milho. Nos experimentos conduzidos em casa de vegetação as sementes infectadas e não infectadas por *F. moniliforme*, foram colocados para germinar em placas de Petri, sendo os "seedlings" transplantados para vasos; enquanto que nos experimentos de campo, os "seedlings" foram diretamente transplantados para o solo. Os resultados mostraram que as plantas originadas de grãos infectados apresentavam significativamente mais podridão do que as originárias de sementes livres do fungo. No entanto, nas plantas crescidas no campo não houve diferença significativa entre as plantas provenientes de sementes infectadas e sadias, no que se refere à podridão do colmo. Neste trabalho, o autor menciona o nível de infecção das sementes por *F. moniliforme* como sendo de 98%.

O fato de sementes infectadas por *F. moniliforme* poderem originar plantas infectadas evidencia a possibilidade deste fungo ocorrer de maneira sistêmica em plantas de milho. FOLEY (1962), trabalhando com plantas de milho coletadas no campo, conseguiu isolar *F. moniliforme* a partir de raiz, colmo, gemas axilares, folhas e sementes. Segundo SALAMA & MISHRICKY (1973) sementes infectadas por este fungo podem germinar

e o micélio se espalhar pelos tecidos, sendo que, quando ocorre a formação de novas espigas, o fungo pode infectar as sementes e reiniciar novamente o ciclo. SUMNER (1968) transplantou para vasos de areia "seedlings" provenientes de sementes infectadas por *F. moniliforme* e posteriormente por meio de isolamentos, constatou a ocorrência sistêmica deste fungo nas plantas de milho.

O modo de ação de *F. moniliforme* sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento dos "seedlings", é através de uma toxina, como foi constatado por vários autores. Assim é que FUTRELL & KILGORE (1969) demonstraram que o fungo produz uma toxina que sintetizada no endosperma da semente de milho, é translocada para as raízes, nas quais provoca inibição no seu desenvolvimento. SCOTT & FUTRELL (1970) impregnaram papel toalha com toxina produzida por este fungo e colocaram sementes de milho para germinarem; os resultados obtidos comprovaram que a toxina causa inibição no desenvolvimento de raízes, sendo que a mesma é estável ao calor e solúvel em água. BRODNIK (1975) estudou um metabólito tóxico produzido por *F. moniliforme* e o denominou de zearalenone, constatando que o mesmo é responsável pela redução no desenvolvimento do embrião e conseqüentemente na germinação das sementes de milho testadas.

Um lote de sementes, segundo LANDAETA (1968), pode possuir um alto grau de pureza e elevado poder germinativo, porém pode ser portador de organismos patogênicos que podem pôr em risco toda cultura. É por este motivo que o autor afirma que a análise da sanidade de sementes tem hoje em dia importância fundamental na certificação das mesmas. Ainda, segundo ele, a análise fitopatológica de sementes, utilizando diversos métodos de laboratório, tem como propósito evidenciar os organismos

patogênicos que são transportados pelas mesmas; sendo que a identificação taxonômica e o estudo biológico dos organismos veiculados, bem como sua relação com cultivos subsequentes da hospedeira, constituem a patologia de sementes.

De acordo com KULLIK (1968) os seguintes métodos gerais são os mais comumente empregados para avaliação das condições fitossanitárias de sementes. O primeiro deles é o da placa de ágar, no qual as sementes são plaqueadas em meio de cultura contendo ágar, sendo que a avaliação é feita pela observação de microrganismos que crescem da semente para este substrato. Outro é denominado "blotter" ou papel mata-borrão, no qual as sementes são plaqueadas sobre papel mata-borrão ou papel de filtro umedecido, sendo a avaliação feita através da observação de microrganismos que se desenvolvem sobre a semente. O terceiro método mencionado por este autor é o método de semeadura, no qual as sementes são colocadas em vasos com algum tipo de substrato, sendo que os critérios de avaliação se baseiam na porcentagem de germinação e na ocorrência de "seedlings" com presença de sintomas. O método chamado "rag-doll" ou papel-toalha utilizado por SCOTT (1971) também é freqüentemente citado pela literatura. Neste método, as sementes são dispostas sobre folhas de papel toalha umedecidas, sendo estas folhas enroladas e colocadas em saco de polietileno, e após determinado período de tempo as sementes são avaliadas, procedendo-se à contagem de sementes germinadas e dos "seedlings" apresentando sintomas.

Apesar de todos estes métodos serem comumente utilizados, o método do papel mata-borrão e o método da placa de ágar são os mais freqüentemente encontrados na literatura. Os passos fundamentais que

constituem ambos os métodos são por sequência: esterilização superficial da semente; plaqueamento sobre papel mata-borrão, papel de filtro ou meio de ágar; incubação por determinado período de tempo a uma dada temperatura e avaliação. Há, no entanto, muitas variantes em cada um dos passos mencionados, e como consequência, os métodos se tornam desuniformes, caracterizando-se por uma falta de padronização.

Com relação à esterilização superficial das sementes, tanto os germicidas empregados como o tempo em que as sementes de milho permanecem sob sua ação, variam bastante. WARMKE & SCHENCK (1971) promoveram a esterilização superficial de sementes de milho através da imersão das mesmas em álcool 70%, seguida por um tratamento por solução 0,525% de hipoclorito de sódio durante 30 minutos. BRODNIK (1975) empregou solução 5% de hipoclorito de sódio por 10 minutos e posteriormente lavou as sementes em água destilada. SUMNER (1968) usou para desinfecção superficial de sementes, solução 1% de cloreto de mercúrio durante 3 a 5 minutos e em seguida lavou as sementes em água esterilizada. KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966), KULIK (1971)a, KULIK (1971)b, e OOKA et alii (1972), para esterilizar externamente as sementes, mergulharam as mesmas em solução 1% de hipoclorito de sódio durante 1 minuto, e em seguida estas foram lavadas em água esterilizada. SALAMA & MISHRICKY (1973) fizeram uso de solução 0,3% de cloreto de mercúrio por um período de tempo de 15 minutos e após este tratamento lavaram as sementes várias vezes em água esterilizada. HOSNI et alii (1967) e HOSNI et alii (1968) mergulharam as sementes em solução 1% de cloreto de mercúrio por 2 minutos e as lavaram logo em seguida em água destilada esterilizada. PRITCHARD (1974) empregou, na desinfecção superficial de sementes, uma solução

0,5% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos, lavando as sementes em água esterilizada, logo em seguida. CROZIER & BRAVERMAN (1971) e SINGH et alii (1974) utilizaram 10 minutos como tempo de imersão das sementes no germicida, sendo que o primeiro utilizou solução 1,5% de hipoclorito de sódio e não lavou as sementes em água, e o segundo empregou solução 2,0% do mesmo produto, mas não mencionou lavagem ou não das mesmas. FOLEY (1962) em seu trabalho, utilizou hipoclorito de cálcio como agente germicida, porém não são dados detalhes quanto ao seu emprego. Todos os autores, anteriormente citados, utilizaram a esterilização superficial das sementes, porém nenhum deles justifica o motivo do emprego de um germicida ou do tempo durante o qual as sementes permanecem imersas no mesmo. Nenhum deles comenta se algum teste preliminar foi realizado para se determinar qual metodologia é mais eficiente para ser empregada na esterilização superficial. Em toda literatura consultada, somente o trabalho de MELCHERS (1956) testou a imersão de sementes utilizando tempos de 2, 3 e 5 minutos numa solução 1% de hipoclorito de sódio e escolheu o tempo de 2 minutos, embora nenhum deles provocasse injúria nas sementes. Quanto ao efeito dos germicidas, MOORE & OLIN (1952) notaram que o cloreto de mercúrio pode não ser totalmente lavado da semente, e seu resíduo pode afetar o desenvolvimento do fungo presente na mesma, dificultando a análise.

Os substratos comumente utilizados para o plaqueamento das sementes também são bastante diversificados. SCOTT (1971), KULIK (1971)a KULIK (1971)b, NWIGWE (1974), SINGH et alii (1974) e BRODNIK (1975) empregaram papel mata-borrão como substrato. SINGH et alii (1967), BOOTHROYD (1971) e SALAMA & MISHRICKY (1973) plaquearam sementes de milho sobre pa

pel de filtro umedecido. TUIITE (1961) e MEW & KOMMEDAHL (1972) fizeram uso de malte-ágar. CROZIER & BRAVERMAN (1971) usaram meio de cultura malte-neopeptona, enquanto OOKA et alii (1972) empregaram meio de PCNB-peptona ágar, no plaqueamento de sementes. PRITCHARD (1974), em seu experimento, fez uso de "V-8 juice"-ágar como substrato; com esta mesma finalidade meio de cultura composto por batata-dextrose-ágar foi empregado por DUNGAN & KOEHLER (1944), MELCHERS (1956), TUIITE (1961), KUCHAREK & KOMMEDAHL (1966), HOSNI et alii (1967), SUMNER (1968), HOSNI et alii (1968), TUIITE & CADWELL (1971), MEW & KOMMEDAHL (1972), e por SINGH et alii (1974). Nenhum autor tece comentários se algum teste prévio foi realizado para indicar qual seria o substrato mais apropriado.

A temperatura utilizada durante o período de incubação das sementes de milho é outro fator bastante variável, em relação aos métodos do papel mata-borrão e da placa de ágar. FOLEY (1962) utilizou em seu trabalho temperaturas oscilando entre 10 e 15°C. BRODNIK (1975) empregou 18°C como temperatura de incubação. SUMNER (1968) e KULIK (1971) colocaram as sementes para incubar em temperaturas oscilando entre 20 e 25°C. Oscilação de temperatura entre 21 e 23°C foi empregada no experimento realizado por KULIK (1971)b. Em testes conduzidos por OOKA et alii (1972) uma temperatura constante de 24°C foi usada durante a incubação das sementes. KOMMEDAHL & LANG (1971), SCOTT (1971), e CROZIER & BRAVERMAN (1971) incubaram as sementes a 25°C. HOSNI et alii (1967) empregaram para incubação de sementes a temperatura de 27°C. A temperatura de 28°C foi usada por SINGH et alii (1967), SALAMA & MISHRICKY (1973) e por Nwigwe (1974). Testes comparativos para avaliar qual temperatura é a mais adequada, não são comentados por nenhum dos autores. Embora algumas

temperaturas sejam indicadas para determinados fungos, não há justificativa do porquê foram escolhidas. Em toda literatura consultada, o trabalho de SINGH et alii (1974) é o único que procurou avaliar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de fungos presentes em sementes de milho; sendo que estes autores demonstraram que a determinação de *F. moniliforme* em sementes de milho pode ser feita a 20 e 28°C, pois não há diferença significativa quanto aos resultados finais. De acordo com INTERNATIONAL CONFERENCE ON SEED PATHOLOGY (1960) ficou determinado que a temperatura em torno de 28°C é a mais adequada para testes gerais de patologia de sementes produzidas em áreas tropicais, estando o milho aqui incluído.

A duração do período de incubação também é bastante variável, quando os métodos do papel mata-borrão e da placa de ágar são empregados na detecção de fungos presentes em sementes de milho. MORGAN (1971) utilizou um período de incubação de 5 dias, enquanto KULIK (1971)a, fez uso de um período de 6 a 8 dias. Em trabalhos realizados por MORGAN (1971), SALAMA & MISHRICKY (1973), e PRITCHARD (1974), as sementes permaneceram em incubação por 7 dias; sendo que no trabalho de SUMNER (1968) as mesmas foram incubadas por um período de 7 a 21 dias. FOLEY (1962) e KULIK (1971)b, empregaram 8 dias como período de incubação. HOSNI et alii (1967), WARMKE & SCHENCK (1971), e BRODNIK (1975) utilizaram período de incubação de 10 dias, enquanto NWIGWE (1974) utilizou 18 dias. Tal como para esterilização superficial, substratos e temperaturas de incubação, em nenhum dos trabalhos há justificativa para escolha de um determinado período de incubação. Dos autores citados pela literatura somente SINGH et alii (1974) compararam diferentes períodos de incubação na detecção

de *F. moniliforme* em sementes de milho. Estes autores testaram períodos de incubação de 4, 7, 11 e 15 dias e concluíram que nenhuma diferença havia na contagem de sementes infectadas, caso a mesma fosse feita em qualquer um dos períodos testados.

As sementes avaliadas através do método do papel mata-borrão ou da placa de ágar, além de serem submetidas aos passos já citados, podem sofrer uma inibição forçada quanto à germinação. Segundo LIMONARD (1967), a inibição é desejada pelo fato do tecido vivo oferecer resistência ao desenvolvimento do fungo presente no interior da semente, sendo que a quebra de tal resistência favorece o aparecimento do fungo no exterior da mesma.

A literatura cita dois pré-tratamentos para forçar a inibição das sementes, sendo um deles o uso de 2, 4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e o outro, a utilização de temperatura bastante baixa.

O 2,4-D foi primeiramente utilizado por HAGBORG, citado por LIMONARD (1968), para detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão. De acordo com KULIK (1971)b, o 2,4-D é utilizado para umedecer o substrato no método do papel mata-borrão, promovendo a inibição da semente. LIMONARD (1968) relata que a principal restrição ao uso deste produto é o efeito prejudicial que o mesmo pode causar ao fungo, impedindo que o mesmo seja detectado na semente.

O emprego da temperatura baixa, segundo LIMONARD (1967), consiste em submeter as sementes a uma temperatura de -20°C , provocando a morte das mesmas. TEMPE (1970) cita que a temperatura de -20°C por 12 horas é suficiente para causar a morte das sementes em geral. O uso de

temperatura baixa, de acordo com LEMONARD (1968), é vantajoso em relação ao uso de 2,4-D, pois a baixa temperatura somente promove a morte da semente, não afetando o fungo presente em seu interior.

TEMPE (1970) comenta que, devido às inúmeras variações apresentadas pelos métodos do papel mata-borrão e da placa de ágar, muita pesquisa ainda deve ser feita com a finalidade de uniformizá-los. De acordo com LANDAETA (1968), a falta de uniformidade encontrada nestes métodos pode ser atribuída ao desenvolvimento de métodos individuais, os quais são adequados às necessidades e facilidades do laboratório que os desenvolve.

LANDAETA (1968) e TEMPE (1970) comentam que os métodos para análise de sanidade de sementes devem preencher determinados requisitos, tais como facilidade e certeza no reconhecimento dos microrganismos presentes nas mesmas; fornecer resultados que possam ser reproduzidos em outros estudos de mesma natureza; serem simples, pouco onerosos e rápidos; devem revelar exatamente a porcentagem de sementes infectadas por microrganismos.

Baseado na literatura consultada, o presente trabalho tem por objetivos:

- padronizar uma metodologia que possibilite detectar a presença de *F. moniliforme* em sementes de milho.
- determinar o menor período de tempo, a partir do qual as sementes possam ser seguramente analisadas com relação à ocorrência deste fungo; ou seja, buscar rapidez para o método.

- testar diferentes variedades de milho com a finalidade de avaliar o comportamento das mesmas, quanto a sua capacidade em veicular *F. moniliforme* através das sementes.
- determinar a intensidade de ocorrência deste fungo em diferentes locais do Estado de São Paulo, mediante análise de sementes.

3. MATERIAL E MÉTODO

As sementes de milho utilizadas nos experimentos foram fornecidas pela Agroceres, Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) da Universidade de São Paulo e pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Em todos os experimentos, as sementes foram esterilizadas superficialmente por uma solução de hipoclorito de cálcio comercial 1% (peso-volume), durante 10 minutos. Anteriormente a esta esterilização, os lotes de sementes, quando apresentavam inseticida, eram lavados em gua corrente durante uma hora para que fosse removido o produto. No preparo da solução de hipoclorito de cálcio, utilizou-se o produto comercial HTH que contém 70% de cloro ativo.

Em seguida, as sementes foram pré-germinadas em frasco de Erlenmeyer contendo água destilada esterilizada, durante um período de 12 horas.

Exceção feita ao EXPERIMENTO I, as sementes pré-germina

das foram acondicionadas em saco de polietileno e submetidas à temperatura de -20°C, onde permaneceram por 12 horas. No entanto, no EXPERIMENTO I, as sementes foram submetidas a dois pré-tratamentos, sendo um delas a temperatura baixa (-20°C) e o outro, a temperatura ambiente.

Sob condições assépticas, quatro sementes foram transferidas para cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, que continha substrato de ágar-água, e em seguida incubadas a 28°C; isto sendo empregado em todos os experimentos.

No EXPERIMENTO I, além de ágar-água e da temperatura de 28°C, foram utilizados os substratos BDA, papel de filtro e meio de BOOTH, e as temperaturas de incubação de 20°C, 25°C e 30°C.

Exceção feita aos EXPERIMENTOS I e II, os demais foram avaliados no 5º dia de incubação, tomando-se como parâmetro o número de sementes infectadas por *F. moniliforme*. No EXPERIMENTO I, as sementes foram avaliadas no 3º, 7º e 10º dias de incubação, e no EXPERIMENTO II, avaliadas no 4º, 5º e 7º dias.

Em todos os experimentos, a identificação deste fungo foi feita através da observação direta das placas de Petri colocadas sob microscópio, utilizando-se ocular 10X e objetiva 10X.

EXPERIMENTO I - Testes comparativos para determinação do melhor pré-tratamento, substrato, período e temperatura de incubação.

Utilizaram-se sementes do híbrido AG-152 da Agrocere, as quais não continham inseticida.

O experimento foi um fatorial, no qual foram testados dois pré-tratamentos, quatro substratos, quatro temperaturas de incubação e três períodos de incubação.

No pré-tratamento, parte das sementes foram submetidas a temperatura baixa (-20°C) por 12 horas e parte, submetidas à temperatura ambiente, também por igual período de tempo.

Os substratos testados foram ágar-água, TUIITE (1969); batata-dextrose-ágar (BDA), TUIITE (1969); meio de cultura número 11 de Booth, BOOTH (1971) específico para crescimento de *Fusarium sp*; e papel de filtro umedecido, TEMPE (1970). O substrato de papel de filtro foi preparado colocando-se uma fina camada de algodão dentro de uma placa de Petri, e sobre o algodão um disco de papel Whattmann número três; este conjunto foi esterilizado a 150°C por três horas, sendo posteriormente umedecido com água esterilizada.

As temperaturas de incubação testadas foram 20°C, 25°C, 28°C e 30°C, e os períodos de incubação comparados tiveram duração de 3, 7 e 10 dias.

A avaliação foi feita no fim de cada período de incubação, tomando-se o mesmo parâmetro citado anteriormente.

A identificação do fungo foi feita de modo idêntico ao citado anteriormente, exceção feita às sementes plaqueadas sobre papel de filtro, pois o mesmo se constitui num substrato opaco. Neste caso, as sementes foram transferidas para lâminas de microscópio, para que fosse possível observar o fungo presente nas mesmas.

O EXPERIMENTO I foi realizado duas vezes de modo idêntico, daí ser dividido em experimento I-A e experimento I-B. Os experimentos I-A e I-B foram realizados com duas repetições cada um.

Tanto no experimento I-A como no I-B, 20 sementes em cada repetição foram submetidas a um tratamento. Cada tratamento constou de uma interação entre um pré-tratamento, um substrato, uma temperatura de incubação e um período de incubação.

EXPERIMENTO II - Comparação entre os períodos de incubação de 4, 5 e 7 dias.

Buscando-se rapidez para o método de detecção de *F. moniliforme* em sementes de milho, utilizaram-se sementes do híbrido AG-152 da Agrocere, as quais foram incubadas por diferentes períodos.

Foram comparados os períodos de incubação de 4, 5, e 7 dias, sendo a avaliação feita no final de cada um dos períodos citados.

O experimento foi montado em três repetições. Para cada repetição 100 sementes foram avaliadas no 4º dia de incubação e posteriormente descartadas, sendo adotado o mesmo procedimento para as avaliações feitas no 5º e 7º dias.

EXPERIMENTO III - Estudo da transmissão de *F. moniliforme* por diferentes variedades de milho.

Para se avaliar a capacidade de diferentes variedades de

milho em transmitir *F. moniliforme*, utilizaram-se doze variedades cultivadas no campo experimental do Instituto de Genética da ESALQ. Por terem sido cultivadas num mesmo local, as variedades colhidas num mesmo ano, estiveram submetidas às mesmas condições de clima, solo e práticas culturais.

As doze variedades utilizadas são citadas a seguir, estando entre parênteses o ano em que foram colhidas: Pérola de Piracicaba (1971), Centralmex (1974), Doce de Cuba (1974), Flint Composto Branco (1975), Flint Composto Amarelo (1975), Dente Composto Branco (1975), Dentado Composto Amarelo (1975), Pipoca Branca (1975), Pipoca Amarela (1975), ESALQ HV-1 (1975), Piranão (1975), Flint Composto br₂ (1976), Piranão (1977) e Centralmex (1977).

Todas as sementes das variedades citadas foram tratadas com os inseticidas Malathion + Diazinon.

Em cada repetição utilizaram-se cinquenta sementes de cada variedade, sendo o experimento montado em três repetições.

EXPERIMENTO IV - Estudo da ocorrência e distribuição de *F. moniliforme* no Estado de São Paulo.

As sementes utilizadas neste experimento foram fornecidas pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

As amostras da variedade Maya foram colhidas em 1977 em diversos municípios do Estado de São Paulo e analisadas em laboratório (QUADRO 1).

QUADRO I - Procedência das amostras de sementes de milho variedade Maya.

AMOSTRA 1	- Fazenda N. S. Fátima	- Adamantina
AMOSTRA 2*	- Fazenda Santa Cristina	- Bauru
AMOSTRA 3*	- Fazenda São Pedro	- Bauru
AMOSTRA 4	- Fazenda da Pedra	- Cosmorama
AMOSTRA 5	Fazenda Augusta	- Gastão Vidigal
AMOSTRA 6	- Fazenda São Luiz	- Ibirã
AMOSTRA 7*	- Fazenda Jaboti	- Lucélia
AMOSTRA 8*	- Fazenda Santa Maria	- Mendonça
AMOSTRA 9*	- Fazenda Paraúna	- Monções
AMOSTRA 10	- Fazenda Jandaia	- Nova Aliança
AMOSTRA 11*	- Fazenda Bonsucesso	- Nova Aliança
AMOSTRA 12*	- Fazenda Recanto do Bora	- Nova Aliança
AMOSTRA 13*		- Ocaçu
AMOSTRA 14	- Fazenda Santa Rita de Cássia	- Paulo de Faria
AMOSTRA 15*	- Fazenda Lagoa aos Patos	- Paulo de Faria
AMOSTRA 16*	- Sítio Planaito	- Sagres

* Amostras tratadas com o inseticida Tetrachlorvinphos.

Cinquenta sementes de cada amostra foram utilizadas por repetição, sendo o experimento montado em três repetições.

TESTE DE GERMINAÇÃO

Para cada um dos experimentos anteriormente descritos, foi avaliada a germinação das amostras ou lotes de sementes empregados nos mesmos. Neste teste, 100 sementes de cada lote foram tratadas por uma solução de hipoclorito de cálcio comercial 1% (peso-solúme) durante 10 minutos e imediatamente colocadas em frasco de Erlenmeyer contendo água destilada, onde permaneceram por 12 horas. Foram, então, transferidas para substrato de ágar-água em número de quatro sementes por placa de Petri. As placas foram deixadas à temperatura ambiente, sendo as sementes avaliadas no 7º dia de incubação através da contagem do número de sementes germinadas. A semente era considerada germinada, quando a mesma apresentava radícula e caulículo.

4. RESULTADOS

EXPERIMENTO I - Resultados dos testes comparativos para determinação do melhor pré-tratamento, substrato, período e temperatura de incuba

As sementes do híbrido AG-152 utilizadas neste experimento, apresentaram taxa de germinação de 98%.

EXPERIMENTO I-A

Os resultados deste experimento estão apresentados no QUADRO II. As análises estatísticas do experimento foram feitas utilizando-se a soma das repetições. Os tratamentos que apresentaram significância no teste F, foram analisados posteriormente pelo teste Tukey.

QUADRO II - Efeitos de pré-tratamentos, substratos, períodos e temperaturas de incubação sobre o número de sementes infectadas por *F. moniliforme*.

SUBSTRATOS	PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (DIAS)	PRÉ-TRATAMENTOS							
		temperatura baixa				temperatura ambiente			
		TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO °C				TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO °C			
		20	25	28	30	20	25	28	30
ÁGAR	3	14	26	30	29	26	23	32	30
	7	34	34	32	34	35	33	36	32
	10	35	35	37	37	35	34	36	32
BDA	3	18	22	25	26	20	23	30	30
	7	32	30	30	29	35	30	35	32
	10	32	33	30	34	36	31	36	32
PAPEL DE FILTRO	3	10	25	20	26	16	24	25	25
	7	27	33	36	31	31	34	29	32
	10	28	33	38	31	31	34	30	32
BOOTH	3	15	19	29	27	24	27	35	26
	7	34	30	37	34	36	36	38	31
	10	35	31	38	38	38	37	39	31

Obs: Os dados representam a soma das duas repetições do experimento I-A.

Os seguintes tratamentos apresentaram diferença altamente significativa no teste F: pré-tratamentos, substratos, períodos de incubação, temperaturas de incubação, interação pré-tratamentos X períodos de incubação e interação temperaturas de incubação X períodos de incubação. A interação pré-tratamentos X temperaturas de incubação apresentou significância ao nível de 5% de probabilidade.

Os pré-tratamentos, temperatura baixa e temperatura ambiente, diferiram significativamente entre si, sendo que este último se mostrou superior, pois se detectou no mesmo um maior número de sementes infectadas por *F. moniliforme*.

Os substratos constituídos por ágar-água e meio de Booth foram aqueles que apresentaram os melhores resultados, ou seja, foram os substratos nos quais se obteve uma contagem maior de sementes que apresentavam *F. moniliforme*. Estes dois substratos não apresentaram diferença significativa entre si, sendo escolhido o substrato de ágar-água por ter composição mais simples e preparo mais fácil. No teste Tukey, foram obtidas as médias 15,875 para ágar-água; 15,813 para meio de Booth ; 15,021 para BDA; 14,063 para papel de filtro. A diferença mínima significativa (DMS) ao nível de 5% foi de 0,683, sendo de 0,835 ao nível de 1%.

Entre as quatro temperaturas de incubação que foram testadas, as temperaturas de 28°C e 30°C foram aquelas que propiciaram uma maior contagem de sementes apresentando *F. moniliforme*. Não ficou demonstrada diferença significativa entre as mesmas, sendo que a média para a temperatura de 28°C foi 16,000 e para 30°C foi 15,563. Foi escolhida a temperatura de 28°C para ser empregada na metodologia para detecção des

te fungo em sementes de milho. As temperaturas de 20°C e 25°C apresentaram, respectivamente, as médias 14,208 e 15,000, diferindo significativamente entre si quanto à contagem de sementes infectadas por este fungo. Para temperaturas, a DMS ao nível de 5% foi de 0,683 e ao nível de 1% foi 0,835.

No caso dos períodos de incubação, um maior número de sementes apresentando *F. moniliforme* foi detectado, quando as mesmas foram incubadas durante 10 dias. As médias para os períodos de 3, 7 e 10 dias foram respectivamente 12,063; 16,313 e 17,203, havendo diferença altamente significativa entre estes períodos de incubação, no que se refere à contagem de sementes infectadas pelo fungo. A DMS para 5% de probabilidade foi de 0,538, e para 1% foi de 0,674.

Quando se analisou a interação pré-tratamentos X temperaturas de incubação ficou demonstrado que, quando se empregaram as temperaturas de incubação de 25°C, 28°C ou de 30°C, não houve diferença significativa entre os pré-tratamentos temperatura baixa e temperatura ambiente (QUADRO III). A diferença altamente significativa entre estes dois pré-tratamentos apontada pelo teste F, pode ser atribuída ao uso da temperatura de 20°C. Uma vez que a temperatura de 28°C foi adotada para a incubação das sementes, optou-se pelo pré-tratamento por temperatura baixa, pois este possibilita maior facilidade no momento da avaliação.

QUADRO III - Médias do número total de sementes infectadas por *F. moniliforme* para a interação pré-tratamentos X temperaturas de incubação.

Pré-tratamentos	Temperaturas de incubação			
	20°C	25°C	28°C	30°C
Temperatura Baixa	13,375	14,958	15,625	15,375
Temperatura Ambiente	15,042	15,042	16,375	15,750

DMS 5% = 1,142 DMS 1% = 1,344

A interação temperaturas de incubação X períodos de incubação, evidenciou que não houve diferença significativa entre os dos de 7 e 10 dias quanto à contagem de sementes com *F. moniliforme*, em qualquer uma das temperaturas de incubação (QUADRO IV). O período de incubação de 3 dias diferiu significativamente dos períodos de 7 e 10 dias, independentemente das temperaturas de incubação utilizadas. Uma vez que 28°C foi adotada para incubação das sementes, e que para esta temperatura os períodos de 7 e 10 dias não diferiram entre si, escolheu-se 7 dias por ser o menor período de incubação para o qual a precisão do método não é prejudicada.

QUADRO IV - Médias do número total de sementes infectadas por *F. moniliforme* para a interação temperaturas de incubação X períodos de incubação.

Períodos de Incubação	Temperaturas de incubação			
	20°C	25°C	28°C	30°C
3 dias	9,375	11,625	13,750	13,500
7 dias	16,125	16,188	16,688	16,250
10 dias	17,125	17,188	17,563	16,938

DMS 5% = 1,513

DMS 1% = 1,752

Com relação a interação pre-tratamentos X períodos de incubação, ficou demonstrado que 7 e 10 dias não diferiram significativamente entre si quanto à detecção de *F. moniliforme* nas sementes, fossem as mesmas submetidas ao pré-tratamento temperatura baixa ou ambiente (QUADRO V). Assim sendo, ficou confirmado o emprego da baixa temperatura e do período de 7 dias na metodologia para análise de sementes. O período de 3 dias diferiu significativamente dos períodos de 7 e 10 dias, tanto para o pré-tratamento temperatura baixa como para temperatura ambiente.

QUADRO V - Médias do número total de sementes infectadas por *F. monilii* forme para a interação pré-tratamentos X período de incubação.

Pré-tratamentos	Períodos de incubação		
	3 dias	7 dias	10 dias
Temperatura Baixa	11,125	16,250	17,125
Temperatura Ambiente	13,000	16,375	17,281
DMS 5% = 0,928	DMS 1% = 1,107		

EXPERIMENTO I-B

Os resultados deste experimento estão apresentados no QUADRO VI. As análises estatísticas do presente experimento foram realizadas utilizando-se a soma das repetições. Todos os tratamentos que apresentaram significância no teste F, foram analisados posteriormente pelo teste Tuckey.

QUADRO VI - Efeitos de pré-tratamentos, substratos, períodos e temperaturas de incubação sobre o número de sementes infectadas por *F. moniliforme*.

SUBSTRATOS	PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (DIAS)	PRÉ-TRATAMENTOS							
		Temperatura baixa				temperatura ambiente			
		TEMPERATURAS DE				TEMPERATURAS DE			
		INCUBAÇÃO °C				INCUBAÇÃO °C			
		20	25	28	30	20	25	28	30
ÁGAR	3	16	25	28	27	24	24	31	31
	7	33	34	34	35	33	34	34	33
	10	34	38	37	35	35	36	36	35
BDA	3	17	23	21	27	21	26	30	30
	7	32	33	32	31	34	30	33	32
	10	34	34	32	32	36	31	37	33
PAPEL DE FILTRO	3	13	22	23	24	18	20	26	25
	7	28	31	31	31	30	31	30	31
	10	31	33	33	33	33	34	32	32
BOOTH	3	15	20	30	25	26	26	31	27
	7	33	32	37	33	35	34	36	34
	10	35	34	37	36	36	35	37	35

Obs: Os dados representam a soma das duas repetições do experimento I-B.

Pré-tratamentos, substratos, períodos e temperaturas de incubação, e ainda a interação temperaturas de incubação X períodos de incubação apresentaram diferença altamente significativa no teste F. As interações pré-tratamentos X temperaturas de incubação, pré-tratamentos X períodos de incubação, e substratos X temperaturas de incubação diferiram significativamente ao nível de 5%, também no teste F.

Os pré-tratamentos diferiram significativamente entre si, sendo que um maior número de sementes infectadas por *F. moniliforme* foi obtido quando se utilizou temperatura ambiente como pré-tratamento.

Quanto aos substratos, obtiveram-se os mesmos resultados do experimento I-A, ou seja ágar-água e meio de Booth se mostraram os melhores, não havendo diferença significativa entre ambos. Escolheu-se, então, o substrato de ágar-água. As médias obtidas para ágar-água, BDA, papel de filtro e meio de Booth foram respectivamente 15,854; 14,813; 14,188 e 15,938 sendo a DMS ao nível de 5% 0,994 e ao nível de 1%, 1,217.

Para temperaturas de incubação, ficou evidenciado que 28°C e 30°C são as temperaturas mais adequadas para incubação das sementes, uma vez que estas propiciaram maior contagem de sementes apresentando *F. moniliforme*. Não houve diferença significativa entre as mesmas, sendo escolhida a temperatura de 28°C. Com base na contagem do número de sementes infectadas pelo fungo, foram obtidas as médias 14,104 para 20°C; 14,938 para 25°C; 16,313 para 28°C e 15,438 para 30°C. A DMS para 5% de probabilidade foi de 0,994 e para 1% foi 1,217.

Nos períodos de incubação de 7 e 10 dias foram detectadas as maiores contagens de sementes com *F. moniliforme*, não se observando

diferença significativa entre os mesmos. Como se deseja rapidez para o método adotou-se o período de 7 dias para incubação das sementes. As médias obtidas no teste Tukey para 3, 7 e 10 dias foram respectivamente 12,141; 16,438 e 17,016 sendo que o período de 3 dias diferiu significativamente dos demais. A DMS ao nível de 5% foi de 0,784 e ao nível de 1% foi de 0,981.

Na interação pré-tratamentos X temperaturas de incubação ficou demonstrado que o pré-tratamento temperatura baixa diferiu significativamente do pré-tratamento temperatura ambiente, somente quando se utilizou a temperatura de incubação de 20°C (QUADRO VII). Assim, fica confirmado que a diferença altamente significativa apontada pelo teste F em relação aos pré-tratamentos, é devida à temperatura de 20°C. Como a temperatura de 28°C foi adotada para incubação das sementes, optou-se pelo pré-tratamento temperatura baixa pelas razões já expostas no experimento I-A.

QUADRO VII - Médias do número total de sementes infectadas por *F. monili* forme para a interação pré-tratamentos X temperaturas de incubação.

Pré-tratamentos	Temperaturas de incubação			
	20°C	25°C	28°C	30°C
Temperatura Baixa	13,083	14,625	15,917	15,667
Temperatura Ambiente	15,125	15,250	16,708	15,208
DMS 5% = 1,664	DMS 1% = 1,960			

Quanto à interação temperaturas de incubação X períodos de incubação, ficou demonstrado que para qualquer temperatura de incubação utilizada, não houve diferença significativa entre os períodos de incubação de 7 e 10 dias (QUADRO VIII). O período de 3 dias diferiu significativamente dos períodos de 7 e 10 dias, para qualquer que fosse a temperatura de incubação. Como foi escolhida 28°C para temperatura de incubação, e como nesta temperatura não houve diferença significativa entre os períodos de 7 e 10 dias, optou-se pelo primeiro por propiciar maior rapidez ao método de análise.

QUADRO VIII - Médias do número total de sementes infectadas por *F. moniliforme* para a interação temperaturas de incubação X períodos de incubação.

Períodos de incubação	Temperaturas de incubação			
	20°C	25°C	28°C	30°C
3 dias	8,938	11,813	14,125	13,688
7 dias	16,500	16,250	17,063	15,938
10 dias	16,875	16,750	17,750	16,688
DMS 5% = 2,204		DMS 1% = 2,552		

Com relação à interação pré-tratamentos X períodos de incubação, o que foi dito para o experimento I-A, é totalmente válido na íntegra para este experimento (QUADRO IX).

QUADRO IX - Médias do número total de sementes infectadas por *F. moniliforme* para a interação pré-tratamentos X períodos de incubação.

Pré-tratamentos	Períodos de incubação		
	3 dias	7 dias	10 dias
Temperatura Baixa	11,281	16,156	17,031
Temperatura Ambiente	13,000	16,719	17,000
DMS 5% = 1,351	DMS 1% = 1,614		

A interação substratos X temperaturas de incubação apresentou significância no teste F do experimento I-B. Analisada posteriormente pelo teste Tukey com base no número de sementes infectadas por *F. moniliforme*, não foi constatada diferença significativa entre os substratos ágar-água e meio de Booth quando se utilizaram as temperaturas de incubação de 28°C e 30°C (QUADRO X). Esta interação confirmou o emprego de ágar-água e 28°C, como substrato e temperatura de incubação mais adequados para a detecção deste fungo em sementes de milho.

QUADRO X - Médias do número total de sementes infectadas por *F. monili* forme para a interação substratos X temperaturas de incubação.

substratos	Temperaturas de incubação			
	20°C	25°C	28°C	30°C
Ágar-água	14,917	15,417	16,917	16,167
BDA	14,417	14,083	15,500	15,250
Papel de filtro	11,917	15,250	14,833	14,750
Meio de Booth	15,167	15,000	18,000	15,583
DMS 5% = 2,675	DMS 1% = 3,071			

Quando se confrontam os resultados da repetição do EXPERIMENTO I, nota-se que o experimento I-B confirma os resultados obtidos em I-A.

Em ambos os experimentos, ágar-água e meio de Booth se mostraram como melhores substratos, não diferindo significativamente entre si. Escolheu-se o substrato de ágar-água por ser o mesmo de composição e preparo mais simples.

As temperaturas de 28°C e 30°C foram apontadas tanto em I-A como em I-B, como sendo as melhores temperaturas para incubação das sementes, sendo escolhida a temperatura de 28°C.

Os experimentos I-A e I-B apresentaram o período de incubação de 3 dias diferindo significativamente dos períodos de 7 e 10 dias. No experimento I-A, 7 e 10 dias diferiram significativamente entre si, porém no experimento I-B, os mesmos não apresentaram diferença significativa. Em ambos os experimentos, a interação temperaturas de incubação X períodos de incubação demonstrou que, quando a temperatura de 28°C ou 30°C foi utilizada na incubação, não houve diferença significativa entre os períodos de 7 e 10 dias. Sendo uma das finalidades do experimento buscar rapidez para o método de detecção de *F. moniliforme* nas sementes, optou-se pelo período de 7 dias.

Os pré-tratamentos temperatura baixa e temperatura ambiente, diferiram significativamente entre si, com vantagens para este último. No entanto, para ambos os experimentos, quando se analisaram as interações pré-tratamentos X temperaturas de incubação e pré-tratamentos X períodos de incubação, ficou demonstrado que estes dois pré-tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. A temperatura baixa foi escolhida pelo fato de a mesma possibilitar maior facilidade e clareza quando da avaliação das sementes.

A interação substratos X temperaturas de incubação apresentou significância no experimento I-B, sendo que esta interação confirmou as temperaturas de 28°C e 30°C como sendo as melhores temperaturas de incubação e ágar-água e meio de Booth como os melhores substratos, sendo que os mesmos não apresentaram diferença significativa entre si. Portanto, estes resultados vieram a confirmar os demais resultados obtidos em outros tratamentos.

EXPERIMENTO II - Resultados referentes à comparação entre os períodos de incubação de 4, 5 e 7 dias.

QUADRO XI - Influência de diferentes períodos de incubação na detecção de *F. moniliforme* em sementes de milho.

Período de incubação	Nº sementes com <i>F. moniliforme</i>	*Nº sementes sem <i>F. moniliforme</i>	Total de sementes
4 dias	222	78	300
5 dias	221	79	300
7 dias	225	75	300

* Nº de sementes sem *F. moniliforme* engloba sementes com outros fungos e sementes livres de fungos.

Para este experimento aplicou-se o teste do qui-quadrado, o qual evidenciou que não havia diferença significativa no número de sementes infectadas por *F. moniliforme*, fossem as mesmas avaliadas no 4º, 5º ou 7º dias de incubação.

Pelo fato de não ocorrer diferença significativa entre os períodos de incubação testados, optou-se pelo período de 5 dias para in

cubação das sementes.

A porcentagem de germinação do lote de sementes utilizado no presente experimento foi de 99%.

EXPERIMENTO III - Resultados do estudo da transmissão de *F. moniliforme* por sementes de milho de diferentes variedades cultivadas num mesmo local.

Doze variedades de milho cultivadas no campo experimental do Instituto de Genética da ESALQ foram estudadas com a finalidade de se verificar a capacidade das mesmas em veicularem *F. moniliforme* através das suas sementes (QUADRO XII).

Foram comparadas as variedades de milho colhidas no ano de 1975 (QUADRO XIII). Ficou evidenciado que há diferença significativa entre algumas variedades, no tocante à transmissão de *F. moniliforme* por suas sementes. As variedades que apresentaram maior capacidade em transmitir este fungo foram Pipoca Branca, ESALQ HV-1 e Piranão. Estas variedades diferiram significativamente das demais, porém não apresentaram diferença significativa entre si. As demais variedades colhidas em 1975 não mostraram diferença significativa entre si. O teste Tukey foi realizado utilizando-se a raiz quadrada dos dados obtidos, ou seja a raiz quadrada do número de sementes com *F. moniliforme*.

QUADRO XII - Resultados obtidos em relação à transmissão de *F. moniliforme* através de sementes de milho de diferentes variedades.

VARIEDADES	Nº total de sementes	Nº sementes infectadas	% sementes infectadas	% germinação
Pérola Piracicaba				
(1971)	150	14	9	39
Centralmex (1974)	150	36	24	91
Doce de Cuba (1974)	150	108	72	87
Flint Comp. Branco				
(1975)	150	15	10	91
Flint Comp. Amarelo				
(1975)	150	22	15	88
Dente Comp. Branco				
(1975)	150	12	8	91
Dentado Comp. Amarelo				
(1975)	150	10	7	60
Pipoca Branca (1975)	150	112	75	100
Pipoca Amarela (1975)	150	4	3	2
ESALQ HV-1 (1975)	150	100	67	92
Piranão (1975)	150	89	59	99
Flint Comp.br ₂ (1976)	150	95	63	99
Piranão (1977)	150	114	76	98
Centralmex (1977)	150	102	68	99

Obs: Os números entre parênteses representam o ano em que as sementes foram colhidas.

QUADRO XIII - Comparação entre as variedades de milho colhidas em 1975, em relação ao número de sementes infectadas por *F. moniliforme*.

VARIETADES	MÉDIAS OBTIDAS
Pipoca Branca	6,09
ESALQ HV-1	5,76
Piranão	5,40
Flint Composto Amarelo	2,53
Flint Composto Branco	2,22
Dente Composto Branco	1,95
Dentado Composto Amarelo	1,80
Pipoca Amarela	0,66

DMS 5% = 2,00 DMS 1% = 2,49

Duas variedades foram colhidas em 1977, sendo elas a Piranão e a Centralmex. Os lotes testados apresentaram respectivamente 76% e 68% das sementes infectadas por *F. moniliforme*. Analisadas pelo teste do qui-quadrado, não foi constatada diferença significativa entre as mesmas, no tocante a transmissão deste fungo. A variedade Piranão colhida em 1975 e a Centralmex em 1974 apresentaram este fungo em, respectivamente, 59% e 24% das sementes.

É difícil estabelecer-se uma correlação precisa entre as porcentagens de infecção e de germinação (QUADRO XII). No entanto, os resultados mostram que não há praticamente uma correlação inversa entre porcentagem de infecção e de germinação.

EXPERIMENTO IV - Resultados obtidos no estudo da transmissão de *F. moniliforme* através de sementes de milho da variedade Maya, cultivada em diferentes locais do Estado de São Paulo.

Um dos objetivos visados foi avaliar a influência dos diferentes locais sobre a ocorrência de *F. moniliforme* no Estado de São Paulo. Os dados obtidos demonstraram que a ocorrência deste fungo varia de intensidade de acordo com o município, variando também dentro de um mesmo município (QUADRO XIV).

A variação que ocorre dentro de um mesmo município pode ser observada pelos resultados das análises das amostras provenientes de Nova Aliança, Paulo de Faria e Bauru (QUADRO XIV).

No caso de Nova Aliança, três amostras colhidas em diferentes campos de milho foram analisadas e apresentaram porcentagens de infecção de 64%, 62% e 84%. Apesar desta variação entre as porcentagens de infecção, não foi constatada diferença significativa entre as mesmas.

As duas amostras colhidas em dois diferentes campos do município de Bauru, apresentaram 59% e 94% das sementes infectadas por *F. moniliforme*. Neste caso, as amostras diferiram significativamente entre si ao nível de 1%, no que se refere à presença deste fungo nas sementes.

No município de Paulo de Faria, dois diferentes campos de milho foram amostrados, sendo que *F. moniliforme* estava presente em 33% e 92% das sementes analisadas. Também aqui, estas duas amostras apresen

QUADRO XIV - Resultados obtidos no estudo da transmissão de *F. moniliforme* através de sementes de milho da variedade Maya.

LOCAIS		Nº total de sementes	Nº sementes infectadas	% sementes infectadas	% germinação
Adamantina	(1)	150	108	72	99
Bauru	(2)	150	89	59	92
Bauru	(3)	150	141	94	75
Cosmorama	(4)	150	80	53	99
Gastão Vidigal	(5)	150	73	49	98
Ibirã	(6)	150	66	44	92
Lucélia	(7)	150	128	85	99
Mendonça	(8)	150	60	40	95
Monções	(9)	150	112	75	97
Nova Aliança	(10)	150	96	64	100
Nova Aliança	(11)	150	94	63	100
Nova Aliança	(12)	150	127	85	97
Ocauçu	(13)	150	107	71	95
Paulo de Faria	(14)	150	50	33	100
Paulo de Faria	(15)	150	138	92	98
Sagres	(16)	150	105	70	100

Obs: Os algarismos entre parênteses representam o número de cada amostra.

taram diferença significativa ao nível de 1%, quanto à infecção das suas sementes por este fungo.

Os resultados deste experimento mostraram ainda que *F. moniliforme* encontra-se disseminado em toda a área amostrada.

5. DISCUSSÃO

Dentre os quatro métodos geralmente utilizados para análise fitossanitária de sementes, ou seja método do papel mata-borrão, método da placa de ágar, método da semeadura e método do papel toalha, foram escolhidos os dois primeiros. Justifica-se esta escolha por serem estes dois métodos os mais comumente empregados para esta finalidade e por oferecerem maior precisão e rapidez para este tipo de análise.

Segundo TEMPE (1970), o método do papel mata-borrão e da placa de ágar apresentam inúmeras variações quanto à sua execução, e LAN DAETA (1968) atribui esta desuniformidade dos métodos às necessidades e facilidades encontradas nos laboratórios que os empregam.

Utilizando-se os métodos do papel mata-borrão e da placa de ágar, buscou-se padronizar uma metodologia que, no mais curto período de tempo, possibilitasse detectar seguramente a presença de *F. moniliforme* em sementes de milho.

Quanto à esterilização superficial das sementes, utilizou-se uma solução 1% (peso-volume) de hipoclorito de cálcio, sendo que as

sementes permaneceram imersas na mesma durante 10 minutos. Não foi realizado teste preliminar, para se comparar diferentes soluções germicidas e tempos de imersão das sementes nestas soluções. Para o caso da desinfecção de sementes, sugere-se um estudo mais preciso para se verificar quais germicida, concentração da solução e tempo de imersão, são mais e ficientes para esterilizar superficialmente as sementes, de modo a se ter segurança de que todo microorganismo que dela crescer é originário do interior da mesma.

Optou-se pelo pré-tratamento temperatura baixa pela facilidade que o mesmo proporciona para detecção e identificação de *F. moniliforme* presente nas sementes. Quando não se usa a temperatura baixa, as sementes germinam no interior da caixa de Petri e formam um emaranhado que dificulta a contagem de sementes infectadas e a identificação do fungo. Além disto, as sementes mortas pelo frio proporcionam a formação de colônias do fungo infectante ao redor de si, pois este cresce diretamente das sementes para o substrato; no caso das sementes germinadas, estas geralmente se soltam do substrato não permitindo que o fungo atinja o mesmo, dificultando a formação de colônias e conseqüentemente a identificação do fungo. Outro ponto a ser discutido é que a temperatura baixa (-20°C) além de provocar a morte da semente, poderia também inibir o fungo presente no seu interior; no entanto, ficou demonstrado que a baixa temperatura causa a morte das sementes, porém não afeta o fungo alojado, concordando com LIMONARD (1968). Isto pode ser comprovado, pois os pré-tratamentos temperatura baixa e temperatura ambiente não diferiram significativamente entre si quanto ao número de sementes portadoras de *F. moniliforme*.

Com relação aos substratos, aqueles compostos de ágar-água e meio do Booth proporcionaram as maiores contagens de sementes infectadas por *F. moniliforme*, sendo escolhido o substrato de ágar-água por possuir composição mais simples e preparo mais fácil. Em alguns casos, o substrato BDA chegou a se igualar aos substratos de ágar-água e meio de Booth, porém por ser um meio rico e, portanto, bastante sujeito a contaminações, seu uso se torna inconveniente. O substrato constituído por papel de filtro, além de proporcionar as menores contagens de sementes infectadas por *F. moniliforme*, apresenta as desvantagens de ser opaco e dificultar a avaliação das sementes, e ainda ser trabalhoso quanto à sua preparação.

As temperaturas de incubação de 28°C e 30°C possibilitaram obter as maiores contagens de sementes infectadas por *F. moniliforme*. Optou-se por 28°C, pois nos laboratórios onde se realizou este experimento havia maior facilidade em se trabalhar com esta temperatura, além de ser a mais freqüentemente citada pela literatura. A determinação de que 28°C e 30°C são as temperaturas mais favoráveis para incubação das sementes, está de acordo com INTERNATIONAL CONFERENCE ON SEED PATHOLOGY (1960), a qual menciona que a temperatura em torno de 28°C é a mais adequada para testes fitossanitários de sementes de milho; no entanto, esta determinação é contraditória ao trabalho de SINGH et alii (1974) os quais demonstraram que a detecção de *F. moniliforme* pode ser feita utilizando temperaturas de 20°C e 28°C, pois não há diferença quanto aos resultados finais. As temperaturas de 20°C e 25°C se mostraram pouco adequadas para incubação das sementes, quando comparadas com 28°C e 30°C, pois estas temperaturas mais baixas permitiram detectar um menor número de sementes

infectadas pelo fungo.

Os períodos de incubação de 7 e 10 dias proporcionaram as maiores contagens de sementes infectadas por *F. moniliforme*. Uma vez que se adotou a temperatura de 28°C para a incubação das sementes, e que para esta temperatura os períodos de 7 e 10 dias não diferiram significativamente entre si, optou-se pelo período de 7 dias, pois é de interesse obter rapidez na análise das sementes. Estes resultados são praticamente concordantes com aqueles obtidos por SINGH et alii (1974), os quais demonstraram não haver diferença significativa na contagem de sementes com *F. moniliforme*, caso a mesma fosse feita no 7º ou no 11º dias de incubação. Pelos resultados obtidos no presente experimento, ficou demonstrado que o período de incubação de 3 dias não é adequado para a detecção deste fungo em sementes de milho.

Os resultados obtidos demonstraram não haver diferença significativa entre os períodos de incubação de 4, 5 e 7 dias, quanto à contagem de sementes infectadas por *F. moniliforme*. Estes resultados estão de acordo com SINGH et alii (1974), os quais constataram não haver diferença entre os períodos de 4 e 7 dias de incubação, quanto à detecção deste fungo em sementes de milho. No presente experimento, optou-se pelo período de incubação de 5 dias, por ser o menor período para o qual se obteve maior facilidade na contagem de sementes infectadas e na identificação de *F. moniliforme*. Quando as sementes foram incubadas por 4 dias houve dificuldade para detecção e identificação deste fungo, devido ao pouco desenvolvimento do mesmo sobre a semente e sobre o substrato. A incubação das sementes durante 7 dias proporcionou ao fungo *F. moniliforme* um desenvolvimento tal, que o mesmo praticamente recobria as

sementes e formava colônias que freqüentemente coalesciam com colônias de outros fungos, dificultando a sua identificação.

As variedades de milho colhidas em 1975 apresentaram variação quanto à capacidade em transmitir *F. moniliforme* através das sementes. Uma vez que estas variedades estiveram submetidas praticamente às mesmas condições de cultivo, esta variação é possivelmente devida a variações genéticas existentes entre as citadas variedades. Pipoca Branca, ESALQ HV-1 e Piranão foram as que mostraram maior capacidade em veicular o fungo. A variedade Pipoca Amarela foi a que apresentou menor capacidade em transmitir este fungo através das sementes.

Pelos resultados obtidos, ficou demonstrado que a presença de *F. moniliforme* nas sementes não afeta a germinação das mesmas. O ideal seria comparar lotes sadios e lotes infectados da mesma variedade, porem isto não foi possível, pois não se obteve lotes livres do fungo. No entanto, observando-se a porcentagem de infecção e de germinação de cada variedade pode-se notar que a presença do fungo praticamente não interfere na germinação. Isto pode ser observado principalmente nas variedades Pipoca Branca, ESALQ HV-1 e Piranão que sendo aquelas que mais apresentavam sementes infectadas, mostraram os melhores índices de germinação. Estes resultados estão de acordo com MELCHERS & JOHNSTON (1924) e WARMKE & SCHENCK (1971) que, trabalhando com lotes altamente infectados por este fungo, constataram alto índice na germinação das sementes.

MELCHERS (1956) demonstrou que a ocorrência de *F. moniliforme* era mais acentuada em híbridos de sementes amarelas do que em híbridos de sementes brancas. No presente experimento são comparáveis as

sementes brancas e amarelas das variedades Flint e Pipoca. Para a variedade Flint, não se constatou diferença entre as sementes brancas e amarelas quanto à transmissão deste fungo através das mesmas. Para a variedade Pipoca, os resultados foram totalmente divergentes daqueles obtidos por MELCHERS (1956), pois enquanto 75% das sementes brancas apresentaram *F. moniliforme*, somente 3% das amarelas mostraram-se infectadas pelo mesmo fungo.

DUNGAN e KOEHLER (1944) coletaram lotes de sementes de milho e durante vários anos determinaram a porcentagem de infecção dos mesmos, tentando relacionar a porcentagem de ocorrência do fungo com a idade das sementes. Concluíram deste estudo, que a viabilidade dos fungos presentes na semente é perdida mais rapidamente que a viabilidade do embrião. Segundo estes autores, no 8º ano após a colheita das sementes, traços de *F. moniliforme* ainda eram encontrados nas mesmas, contudo no 3º ano havia uma grande queda na porcentagem de infecção, quando comparada com a porcentagem inicial.

No presente experimento, tentou-se relacionar porcentagem de infecção e idade da semente para as variedades Piranão colhida em 1977 e 1975, e Centralmex colhida em 1977 e 1974. Os resultados obtidos mostraram-se concordantes com DUNGAN e KOEHLER (1944), pois ficou demonstrado que o envelhecimento das sementes provoca uma queda na porcentagem de infecção, sendo que este envelhecimento praticamente não afeta a germinação das mesmas. No entanto, as variedades comparadas neste experimento apesar de terem sido cultivadas no mesmo local, e provavelmente submetidas às mesmas condições de ambiente, talvez por terem sido produzidas em anos diferentes, sofreram efeitos ambientais também diferentes. Por

tanto, estes resultados devem ser aceitos com certa reserva, uma vez que o ambiente pode ter influenciado a porcentagem inicial de infecção das variedades colhidas em 1974, 1975 e 1977, e assim tornar não totalmente válidas as comparações feitas entre as mesmas.

Como se pretendia estudar a distribuição de *F.moniliforme* no Estado de São Paulo, procurou-se abranger a maior área possível. De acordo com informações fornecidas por técnicos da CATI, a variedade Maya era aquela cultivada em maior número de municípios, daí a sua escolha.

Escolheu-se variedade em vez de híbrido comercial, pois esta é geneticamente mais estável que o híbrido, e assim as variações existentes entre os diferentes municípios quanto à ocorrência de *F. moniliforme*, podem ser mais seguramente atribuídas ao efeito de ambiente.

Ficou demonstrado que *F. moniliforme* tem distribuição generalizada, dentro da área amostrada, sendo sua intensidade de ocorrência maior ou menor dependendo do local onde a semente é produzida; este mesmo tipo de comprovação foi feita por MELCHERS (1956) trabalhando com híbrido no Egito. A variação na ocorrência deste fungo pode ser atribuída principalmente às condições de umidade e temperatura, pois estas têm influência mais direta sobre o mesmo. No entanto, condições edáficas e práticas culturais também devem ser consideradas.

Não foi possível estabelecer uma relação entre intensidade de ocorrência de *F. moniliforme* e condições de temperatura e umidade dos locais amostrados, pois não se conseguiu obter os dados climáticos referentes aos mesmos. Para alguns havia dados incompletos, enquanto que para outros não havia registro algum.

A variação na ocorrência deste fungo dentro de um mesmo município pode ser atribuída principalmente ao efeito de microclima e práticas culturais.

Não foi constatada uma relação inversa entre as porcentagens de infecção e de germinação das sementes. Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que no presente caso, a presença de *F. moniliforme* nas sementes praticamente não afetou a germinação das mesmas. Os resultados obtidos neste experimento são concordantes com os autores MELCHERS & JOHNSTON (1924) e WARMKE & SCHENCK (1971) os quais demonstraram que este fungo não tem influência sobre a germinação das sementes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente experimento, possibilitam concluir que o emprego de temperatura baixa (-20°C), substrato de ágar-água, temperatura de incubação de 28°C e período de incubação de 5 dias são os tratamentos mais adequados para a detecção de *F. moniliforme* em sementes de milho.

O emprego da temperatura de -20°C provoca a morte da semente, no entanto, não causa inibição significativa no desenvolvimento do fungo presente no interior da mesma.

Há variações entre as diferentes variedades de milho, quanto à capacidade das mesmas em transmitir *F. moniliforme* através das suas sementes.

Este fungo tem distribuição generalizada dentro da área do Estado de São Paulo que foi amostrada, sendo que sua intensidade de ocorrência é maior ou menor, dependendo do município onde as sementes são produzidas. Esta variação na ocorrência do fungo também é observada dentro de um mesmo município.

A presença de *F. moniliforme* nas sementes de milho não altera a germinação das mesmas, não havendo, portanto, uma correlação inversa entre porcentagem de infecção pelo fungo e porcentagem de germinação das sementes.

Sugere-se a seguinte metodologia para detectar a presença de *F. moniliforme* em sementes de milho:

- promover a desinfecção superficial das sementes através da imersão das mesmas em uma solução 1% (peso-volume) de hipoclorito de cálcio, durante 10 minutos.
- pré-germinar as sementes em água destilada esterilizada, por um período de 12 horas.
- acondicioná-las em saco de polietileno e submetê-las a temperatura de -20°C , durante 12 horas.
- sob condições assépticas, plaquear 4 sementes sobre agar-água, contido em placa de Petri de 9 cm de diâmetro.
- incubar as sementes por um período de 5 dias, em incubador regulado para a temperatura de 28°C .
- no final deste período, promover a contagem das sementes infectadas por *F. moniliforme*, identificando-se o mesmo, através da observação direta das placas de Petri colocadas sob microscópio de ocular 10X e objetiva 10X.

7. SUMMARY

There is a great variation in the methodology utilized for phytosanitary analyses of corn seeds. As an attempt to standardize a fast method to detect *Fusarium moniliforme* Sheld in corn seed, two pre-treatments, four substrates, four incubation temperatures and five incubation periods were evaluated. Pre-treatment of low temperature (-20°C), substrate of water-agar, incubation temperature of 28°C and incubation period of 5 days were the best treatments. These results suggest that: surface sterilization of seeds with 1% calcium hypochlorite solution for 10 minutes, pre-germination of seeds in distilled and sterile water for 12 hours, deep-freezing of the seeds at -20°C for 12 hours, plating the seeds on water-agar media and incubation of the seeds at 28°C for 5 days constitute the best method to detect *F. moniliforme* in corn seeds.

Twelve varieties of corn were evaluated in relation to their capacity to transmit *F. moniliforme* through the seeds. The results showed that some varieties have more capacity to transmit this fungus through their seeds than others.

Corn seeds of Maya variety were collected in different production fields in the State of São Paulo - Brazil, to detect the occurrence of *F. moniliforme*. The results showed that this fungus occurs in all places sampled. However, its incidence varied according to the production fields sampled.

The present study showed that *F. moniliforme* does not cause damage to seed germination.

8. LITERATURA CITADA

AGROANALYSIS, 1977. Rio de Janeiro, 1: 1-29.

AYERS, J. E.; P. E. NELSON e R. A. KRAUSE, 1972. Fungi Associated With Corn Stalk Rot in Pennsylvania in 1970 and 1971. Plant Disease Reporter. Beltsville, 56: 836-837.

BOOTH, C., 1971. The Genus Fusarium. London, The Eastern Press. Limited. 237 p.

BOOTHROYD, C. W., 1971. Transmission of *Helminthosporium maydis* Race T by Infected Corn Seed. Phytopathology. Saint Paul, 61: 747-748.

BRODNIK, T., 1975. Influence of Toxic Products of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* on Maize Seed Germination and Embryo Growth. Seed Science and Technology. Copenhagen, 3 691-699.

CROZIER, W. F. e S. W. BRAVERMAN, 1971. *Helminthosporium maydis* in Seeds of Minnesota Grown Field Corn. Phytopathology. Saint Paul, 61: 427-428.

- CUDDY, T. F. e V. R. WALLEN, 1965. Seed-borne Disease of Corn in 1964 and Their Effect on Germination. Canadian Plant Disease Survey. Ottawa, 45: 33-34.
- DJAKAMIHARDJA, G.; G. E. SCOTT e M. C. FUTRELL, 1970. Seedling Reaction of Inbreds and Single Crosses of Maize to *Fusarium moniliforme*. Plant Disease Reporter. Beltsville, 54: 307-310.
- DUNGAN, G. H. e B. KOEHLER, 1944. Age of Seed Corn in Relation to Seed Infection and Yielding Capacity. Journal of the American Society of Agronomy. Washington, 36: 436-443.
- FOLEY, D. C., 1960. The Response of Corn to Inoculation With *Diplodia zeae* and *Gibberella zeae*. Phytopathology. Saint Paul, 50: 146-150.
- FOLEY, D. C., 1962. Sistemic Infection of Corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. Saint Paul, 52: 870-872.
- FUTRELL, M. C. e M. KILGORE, 1969. Poor Stands of Corn and Reduction of Root Growth Caused by *Fusarium moniliforme*. Plant Disease Reporter. Beltsville, 53: 213-215.
- GALLI, F.; H. TOKESHI; P. C. T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI; C. O. N. CARDOSO e C. L. SALGADO, 1968. Manual de Fitopatologia. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. 640 p.
- HOSNI, A. M.; W. E. ASHOUR; A. R. SIRRY e S. M. FATHI, 1967. Fungi carried by Corn Seed and Their Importance in Causing Corn Disease in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter. Beltsville, 51: 53-56.
- HOSNI, A. M.; W. E. ASHOUR; A. R. SIRRY e S. M. FATHI, 1968. Fungi Cau

sing Seedling Blight of Corn in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter. Beltsville, 52: 84-86.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON SEED PATHOLOGY, 1960. Report Beirut, 1960. 27 p. Apud Review of Applied Mycology, 1960. Kew, 39: 650.

KOMMEDAHL, T. e D. S. LANG, 1971. Seedling Wilt of Corn from Kernels Naturally Infected With *Helminthosporium maydis* in Minnesota. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 371-373.

KUCHAREK, T. A e T. KOMMEDAHL, 1966. Kernel Infection and Corn Stalk Rot Caused by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. Saint Paul, 56: 983-984.

KULIK, M. M., 1968. Evaluating the Health Condition of Seeds. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts. Port Collins, 58: 95-97.

KULIK, M. M., 1971a. A Blotter Method for Detecting Seed-borne *Drechslera maydis* the Incitant of Southern Leaf Blight of Corn. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts. Port Collins, 61: 119-122.

KULIK, M. M., 1971b. Laboratory and Greenhouse Studies of Tms Citoplasm Corn Seeds Infected with *Drechslera maydis*, the Incitant of Southern Leaf Blight. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts. Port Collins, 61: 123-127.

LANDAETA, A. R., 1968. Analisis Y Certificacion Fitopatologica de Semillas. Revista de la Facultad de Agronomia. Maracay, 4: 29-66.

- LE CLERG, E., 1953. Seed-borne Plant Pathogens. Plant Disease Reporter. Beltsville, 37: 485-492.
- LIMONARD, T., 1967. A Modified Blotter Test for Seed Health. Netherlands Journal of Plant Pathology. Wageningen, 72: 319-321.
- LIMONARD, T., 1968. Ecological Aspect of Seed Health Testing. Proceedings of the international Seed Testing Association. Copenhagen, 33: 400-434.
- MELCHERS, L. E. e C. O. JOHNSTON, 1923. Corn Root and Ear Rot Disease Investigation in Kansas. Phytopathology, Saint Paul, 13: 52.
- MELCHERS, L. E. e C. O. JOHNSTON, 1924. Second Progress Report on Studies of Corn Seed Germination and the Prevalence of *Fusarium moniliforme* and *Diplodia zeae*. Phytopathology. Saint Paul, 14: 45.
- MELCHERS, L. E., 1956. Fungi Associated With Kansas Hybrid Seed Corn. Plant Disease Reporter. Beltsville, 40: 500-506.
- MEW, I. C. e T. KOMMEDAHL, 1972. Interaction Among Microorganisms Occurring Naturally and Applied to Pericarps of Corn Kernels. Plant Disease Reporter. Beltsville, 56: 861-863.
- MOORE, M. B. e C. R. OLIN, 1952. Mercury Bichloride Solution as a Surface Desinfectant for Cereal Seeds. Phytopathology. Saint Paul, 42: 471.
- MORGAN, O. D., 1971. Sclerotial Formations by *Helminthosporium maydis* on Corn Seed. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 755-756.

- NATH, R.; P. NEERGAARD e S. B. MATHUR, 1970. Identification of *Fusarium* Species on Seed as They Occur in Blotter Test. Proceedings of the International Seed Testing Association. Copenhagen, 35: 121-144.
- NOBLE, M. e M. J. RICHARDSON, 1968. An Annotated List of Seed-borne Diseases. 2^a ed. Surrey, The Gresham Press. 98 p.
- NWIGWE, C. 1974. Occurrence of *Phomopsis* on Maize. Plant Disease Reporter. Beltsville, 58: 416-417.
- OOKA, J. J.; T. KOMMEDAHL e R. E. STUCKER, 1972. Natural Occurrence of *Fusarium moniliforme* in Corn Kernel With Opaque Endosperm. Phytopathology. Saint Paul, 62: 781.
- PRITCHARD, D. W., 1974. Erradication of *Helminthosporium maydis* Inside Popcorn Seed. Phytopathology. Saint Paul, 62: 781.
- SALAMA, A. M. e A. G. MISHRICKY, 1973. Seed Transmission of Maize Wilt Fungi with Special Reference to *Fusarium moniliforme*. Phytopathologische Zeitschrift. Berlin, 77: 356-362.
- SCOTT, G. E. e M. C. FUTRELL, 1970. Response of Maize Seedlings to *Fusarium moniliforme* and a Toxic Material Extracted from This Fungus. Plant Disease Reporter. Beltsville, 54: 483-486.
- SCOTT, D. J., 1971. The Importance to New Zeland of Seed-born Infection of *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 966-968.
- SINGH, R. S.; M. M. JOSHI e H. S. CHAUBE, 1967. Further Evidence of the Seed-borne Nature of Corn Downy Mildews and Their Possible Control

with Chemicals. Plant Disease Reporter. Beltsville, 52: 446-449.

SINGH, D. V.; S. B. MATHUR e P. NEERGAARD, 1974. Seed Health Testing of Maize. Evaluation of Testing Techniques with Special Referense to *Drechslera maydis*. Seed Science and Technology. Copenhagen, 2: 349-

SUMNER, D. R., 1966. Histology of Corn Kernel and Seedlings Infected with *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium sp.* Phytopathology. Saint Paul, 56: 903.

SUMNER, D. R., 1968. Ecology of Corn Stalk Rot in Nebraska. Phytopathology. Saint Paul, 58: 755-760.

TEMPLE, J., 1970. Routine Methods for Determining the Health Condition ' of Seeds in the Seed Testing Station. Proceedings of the International Seed Testing Association. Copenhagen, 35: 3-42.

TUITE, J., 1961. Fungi Isolated from Unstored Corn Seed in Indiana in 1956-1958. Plant Disease Reporter. Beltsville, 45: 212-215.

TUITE, J., 1969. Plant Pathology Methods. Minneapolis, Burgess Publishing Co. 239 p.

TUITE, J., e R. W. CALDWELL, 1971. Infection of Corn Seed with *Helminthosporium maydis* and Other Fungi in 1970. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 387-389.

VALLEAU, W. D., 1920. Seed Corn Infection with *Fusarium moniliforme* and its Relation to the Root and Stalk Rots. Bulletin of Station Agricultural of Kentucky, Kentucky, 226: 1-51.

WARMKE, H. E. e N. C. SCHENCK, 1971. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and *Helminthosporium maydis* on and in Corn Seed as Related to T Cytoplasm. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 486-489.