

## ALTERAÇÕES DOS PADRÕES DE ISOENZIMAS EM SEMENTES DE MILHO INFECTADAS POR FUNGOS<sup>1</sup>

EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA<sup>2</sup>, ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO<sup>3</sup>,  
MARIA DAS GRAÇAS GUIMARÃES CARVALHO VIEIRA<sup>3</sup>, MARIA LAENE MOREIRA DE CARVALHO<sup>3</sup>  
e JOSÉ DA CRUZ MACHADO<sup>4</sup>

**RESUMO** - Este trabalho teve como objetivo estudar a interferência dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. sobre padrões eletroforéticos das sementes de milho. Tais padrões são, normalmente, utilizados na identificação de cultivares e na certificação da pureza genética da espécie em estudo. Sementes da cultivar C-805 foram infectadas artificialmente com os referidos fungos; outra parte delas foi tratada com Benomil e Thiabendazol, e ainda outra parte (controle) não foi tratada. As amostras foram acondicionadas em câmara de crescimento (25°C, 95% de umidade relativa) por um período de 30 dias. Na análise eletroforética foi avaliada também uma amostra de sementes que não permaneceu em câmara de crescimento, visando detectar possíveis interferências das condições do ambiente de crescimento sobre os padrões eletroforéticos. Os resultados obtidos permitiram concluir que a infecção das sementes com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. promove alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato-desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato-transaminase. A infecção das sementes com *Aspergillus flavus* promove alterações tanto na intensidade como no número de bandas dos padrões isoenzimáticos da álcool-desidrogenase e malato-desidrogenase.

Termos para indexação: infecção, eletroforese, fisiologia vegetal, pureza.

### ALTERATION OF THE ISOENZYMES PATTERNS IN CORN SEEDS INFECTED BY FUNGI

**ABSTRACT** - This work aimed at studying the interference of the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp. on the electrophoretic patterns of corn seeds. Normally, these patterns are used in the identification of cultivars and certification of genetic purity of this species. Seeds of the cultivar C-805 were artificially inoculated with the referred fungi; part was treated with Benomyl and Thiabendazole and part was untreated. All seed samples were stored in growing chamber incubator at 25°C and 95% of relative humidity for 30 days. In the electrophoretic analysis, a seed sample was also evaluated which had not been kept in growing chamber incubator, in order to detect possible interferences of the growing chamber environment on the electrophoretic patterns. The results allowed to conclude that the seed infection by the *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp. fungi promotes alterations in the electrophoretic patterns of the malate-dehydrogenase, esterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxalacetate-transaminase isoenzymes. Infection by *Aspergillus flavus* caused considerable alteration in both intensity and number of bands of the isoenzymatic patterns of alcohol-dehydrogenase and malate-dehydrogenase.

Index terms: infection, electrophoresis, plant physiology, purity.

### INTRODUÇÃO

A qualidade das sementes é fator importante em programas de produção agrícola, visto que as características agronômicas das cultivares obtidas pela pesquisa chegam aos agricultores através da semente. Esta pode ser analisada sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos.

A certificação da pureza genética garante aos agricultores cultivares com características originais.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de julho de 2000.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Dep. de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: sementes@ufla.br

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., Dra., Dep. de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: edila@ufla.br, sementes@ufla.br, mlaenemc@ufla.br

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Dep. de Fitopatologia, UFLA. E-mail: machado@ufla.br

O processo de identificação de cultivares garante a proteção legal do trabalho de melhoramento que desenvolve novas cultivares. Tanto a identificação de cultivares como a certificação da pureza genética de sementes de milho são realizadas pelas instituições produtoras de sementes em seus programas de controle de qualidade, principalmente, através de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e planta. Porém, o emprego desses marcadores apresenta algumas limitações, como a influência de fatores ambientais e condições do solo (Cooke, 1984; Williams et al., 1993). Para superar tais limitações, técnicas eletroforéticas têm sido empregadas com sucesso na identificação de cultivares e certificação da pureza genética (Goodman & Stuber, 1980; Cardy & Kannenberg, 1982; Arús, 1983; Smith & Wych, 1986; Stuber et al., 1988; Martinez, 1990).

O método proposto por Stuber et al. (1988) baseia-se nas observações dos perfis eletroforéticos dos coleóptilos de milho, apesar de a utilização da própria semente proporcionar maior rapidez.

Um dos fatores que pode interferir nos resultados dos padrões eletroforéticos é a presença de microrganismos associados às sementes, uma vez que eles podem provocar alterações no metabolismo celular, além de possuírem seu próprio sistema enzimático (Agrios, 1988).

Este trabalho teve como objetivo verificar a possível interferência de fungos normalmente associados às sementes, nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, utilizados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Sanidade e Biotecnologia de Sementes, dos Departamentos de Fitopatologia e Agricultura respectivamente, da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizadas sementes de milho da cultivar C-805, safra 94/95. Para se conhecer o nível de alteração provocado pelos microrganismos nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, uma parte das sementes foi infectada com isolados dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp.; em separado, outra parte foi tratada com a mistura dos fungicidas Benomil e Thiabendazole (T), e finalmente outra parte (controle) não recebeu tratamento (T2). As sementes não foram submetidas a tra-

tamentos de assepsia antes de serem submetidas aos diferentes tratamentos, uma vez que se pretendeu evitar qualquer tipo de alteração que pudesse influenciar nos mecanismos de associação patógeno/hospedeiro. Todas as amostras foram acondicionadas em câmara de crescimento (25°C, 95% de umidade relativa) por um período de 30 dias (Myco et al., 1992). Para analisar o efeito dos diferentes tratamentos, foram tomadas subamostras aos 15 (primeira época) e aos 30 dias (segunda época) de incubação. Para a análise eletroforética, foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara de crescimento, visando detectar os possíveis efeitos das condições da câmara.

A qualidade fisiológica foi determinada pelos testes de germinação e tetrazólio.

Os fungos utilizados na infecção foram isolados de sementes de milho submetidas ao "blotter test", conforme descrição de Machado (1988). Os inóculos foram obtidos segundo o método descrito por Vieira (1996). A concentração de esporos na formulação de pó foi ajustada para  $10 \times 10^6$  esporos/g do produto com auxílio de uma câmara-de-Neubayer. As sementes foram infectadas com o pó contendo os esporos dos fungos considerados, na dosagem de 200 g/100 kg de sementes.

Os fungicidas utilizados no tratamento das sementes foram Benomil e Thiabendazole, nas dosagens de 200 g e 60 g do produto comercial em 100 kg de sementes, respectivamente.

O teste de germinação foi realizado em oito repetições de 25 sementes por amostra a 30°C. A semeadura foi realizada em papel-toalha, na forma de rolo umedecido em água na quantidade equivalente a 2,5 do peso do papel. As avaliações foram feitas aos sete dias da semeadura, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

O teste de tetrazólio foi realizado e avaliado de acordo com as recomendações de Dias & Barros (1995), sendo os resultados expressos em porcentagem.

A sanidade das sementes foi determinada pelo teste de incubação em papel-de-filtro (blotter test) em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, segundo método descrito em Machado (1988), antes da infecção das sementes e aos 15 e 30 dias após a infecção.

Para a análise eletroforética de isoenzimas foram utilizadas amostras de 50 sementes (Arús, 1983). As sementes foram liofilizadas e trituradas a frio, em moinho refrigerado, e conservadas em freezer a -84°C.

Após obtenção da cultura pura dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp., em meio contendo batata, dextrose e ágar (BDA), o micélio foi transferido para meio líquido de glicose e extrato de levedura, de acordo com recomendações de Millis et al. (1994), a

25°C sob agitação no escuro. A curva de crescimento micelial dos isolados cultivados no meio foi determinada de acordo com procedimentos descritos por Alfenas (1991).

Após esta fase de infecção, os micélios foram coletados a vácuo, liofilizados e macerados em N líquido, sendo o pó micelial armazenado em freezer a -84°C.

As isoenzimas foram extraídas de 100 mg de sementes moídas e 0,015 mg de pó micelial, aos quais foram adicionados 200 µL do tampão de extração Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, e em seguida, mantidos por 24 horas em geladeira. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g a 4°C, por 30 minutos. Em seguida, foram aplicados 40 µL do sobrenadante nos géis de poli-acrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 12 mA no gel concentrador, e a 24 mA no gel separador.

Após a eletroforese, os géis foram revelados e corados para os sistemas isoenzimáticos: álcool-desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1), esterase (EST-EC 3.1.1.1), fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2), glutamato-oxalacetato-transaminase (GOT-EC 2.6.1.1), malato-desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37) e peroxidase (PO-EC 1.11.1.7), de acordo com Alfenas (1991).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, em parcela subdividida no tempo, de acordo com Steel & Torrie (1980). Foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors. Na comparação das médias, foi utilizado o teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os zimogramas obtidos (Figs. 1 e 2) revelam que, entre as enzimas avaliadas, a álcool-desidrogenase (ADH), malato-desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), esterase (EST) e glutamato-oxalacetato-transaminase (GOT) apresentaram diminuição da intensidade ou do número de bandas, em virtude da presença de fungos. Contrariamente, no que concerne à fosfatase ácida (ACP), foi observado um aumento na intensidade das bandas. As isoenzimas que apresentaram atividade com os fungos estudados foram: álcool-desidrogenase, apenas na segunda época (30 dias), e esterase, fosfatase ácida, glutamato-oxalacetato-transaminase e peroxidase. Entre estas, as que apresentaram atividade com todos os fungos foram as hidrolases (esterase e fosfatase ácida). A glutamato-oxalacetato-transaminase apresentou

atividade com *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., e a peroxidase apenas para *Penicillium* spp.

Quanto à ADH, nas duas épocas de avaliação foram observadas sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos das sementes infectadas com *Aspergillus flavus*. Na segunda época (30 dias) observou-se diminuição na intensidade e número de bandas, tanto nas sementes tratadas com fungicidas quanto nas não-tratadas (Figs. 1 e 2). A ausência do oxigênio promove o início do metabolismo fermentativo, através da indução da álcool-desidrogenase em que o acetaldeído é reduzido a etanol pela Adenina dinucleotídeo-nicotinamida (NADH). Os produtos finais desse metabolismo fermentativo são tóxicos para as células, e, segundo Taiz & Zeiger (1991), o etanol parece ser o produto do metabolismo fermentativo menos deletérico comparado ao lactato, pois a acumulação deste último promove a acidificação do citossol. No presente trabalho, as modificações ocorridas na atividade dessa enzima parecem ter sido mais em razão da ação dos fungos sobre o metabolismo das sementes. Comparando os tratamentos T1 e T2 em relação às isoenzimas ADH, MDH, EST e GOT observou-se uma redução no aparecimento de bandas com a incubação em câmara de crescimento de sementes que não foram infectadas e nem tratadas com fungicidas, principalmente na segunda época de avaliação (Figs. 1 e 2). Aos 30 dias (segunda época), em que houve maior nível de infecção das sementes por *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. (Fig. 3), pode ser observado, pela Tabela 1, redução na qualidade fisiológica, o que sugere interferência dos referidos fungos no metabolismo das sementes, propiciando maior alteração nos padrões isoenzimáticos (Fig. 2). Tais alterações poderiam causar interpretações errôneas das análises de identificação de cultivares, e certificação da pureza genética. Vale ressaltar que o número de sementes infectadas por *Aspergillus flavus* foi superior à infecção pelos outros dois fungos considerados no presente estudo (Fig. 3), o que parece ter causado efeito negativo mais intenso sobre o metabolismo das sementes, com subsequente alteração no padrão eletroforético das enzimas em questão (Tabela 1) e (Figs. 1 e 2). É freqüente encontrar os níveis de infecção verificados na presente pesquisa, em lotes de sementes de milho comercializadas.

A MDH-EC apresentou diminuição na intensidade e número de bandas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp., nas duas épocas em estudo. As maiores alterações, tanto em intensidade como no número de bandas, foram observadas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, fato que coincide com a alta porcentagem de sementes infectadas (77%)

na primeira época de avaliação (Fig. 3). Vieira (1996) encontrou resultados diferentes em sementes de algodão e infectadas com fungos do gênero *Aspergillus* e envelhecidas. Possivelmente, a presença do microrganismo nas sementes, nos níveis do presente trabalho, levou à diminuição da intensidade e do número de bandas em razão do aumento da atividade respiratória, uma vez que a malato-desidrogenase atua no

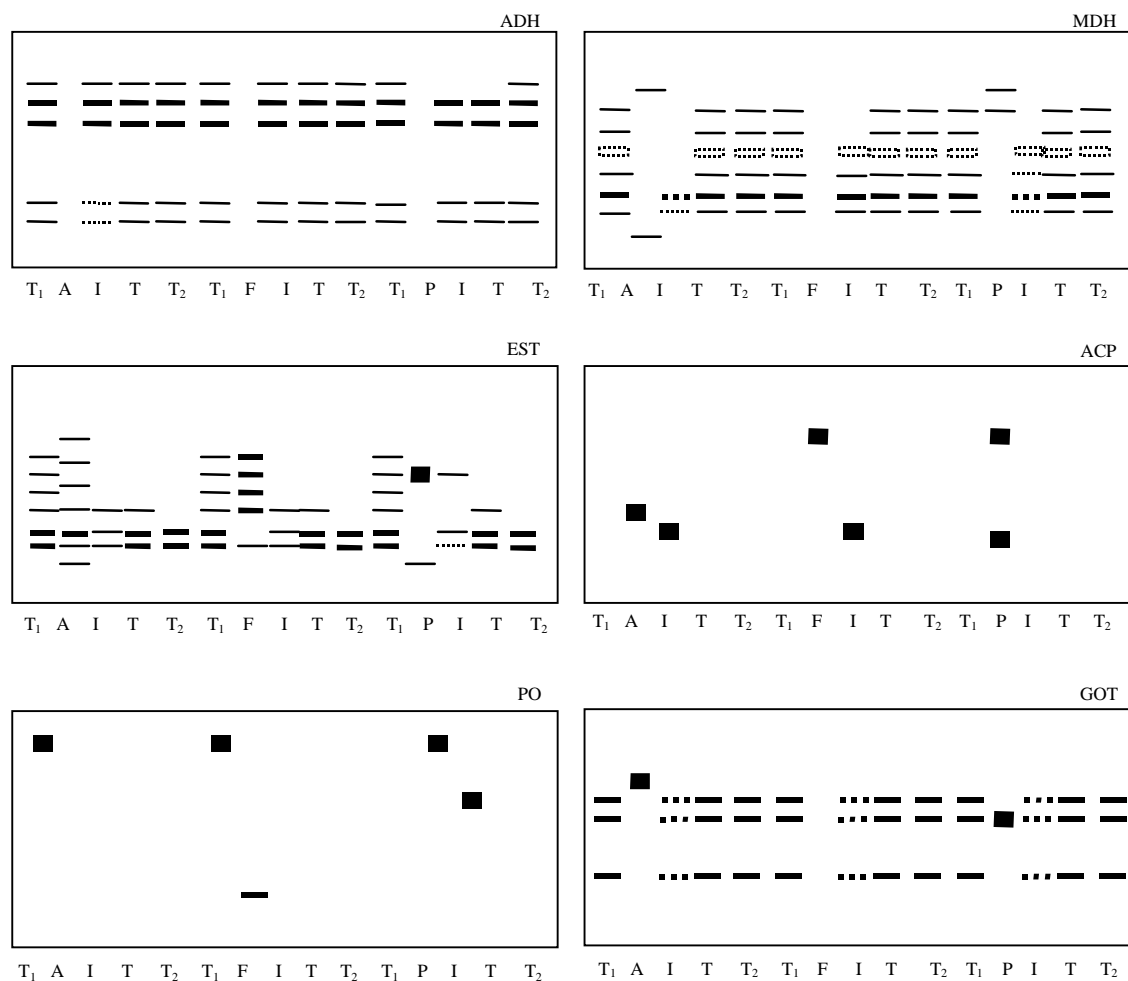


FIG. 1. Zimogramas das isoenzimas álcool-desidrogenase (ADH), malato-desidrogenase (MDH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e glutamato-oxalacetato-transaminase (GOT) de sementes de milho da cultivar C 805 durante a primeira época de avaliação. A, *Aspergillus flavus*; F, *Fusarium moniliforme*; P, *Penicillium* spp.; I, Infectadas: próximo de A com *Aspergillus flavus*, próximo de F com *Fusarium moniliforme* e próximo de P, com *Penicillium* spp., (T) e (T<sub>2</sub>) tratadas e não-tratadas respectivamente com fungicidas Benomil + Thiabendazole; (T<sub>1</sub>) não-incubadas em câmara de crescimento.

ciclo de Krebs, catalisando a reação de malato ao oxalacetato. Tais alterações no perfil eletroforético estão de acordo com as considerações feitas por Cherry (1983).

Observou-se, nos padrões isoenzimáticos de esterase, diminuição no número e intensidade de ban-

das em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., assim como em sementes tratadas com fungicidas, nas duas épocas de avaliação (Figs. 1 e 2). Possivelmente, trata-se de uma enzima bastante sensível, sendo o perfil eletroforético muito alterado, principalmente por interferência de fatores ex-

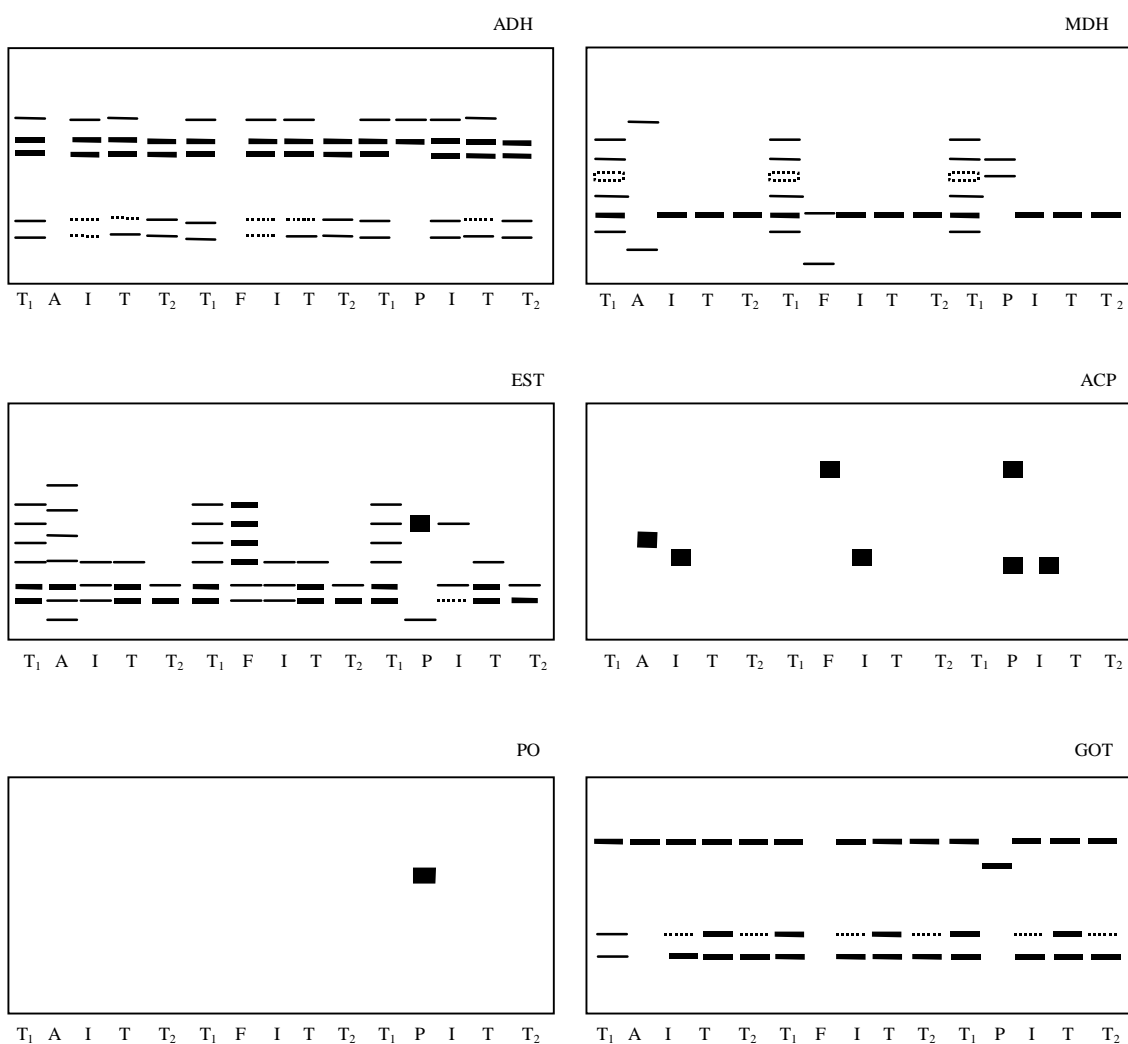
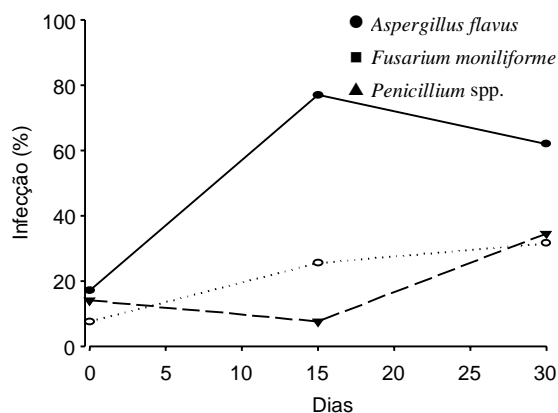


FIG. 2. Zimogramas das isoenzimas álcool-desidrogenase (ADH), malato-desidrogenase (MDH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e glutamato-oxalacetato-transaminase (GOT) de sementes de milho da cultivar C 805 durante a segunda época de avaliação. A, *Aspergillus flavus*; F, *Fusarium moniliforme*; P, *Penicillium* spp.; I, Infectadas: próximo de A com *Aspergillus flavus*, próximo de F com *Fusarium moniliforme* e próximo de P com *Penicillium* spp., (T) e (T<sub>2</sub>) tratadas e não-tratadas respectivamente com fungicidas Benomil + Thiabendazole; (T<sub>1</sub>) não-incubadas em câmara de crescimento.



**FIG. 3.** Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp.*, após a infecção pelos respectivos fungos, aos 15 e 30 dias de exposição das sementes em câmara de crescimento a 25°C e 95% de umidade relativa.

ternos. Resultados semelhantes foram observados por Vieira (1996). O autor relata que o perfil eletroforético de esterase é bastante alterado pela ação de microrganismo, e que a esterase deve ser usada com restrições em análises de identificação de cultivares. Cherry et al. (1974) relataram diminuição da intensidade, intensificação e ocorrência de novas formas moleculares de esterase em sementes de amendoim infectadas com *Aspergillus parasiticus*.

Quanto à ACP, tem-se observado aumento na intensidade de bandas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, nas duas épocas de avaliação e em sementes infectadas com *Penicillium spp.* apenas na segunda época de avaliação. Pela Fig. 3, pode-se observar, na segunda época de avaliação, um aumento na infecção por *Penicillium spp.* e redução na infecção por *Aspergillus flavus*. As condições de umidade relativa e temperatura no interior da câmara de crescimento

**TABELA 1.** Potencial de germinação (teste de tetrazólio), germinação e vigor (teste de tetrazólio) de sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas. UFLA, MG, 1997<sup>1</sup>.

Tratamento	Época 1	Época 2	Média
Potencial de germinação (%)			
Infectada com <i>Aspergillus flavus</i>	38c	41b	40b
Infectada com <i>Fusarium moniliforme</i>	58b	41b	50ab
Infectada com <i>Penicillium spp.</i>	80a	51ab	66a
Tratada	74a	61a	68a
Não-tratada	63bc	48ab	55ab
Média	63	48	
Germinação (%)			
Infectada com <i>Aspergillus flavus</i>	37b	1b	19c
Infectada com <i>Fusarium moniliforme</i>	44b	12ab	28bc
Infectada com <i>Penicillium spp.</i>	64a	7ab	35b
Tratada	63a	27a	45a
Não-tratada	41b	15b	28bc
Média	50	12	
Vigor (%)			
Infectada com <i>Aspergillus flavus</i>	38c	38b	38b
Infectada com <i>Fusarium moniliforme</i>	55b	39b	47ab
Infectada com <i>Penicillium spp.</i>	75a	49ab	62a
Tratada	70ab	60a	65a
Não-tratada	63ab	45a	54ab
Média	60	46	

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.



podem ter favorecido a infecção do fungo *Penicillium* spp., o qual suprimiu o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Vieira (1996), segundo o qual as sementes apresentaram alterações nos seus padrões isoenzimáticos em função da associação fungo/semente. A fosfatase ácida está envolvida na hidrólise de ésteres, e pode atuar sobre fosfolípidios de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lipídios. Diversos autores relatam o aumento da peroxidação de lipídeos com o envelhecimento das sementes. Neste estudo, foi observado que a intensidade de bandas nas sementes infectadas foi maior, sugerindo que a presença dos fungos aqui estudados tem papel importante na peroxidação de lipídios. Agrios (1988) relata que cercosporin, toxina produzida por *Cercospora* spp., atua na peroxidação de lipídios de membrana.

A intensidade de bandas da PO-EC foi reduzida, nas duas épocas de avaliação, em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* em comparação com sementes não acondicionadas em câmara de crescimento (T1). A peroxidase é uma oxirredutase especializada na remoção de peróxidos. Esta diminuição pode estar relacionada com a intensa atividade celular dessa enzima na eliminação dos peróxidos formados.

Os padrões isoenzimáticos (GOT-EC) apresentaram diminuição na intensidade de bandas com a presença de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp., durante a primeira época de avaliação. Na segunda época, tanto em sementes infectadas com os referidos fungos, como em sementes não tratadas foi observado diminuição da intensidade de bandas comparada com as sementes tratadas com fungicida. A banda da GOT-2 apresentou diminuição de intensidade. Brandão Junior (1996) relacionou a ausência dessa banda com o envelhecimento das sementes de milho. Situação contrária foi observada por Vieira (1996), em que a GOT manteve o padrão de bandas inalterado com o aumento do período de envelhecimento artificial em sementes de algodão. Em virtude do envolvimento desta enzima no metabolismo de N, é possível que ocorram sensíveis diferenças na síntese de aminoácidos, contribuindo para a redução na qualidade fisiológica das sementes.

## CONCLUSÕES

1. A infecção das sementes com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. promove alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato-desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato-transaminase.

2. A infecção das sementes com *Aspergillus flavus* promove alterações tanto na intensidade como no número de bandas dos padrões isoenzimáticos da álcool-desidrogenase e malato-desidrogenase.

3. De maneira geral, os padrões eletroforéticos obtidos de sementes infectadas com os fungos estudados apresentam alterações nos padrões de bandas; este fato deve ser considerado antes de realizar testes de identificação de cultivares e de certificação da pureza genética das sementes de milho.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, C.N. **Plant pathology**. 2.ed. New York : Academic, 1988. 703p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e florestais**. Viçosa : UFV, 1991. 242p.
- ARÚS, P. Genetic purity of commercial seeds lots. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isoenzymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam : Elsevier, 1983. pt.A, p.415-423.
- BRANDÃO JUNIOR, D.E. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. Lavras : UFLA, 1996.110p. Dissertação de Mestrado.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília : Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 1992. 365p.
- CARDY, B.J.; KANNENBERG, L.W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. **Crop Science**, Madison, v.22, p.1016-1020, Sept./Oct. 1982.
- CHERRY, J.P. Protein degradation during seed deterioration. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.2, p.317-321, Feb. 1983.
- CHERRY, J.P.; MAYNE, R.Y.; ORY, R.L. Proteins and enzymes from seeds of *Arachis hypogae* L. IX. Electrophoretically detected changes in 15

- peanuts cultivars grown in different areas after inoculation with *Aspergillus parasiticus*. **Physiological Plant Pathology**, London, v.4, p.425-434, 1974.
- COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.5, p.59-72, 1984.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina : IAPAR, 1995. 43p. (IAPAR. Circular Técnica, 88).
- GOODMAN, M.M.; STUBER C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 35., 1980, Washington. **Proceedings**. Washington : American Seed Trade Association, 1980. p.10-31.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras : ESAL, 1988. 107p.
- MARTINEZ, C. Using electrophoresis to test purity during the cleaning process may save money and time. **Seed World**, Des Plaines, v.128, p.8-10, Dec. 1990.
- MILLIS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection of the anthracnose pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. (Ed.). **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification**. Cambridge : CAB International, 1994. p.163-189.
- MYCOCK, D.J.; RIJKENBERG, F.H.J.; BERJAK, P. Infection of maize seedlings by *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.18, p.683-701, 1992.
- SMITH, J.S.C.; WYCH, R.D. The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, p.1-8, July 1986.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics; a biochemical approach**. 2.ed. New York : McGraw-Hill, 1980. 633p.
- STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh : North Caroline State University, 1988. 87p. (Technical Bulletin, 286).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood : Benjamin/Commings, 1991. 565p.
- VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Lavras : UFLA, 1996. 114p. Tese de Doutorado.
- WILLIAMS, J.G.K.; REITER, R.S.; YOUNG, R.M.; SCOLNIK, P.A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n.11, p.2697-2702, Apr. 1993.