

PADRONIZAÇÃO METODOLÓGICA DA INOCULAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA SELEÇÃO DE  
RESISTÊNCIA A *Ustilago scitaminea*

MARIA DE LOURDES REIS DUARTE

Orientador: HASIME TOKESHI


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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
1976

Ao meu esposo Adalberto

Ao meu filho Cláudio Antônio

A nossos pais

  
e aos Professores

H. Tokeshi

F.C. Albuquerque

MINHA HOMENAGEM

## AGRADECIMENTOS

Externamos nossos agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente às seguintes pessoas e entidades:

- Ao Prof. Dr. Hasime Tokeshi, pela orientação, amizade, interesse científico e dedicação ao trabalho.

- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati e Prof. Dr. Paulo Campos Torres de Carvalho, pelas sugestões e revisão do original.

- Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Álvaro Sanguino, pelo estímulo e valiosas sugestões.

- Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Yodiro Masuda, pelas valiosas sugestões e revisão da versão do resumo para o inglês.

- Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Wilson Marcelo da Silva, pelas valiosas informações.

- Ao Dr. Toshihiko Hino, pelas sugestões.

- À Profa. Dra. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar, pelas fotomicrografias.

- Ao Dr. Décio Barbin e a Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Clarice Garcia Borges Demétrio, pela revisão das análises estatísticas.

.iii.

- À Srta. Lígia Solange Chidiak Reis, pelo apoio e amizade, durante a realização do curso.

- À Bibliotecária Maria Elizabeth Ferreira de Carvalho, pela revisão das citações bibliográficas, e às Bibliotecárias e Funcionários das Bibliotecas do Instituto Zimotécnico e Central da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",

- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ, pela cessão de instrumentos e material utilizado.

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pela oportunidade e suporte financeiro durante a realização do curso, sem o qual esta pesquisa não poderia ser realizada.

- À Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), pela aquisição das sementes de cana-de-açúcar.

- À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP.

## ÍNDICE

	Página
1. RESUMO .....	01
2. INTRODUÇÃO .....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	05
3.1. Ciclo vital de <i>Ustilago scitaminea</i> Syd. ....	06
3.1.1. Caracteres morfológicos das hifas .....	06
3.1.2. Modificações morfológicas no hospedeiro .....	08
3.2. Técnicas de inoculação em <i>U.scitaminea</i> e outras <i>Ustilago</i> spp em gramíneas .....	09
3.3. Técnicas de coloração de tecidos vegetal .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1. Preparo do inóculo .....	15
4.2. Meios de cultura .....	16
4.3. Limpeza das sementes .....	16
4.4. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos ..	17
4.4.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esp <u>o</u> ros .....	18
4.5. Limpeza dos esporos .....	19
4.5.1. Limpeza com Sulfato de Cobre .....	19
4.5.2. Limpeza com Metil-tiofanato .....	20

4.6. Influência do substrato na germinação de esporos de <i>U.scitaminea</i> .....	21
4.7. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>U.scitaminea</i> 24 e 48 horas após a semeadura .....	22
4.8. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por <i>U.scitaminea</i> .....	23
4.8. Relação entre a presença de micélio interno de <i>U.scitaminea</i> em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chichotes .....	24
4.10. Transformações usadas nas análises dos experimentos .....	25
5. RESULTADOS .....	26
5.1. Limpeza das sementes .....	26
5.2. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos ..	27
5.2.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esporos.....	27
5.3. Limpeza dos esporos .....	30
5.3.1. Limpeza com Sulfato de Cobre .....	30
5.3.2. Limpeza com Metil-tiofanato .....	30
5.4. Influência do substrato na germinação de esporos de <i>U.scitaminea</i> .....	30
5.5. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-	

-de-açúcar inoculadas com <i>U.scitaminea</i> 24 e 48 horas após a semeadura.....	34
5.6. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por <i>U.scitaminea</i> .....	34
5.7. Relação entre presença de micélio interno de <i>U.scitaminea</i> em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chicotes ..	40
6. DISCUSSÃO .....	43
6.1. Limpeza das sementes .....	43
6.2. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos ..	44
6.2.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esporos .....	45
6.3. Limpeza dos esporos .....	46
6.3.1. Limpeza com Sulfato de Cobre .....	46
6.3.2. Limpeza com Metil-tiofanato .....	47
6.4. Influência do substrato na germinação de esporos de <i>U.scitaminea</i> .....	48
6.5. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>U.scitaminea</i> 24 e 48 horas após a semedura .....	49
6.6. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por <i>U.scitaminea</i> .....	51
6.7. Relação entre a presença de micélio interno de <i>U.scitami-</i>	

nea em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chicones .....	55
7. CONCLUSÕES .....	57
8. SUMMARY .....	59
9. LITERATURA CITADA .....	61
APÊNDICES .....	68



ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela	Página
1. Porcentagem de germinação de sementes de cana-de-açúcar provenientes de polinização livre das variedades PR 980 e CP 5848, com remoção e sem remoção das páles e lema - (casca) .....	26
2. Contaminantes presentes em 5 lotes de esporos de <i>U.scítaminea</i> .....	28
3. Reação de 20 plântulas de cana-de-açúcar de polinização livre da variedade PR 980 inoculadas com fungos <u>con</u> taminantes de esporos de <i>U.scítaminea</i> .....	29
4. Porcentagens de germinação de esporos de <i>U.scítaminea</i> tratados com sulfato de cobre e não tratados, desenvolvidos em diferentes substratos .....	33
5. Plantas de cana-de-açúcar provenientes de polinização livre da variedade PR 980 com micélio interno de <i>U.scítaminea</i> nas folhas primárias e que posteriormente produzem chicotes em casa-de-vegetação .....	41

## ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura	Página
1. Efeito do tempo de imersão em solução de sulfato de cobre e horas de incubação sobre a porcentagem de germinação de esporos de <i>U.scitaminea</i> (média de 3 repetições)..	31
2. Porcentagens de germinação de esporos de <i>U.scitaminea</i> após o tratamento com metil-tiofanato em diferentes concentrações (média de 10 repetições) .....	32
3. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açúcar, provenientes da variedade PR 980 com maior porcentagem de micélio interno de <i>U.scitaminea</i> , inoculadas 24 e 48 horas após a semeadura (média de 6 repetições)	36
4. Micélio de <i>Helminthosporium</i> sp em tecido radicular de plântulas de cana-de-açúcar. As hifas caracterizam - se pela forma, diâmetro e tamanho das células .....	37
5. Micélio de <i>Phoma</i> sp em tecido de folha de plântula de cana-de-açúcar proveniente da variedade PR 980, mostrando hifas com células curtas e grossas .....	37
6. Micélio de <i>U.scitaminea</i> colonizando tecido vascular de plântulas da variedade PR 980, mostrando contorções do micélio .....	38

7. Micélio inter e intracelular de *U.scitamínea* nos tecidos foliares da plântula da variedade PR 980 ..... 38
8. Colonização de plântulas de cana-de-açúcar provenientes das variedades PR 980 e CP 5848, inoculadas em diferentes idades com *U.scitamínea* (média de 8 repetições) .... 39
9. Micélio inter e intracelular de *U.scitamínea* em células do parênquima foliar ..... 42
10. Tecido foliar colonizado por *U.scitamínea*. A seta indica estrutura semelhante a um grampo de conexão ..... 42

## 1. RESUMO

Estudos foram feitos com *Ustilago scitaminea* Syd. para determinar e eliminar os contaminantes dos esporos, determinar a época de coleta das plântulas inoculadas, o efeito da idade das plântulas na penetração e colonização e finalmente, a correlação entre sintomas externos e desenvolvimento do fungo nos tecidos de plântulas de cana-de-açúcar.

Foi observado que os contaminantes de esporos de *U. scitaminea* mais freqüentes e mais patogênicos foram *Helminthosporium* sp, *Fusarium moniliiforme* e *Fusarium* sp.

Com o objetivo de livrar os lotes de esporos de *U. scitaminea* dos contaminantes, esporos produzidos em condições de casa-de-vegetação foram tratados com sulfato de cobre a 0,05% e metil-tiofanato em diferentes concentrações. Os tratamentos com sulfato de cobre e metil-tiofanato reduziram as porcentagens de germinação. Ambos fungicidas tiveram ação fungicida sobre os esporos.

Inoculações com *U. scitaminea*, por aspersão de esporos (6 x

10<sup>6</sup> esporos/ml) em cariópses provenientes de polinização livre da variedade PR 980, revelaram que as coletas de plântulas para verificação do micélio interno do patógeno podem ser feitas a partir do 4º dia após a inoculação, quando esta é realizada 24 ou 48 horas após a sementeira.

Ensaio visando determinar a influência da idade das plântulas provenientes das variedades PR 980 e CP 5848 na penetração e colonização por *U. scitaminea*, mostraram que as plântulas da primeira variedade apresentaram-se mais suscetíveis 6 dias após a sementeira (66,25%), enquanto que as da variedade CP 5848 apresentaram-se mais suscetíveis aos 10 dias (72,63%).

Plantas em cujas folhas primárias foi constatado micélio interno de *U. scitaminea* produziram chicotes em condições de casa-de-vegetação. Os dados apresentados são discutidos.

## 2. INTRODUÇÃO

O patógeno *Ustilago scitaminea* Syd., agente do carvão da cana-de-açúcar apresenta alto grau de especialização, desenvolvendo-se sistemicamente nos tecidos da planta hospedeira (DASTUR, 1920). Os trabalhos de seleção visando a obtenção de variedades resistentes têm sido desenvolvidos em vários países, mas, levam cerca de 6 a 8 anos para obtenção de novas variedades. Baseados nestes fatos, compreende-se a necessidade de obtenção de novos métodos precoces para detecção de resistência em variedades de cana-de-açúcar, controlando-se todos os fatores possíveis, inclusive o momento de penetração do micélio de *U.scitaminea* nos tecidos de cana-de-açúcar.

Trabalhos de inoculação de esporos do fungo em sementes botânicas de cana-de-açúcar, em desenvolvimento por SILVA (1973)\*, no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de

---

(\*) SILVA, W.M., 1973. Comunicação Pessoal.

Queiroz", têm produzido resultados variáveis, ora com elevada eficiência, ora com baixa eficiência. Acredita-se que isto seja em parte devido aos seguintes fatores: a. contaminação das sementes; b. contaminação dos esporos; c. influência da idade da plântula na suscetibilidade ao patógeno; d. período de máxima suscetibilidade da plântula; e. região da plântula que apresenta maior suscetibilidade.

Visando fornecer subsídios ao método de seleção em desenvolvimento na E.S.A.L.Q., o presente trabalho foi conduzido com sementes de cana-de-açúcar e esporos, livres de contaminantes, tendo em vista os fatores citados, com a finalidade de se estudar alguns aspectos dos processos de penetração e colonização dos tecidos de plântulas de cana-de-açúcar por *U.scitaminea*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O carvão da cana-de-açúcar, causado por *Ustilago scitaminea* Syd., é considerado de grande importância econômica em alguns países como Argentina, Brasil, Estados Unidos (principalmente no Havaí), Índia, Natal e Kenia (HIRSCHHORN, 1943, 1950, 1950, 1955; CARVALHO, 1949; BRIEGER, 1965; BOCK, 1964), enquanto que em outros países como Taiwan e Ilha Maurício é considerado de menor importância (HSIO-TSENG, 1971; RACAUD, 1970).

Para recomendação de medidas de controle de um patógeno é necessário conhecer-se o ciclo vital, para determinar o modo de perpetuação e inoculação do patógeno, bem como os fatores do meio ambiente que influenciam a ocorrência da doença. Assim, a presente revisão vai se deter em três principais itens. No primeiro, serão abordados os estudos sobre o ciclo vital de *U.scitaminea*, dando-se ênfase aos caracteres morfológicos das hifas e às modificações morfológicas do hospedeiro devido a ação do fungo. No segundo item serão revisados os trabalhos sobre as técnicas de inoculação em gemas e sementes com *U.scitaminea* e outras *Us-*



*tilago* spp e finalmente no terceiro ítem, algumas técnicas de coloração de tecido vegetal para detecção de micélio interno de *Ustilago* spp.

### 3.1. Ciclo vital de *U.scitaminea*

#### 3.1.1. Caracteres morfológicos das hifas

Os primeiros estudos sobre o ciclo vital de *U. scitaminea* foram feitos por *DASTUR (1920)*, mas, quem estudou com mais detalhes o ciclo vital deste patógeno foi *HIRSCHHORN (1943)*. Neste trabalho, a autora fêz um breve estudo sobre caracteres dos soros e dos esporos, dividindo-os em 6 classes, baseando-se na coloração, dimensões e tipo de parede do epispório dos esporos. Mais tarde, *HIRSCHHORN (1950)*, continuando seus estudos, dividiu a germinação dos esporos do fungo em 3 tipos, baseando-se no número de células do promicélio e formação ou não de esporídias. Estudo semelhante foi feito por *VISWANATAN (1964)*, com 8 coleções de esporos coletadas em diferentes localidades da Índia. Neste estudo, o autor observou que das 8 coleções de esporos, só em uma delas os esporos germinaram sem produzir esporídias.

Após a germinação dos esporos, de acordo com as observações de *HIRSCHHORN (1950)*, formam-se hifas que se originam de 3 modos: a. por fusão entre células adjacentes; b. por fusão entre células alternadas; c. por ramificação das células do promicélio. Estes 3 tipos de formação de hifas mantêm a condição dicariótica do micélio.

Segundo *DASTUR (1920)* e *HIRSCHHORN (1950)*, após a germinaç

ção dos clamidósporos se formam hifas de infecção que penetram nas gemas, mas, podem penetrar também nos tecidos de folhas jovens e nos tricomas. *BOCK (1964)* observou que na superfície das gemas o promicélio origina diretamente duas hifas de infecção originadas das células apicais e basais, que sob condições favoráveis penetram diretamente no hospedeiro. No início as hifas são intracelulares, mas, à proporção que se ramificam tornam-se intra e intercelulares (*DASTUR, 1920*). Estas atravessam a parede da célula por dissolução e são mais delgadas na zona onde atravessam a parede celular, mas, logo após, tornam-se engrossadas, muito ramificadas e contorcidas. A contorção característica do micélio do fungo permite diferenciá-lo de outros micélios de fungos que colonizam os tecidos da cana-de-açúcar. Segundo *HIRSCHHORN (1950)*, cerca de 30 dias após a penetração e colonização, as hifas ocupam o tecido parenquimatoso próximo dos entre-nós, floema, xilema e células anexas. *WALLER (1970)* notou que a produção de hifas intracelulares é muito rápida após a penetração da epiderme das gemas.

*HIRSCHHORN (1950)* concluiu que somente nos nós é que as hifas se encontram no floema e xilema, mas, *BYTHER e STEINER (1973)* isolaram o fungo dos tecidos do parênquima dos entre-nós, bem como das gemas e tecidos que formam o parênquima do chicote. Estes autores também notaram que os tecidos dos entre-nós apresentavam um mais alto grau de invasão do que os tecidos próximos dos nós. Destes tecidos foram isolados dois tipos de colônias com características morfológicas distintas, o que prova que *U.scitamínea* coloniza os tecidos do colmo em toda sua extensão.

*TALBALLA (1969)* foi quem primeiro constatou a doença em plântulas de cana-de-açúcar. Plântulas de cana-de-açúcar quando inoculadas artificialmente apresentam-se invadidas inter e intracelularmente e nos vasos do xilema e floema.

### 3.1.2. Modificações morfológicas no hospedeiro

O sinal característico da doença é o aparecimento de uma estrutura alongada semelhante a um chicote na região apical, que se forma num período aproximado de 90 dias após o patógeno ter-se estabelecido nos tecidos do hospedeiro, embora possa ser formado dentro de 5 a 10 meses em algumas variedades (*HIRSCCHORN, 1950; ZABALA, 1955; RAO e PRAKASAN, 1956*).

Em 1956, *SHARMA (1956)* fez um estudo intenso sobre as alterações morfológicas nas plantas de cana-de-açúcar devido a ação sistêmica de *U.scitaminea*. O autor observou modificações no colmo, folhas, inflorescências, androceu, gineceu, tâlamo e glumas, além de, galhas nas nervuras, e às vezes, plantas com dois chicotes na extremidade apical. *BYTHER e STEINER (1974)*, estudando a doença no Havaí, observaram algumas das modificações assinaladas por *SHARMA (1956)*, como Soros convolutos das gemas laterais, distorção geral e galhas no colmo, calo e múltiplas gemas. Além destas modificações, pequenas manchas de coloração pardo claras têm sido freqüentemente associadas com a presença de micélio interno de *U.scitaminea*, em plantas mantidas sob condições de casa-de-vegetação (*SILVA, 1973*)\*. Este tipo de relação é objeto de estudo no pre-

---

(\* ) *SILVA*, op. cit., p. 3.

sente trabalho.

O efeito mais significativo do patógeno sobre o hospedeiro é a paralização do crescimento da planta quando inicia a formação do chicote. *HIRSCHHORN* (1950) fez algumas considerações sobre os efeitos do patógeno sobre o hospedeiro. Notou que as plantas sofrem redução em vigor e altura e, em muitos casos, o patógeno provoca o desenvolvimento precoce das gemas laterais ou então estimula a floração das plantas em zonas onde habitualmente não o fazem.

Devido às observações de esporos em galhas e nervuras das folhas, *SHARMA* (1956) também considerou a origem do chicote como sendo resultante do desenvolvimento do último entre-nó, concordando com *HIRSCHHORN* (1950), porque notou emergência de chicotes em plantinhas com 3 a 4 folhas. *TALBALLA* (1969) também observou a formação de chicotes em plântulas com 10 semanas após o semeio de sementes contaminadas.

Pelo exposto, nota-se que o patógeno pode causar as mais diversas alterações nos tecidos do hospedeiro, devido à ação sistêmica e que os chicotes são originados pelo alongamento do último entre-nó.

### 3.2. Técnicas de inoculação com *U.scitaminea* e outras *Ustilago* spp em gramíneas

Pesquisadores têm ensaiado várias técnicas de inoculação visando encontrar uma que permita obter maior número de plantas com sintomas da doença nos testes para obtenção de variedades resistentes.

Estudos sobre alguns caracteres de *U.scitaminea* relatam a forma de perpetuação, tipo de infecção e comportamento de algumas variedades em relação ao patógeno sob condições naturais. *HIRSCHHORN* (1949) e *DASTUR* (1920) determinaram que a penetração e colonização dos tecidos da cana-de-açúcar pelo fungo ocorre nas gemas e que o micélio é perene nos tecidos do hospedeiro.

Tendo como base estas informações, *HIRSCHHORN* (1949) testou vários métodos de inoculação de gemas de cana-de-açúcar com o patógeno e concluiu que a melhor técnica de inoculação foi aquela em que submeteu gemas de cana-de-açúcar a imersão, numa suspensão de esporos recém colhidos à uma pressão negativa de 0,6 atmosferas durante 15 a 20 minutos.

Outras técnicas de inoculação usadas em trabalhos visando do testar a resistência de variedades de cana-de-açúcar ao patógeno são: pincelamento de pasta de clamidósporos sobre gemas, com e sem ferimento; injeção de suspensão de clamidósporos com agulha hipodérmica nas gemas e cone vegetativo; imersão de toletes de cana-de-açúcar em suspensão de clamidósporos; e pulverização de suspensão de clamidósporos sobre as gemas (*HIRSCHHORN*, 1949; *WALLER*, 1969, 1970; *DURAIRAJ et alii* 1972; *BYTHER e STEINER*, 1972, 1973). Todos estes métodos foram desenvolvidos para inoculação de gemas contidas em colmos e não se prestam para inoculação em sementes botânicas de cana-de-açúcar.

*TALBALLA* (1969) observou que sementes botânicas de cana-de-açúcar, provenientes de flexas contaminadas com esporos do fungo, deram origem a plântulas que produziram chicotes 10 semanas após a semente

ra, demonstrando que o fungo pode também causar doença em plântulas.

Para outras *Ustilago* spp as técnicas de inoculação mais usadas são: injeção de suspensão de clamidósporos nas flóretas; pincelamento de pasta de clamidósporos; injeção de suspensão de clamidósporos com agulha hipodérmica; e polvilhamento de esporos sobre as sementes (BRANDWEIN, 1940; ROSS *et alii*, 1948; WELLD e PLATT, 1949). Além destas técnicas há a citada por KAVANAGH (1959, 1961), que consiste na inoculação de suspensão de clamidósporos no topo do coleoptile das plântulas, usando vácuo parcial.

As técnicas de inoculação com *U.scitamínea* citadas apresentam vantagens e desvantagens e nenhuma delas foi conveniente para desenvolvimento dos trabalhos de inoculação na presente pesquisa, tendo em vista o material botânico usado. Face a isto, houve necessidade de se desenvolver métodos adequados para a inoculação de sementes botânicas de cana-de-açúcar.

### 3.3. Técnicas de coloração de tecido vegetal

Os pesquisadores sempre se preocuparam em estudar estruturas de fungos patogênicos no interior dos tecidos das plantas hospedeiras. O primeiro trabalho visando observar estruturas de fungos causadores de carvão nos tecidos das plantas foi feito por DOROGIN (1923), que desenvolveu um método para detectar fungos parasitas em amostras de sementes contaminadas. O autor considerou cinco formas diferentes de contaminação: sementes misturadas com esclerócios ou massas de esporos,

aglutinadas; munificação de sementes por estromas de fungos; presença somente de micélio na superfície da semente; e esporos. *YABLOKOWA (1935)*, estudando o efeito do tratamento com calor úmido sobre o micélio de *Ustilago tritici* em grãos de trigo, estabeleceu diferentes tipos de coloração para possibilitar a diferenciação entre células do micélio do fungo e dos tecidos da planta hospedeira. Fazendo um exame em microscópio fluorescente de secções de grãos infetados em luz ultra violeta, observou que o parasita pode ser distinguido no hospedeiro pelo brilho e coloração fluorescente diferente apresentada pelos tecidos do fungo; a fluorescência estava localizada dentro dos grãos de trigo em germinação e os grãos tratados com calor úmido apresentavam-se menos brilhantes do que os não tratados.

Em 1938, *SKVORTZOFF (1938)*, desenvolveu um método para constatar a presença de micélio interno de *U. tritici* em grãos de trigo, baseado na separação dos grãos, maceração, coloração com anilina azul e exame ao microscópio, onde as hifas do patógeno permaneciam azul, enquanto que as células do hospedeiro permaneciam descoradas. *SIMMONDS (1946)* realizou vários trabalhos visando detectar os fungos *Ustilago nuda* e *U. tritici* de cevada e trigo, em embriões inteiros e partidos. No método do embrião inteiro, estes foram desidratados, clareados em óleo de cedro e examinados sem coloração; enquanto que no método do embrião partido, estes foram embebidos em água, seccionados em massa e corados.

Como os testes de campo e casa-de-vegetação requerem tempo e espaço, *MORTON (1960 a)* idealizou um método para constatar micélio viável de *U. nuda* em plântulas de cevada. O processo inclui extração dos

embriões em solução fervente de hidróxido de sódio a 50%, silicato de sódio a 14%, onde foi adicionado um detergente, separação em peneiras, separação por centrifugação em sílicato de sódio a 5%, e clareamento com lactofenol em ebulição. Por este método o micélio do fungo cora-se de vermelho tendendo para marrom podendo ser facilmente observado. Posteriormente, *MORTON (1960 b, 1961)*, obteve um outro método em que plântulas revelavam dentro de duas semanas micélio viável do patógeno, só que neste método as sementes foram tratadas com um fungicida protetor e semeadas em solo com 2,5 cm de profundidade. Quando possuíam duas folhas verdadeiras foram coletadas. A extremidade superior foi cortada, tratada com hidróxido de sódio a 5% durante 20 minutos, clareadas em lactofenol 1:1:1:5 (ácido lático, fenol, glicerina, água), montadas em placas de petri contendo glicerina e coradas com "trypan blue" a 0,005% em lactofenol. O micélio fica facilmente visível com objetiva de baixa aproximação.

*POPP (1958 a, 1958 b)* também procurou observar micélio no interior de embrião. No primeiro método, o autor usando um micrótomo rotativo fez cortes nos embriões, clareamento em solução a 12% de etanol contendo 10% de hidróxido de potássio, lavagem em água, tratamento com ácido isopropílico contendo 10% de ácido lático, lavagem em água, embebição em sabão sobre lâminas de vidro, coloração com ácido acético contendo 0,2% de "trypan blue". No segundo método, o autor ferveu sementes em hidróxido de sódio a 3% e silicato de sódio a 12% com 0,04% de detergente; os embriões extraídos foram fervidos em etanol a 12% contendo hidróxido de sódio a 15%, tratamento com uma mistura 3:1 de etanol e ácido acético glacial para clarificação, ácido lático a 45% aquecido, ácido



acético a 45% contendo 0,1% de "trypan blue", aquecido. Por estes métodos o fungo fica corado de azul escuro e as células dos tecidos do hospedeiro de azul claro.

Observa-se que em todos os métodos revisados os autores apresentam variações, porém, o corante usado é sempre o "trypan blue". Dentre os métodos apresentados, o escolhido para coloração do micélio in terno de *U.scitaminea* nos tecidos das plântulas de cana-de-açúcar foi o de POPP (1958 b), com ligeiras modificações, segundo o material vegetal usado.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Preparo do inóculo

Esporos de *Ustilago scitaminea* Syd. foram produzidos sobre cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) variedade CP 52-1, em condições de casa-de-vegetação.

Os inóculos usados em todos os experimentos foram suspensões de esporos de *U. scitaminea* na concentração de 1 g de esporos por litro o que corresponde a aproximadamente  $6 \times 10^6$  esporos/ml. Esporos coletados em 05.07.1974 e 25.06.1975 com 87,2% e 86,1% de germinação, respectivamente, foram usados nos testes.

Para obtenção e armazenamento dos inóculos que seriam usados nos ensaios, seguiram-se as recomendações de *MATA (1975)*. Os chicotes receberam os seguintes tratamentos: eliminação das folhas, eliminação das porções apical e basal, secagem à sombra e beneficiamento. Os esporos obtidos foram acondicionados em pequenos envelopes de papel semi-permeável, etiquetados, seguindo-se a determinação da viabilidade e ar-

mazenagem em dessecadores contendo sílica gel à 5°C em geladeira.

#### 4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura usados foram agar-água (AA) na concentração de 1,8% e BDA. No teste de influência de substratos sobre a germinação dos esporos usou-se meio GLN com a seguinte composição: Glicina, 3 g; Leucina, 1 g; Agar (Difco), 20 g; Água destilada, 1000 ml; Nicotinamida, 0,1 ml da solução estoque. A solução estoque de nicotinamida constituiu-se de 10 mg do produto dissolvido em 100 ml de álcool etílico a 90% e conservada em geladeira num frasco escuro.

O antibiótico Sulfato de Estreptomicina foi adicionado na concentração de 0,1 g por litro, dos meios de cultura AA, BDA e GLN antes da autoclavagem por ser pouco termolábil.

#### 4.3. Limpeza das sementes

Sementes de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp), provenientes de polinização livre das variedades PR 980 e CP 5848, foram fornecidas pela Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR). Estas sementes foram mantidas em dessecadores com sílica gel à temperatura ambiente até que fossem processados a limpeza e sementeira.

A fim de eliminar os contaminantes da semente botânica de cana-de-açúcar, com o propósito de reduzir ao mínimo sua interferên-

cia na resistência das plântulas, sementes de cana-de-açúcar provenientes das variedades PR 980 e CP 5848, beneficiadas segundo o processo preconizado por *SILVA (1974)*, foram usadas. Posteriormente, as sementes foram atritadas manualmente entre duas telas de nylon de 424 malhas por polegada quadrada, sobre uma folha de papel branco. Por este processo despreendeu-se pálea, lema, pedúnculos e cariópses. Os cariópses foram separados da mistura, eliminando-se as impurezas mais leves e com auxílio de uma pinça de ponta chata selecionaram-se os cariópses aparentemente perfeitos. Sob lupa estereoscópica com aumento de 12 vezes, fêz-se a seleção dos cariópses íntegros.

Antes da sementeira, os cariópses foram tratados com uma solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-BOA) com 5,5% de princípio ativo, na proporção de 3:1, durante 10 minutos. Foi adicionada à solução do produto 2 gotas de Tween 20 a 20% para quebrar a tensão superficial dos cariópses. Após o período de tratamento, os cariópses foram filtrados sob condições assépticas em um conjunto de funil e papel de filtro esterilizados e secos em pratos de cerâmica porosa contendo duas folhas de papel de filtro esterilizadas. Após a secagem, fêz-se a sementeira imediata dos cariópses em meio AA de acordo com *SILVA (1973)\**.

#### 4.4. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos

Foram determinados os contaminantes presentes em 5 lotes de esporos produzidos em casa-de-vegetação e coletados em épocas diferen

---

(\*) *SILVA*, op. cit., p. 3.

tes.

Partindo-se de suspensões de esporos com concentrações de  $6 \times 10^6$  esporos/ml, fizeram-se diluições na base 10 até se obter uma suspensão com  $6 \times 10$  esporos/ml. De cada tubo de cultura contendo a diluição correspondente foram retirados 0,5 ml de suspensão de esporos, semeados sobre meio AA e distribuídos na superfície do meio de cultura com a alça de Drigalsky. As placas semeadas foram incubadas em estufas bacteriológicas por 5 dias à temperatura de  $29^{\circ}\text{C}$ . Após este período, foi feita a identificação das colônias de fungos desenvolvidas nas placas semeadas com os esporos do fungo.

#### 4.4.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esporos

Após a obtenção de cultivos puros dos contaminantes que se encontravam associados aos esporos de *U.scitamínea*, fêz-se a inoculação de cariópses de cana-de-açúcar variedade PR 980, semeados com antecedência de 24 horas. Cerca de 50 cariópses foram inoculados com cada um dos contaminantes isolados. Sete dias após a inoculação, fêz-se a coleta de 20 plântulas inoculadas com os contaminantes isolados, seguida de coloração dos tecidos pelo método de *POPP (1958 b)*, para observação da presença de micélio interno.

O critério de seleção das partidas de esporos a serem usadas nos ensaios constituíu-se no descarte das partidas contaminadas com agentes patogênicos para a cana-de-açúcar.

## 4.5. Limpeza dos esporos

### 4.5.1. Limpeza com Sulfato de Cobre

Cerca de 0,1 g de esporos foram imersos em 100 ml de solução de sulfato de cobre a 0,05% durante 30, 60 e 120 minutos. Duas gotas de solução de Tween 20 a 20% foram adicionadas para quebrar a tensão superficial dos esporos.

Após o período de tratamento, as suspensões de esporos foram filtradas sob condições assépticas, em papel de filtro esterilizado, e os esporos lavados com água destilada estéril para retirar o excesso de sulfato de cobre. Os esporos tratados foram retirados do papel de filtro com 100 ml de água destilada esterilizada, de forma a se obter uma suspensão com  $6 \times 10^6$  esporos/ml. Pipetou-se 0,5 ml de cada suspensão para placas de Petri contendo 20 ml de meio AA ou BDA. As placas de Petri foram incubadas em estufas bacteriológicas à temperatura de 29°C. Após 4, 6 e 8 horas de incubação, os esporos germinados nas placas de Petri contendo meio AA foram mortos pela adição de 5 gotas de azul de lactofenol. Esporos imersos em água destilada estéril, sem sulfato de cobre, serviram como controle da germinação. As placas de Petri contendo meio BDA permaneceram na incubadora por 5 dias e foram usadas para a contagem dos contaminantes que se encontravam associados aos esporos de *U. scitaminea*, antes e após o tratamento.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado e analisado estatisticamente em esquema fatorial 4 x 3, com o objetivo de determinar interação entre os fatores, tempo de imersão e

horas de incubação.

O percentual de germinação foi calculado contando-se o número de esporos germinados e não germinados, presentes em amostras contendo no mínimo 400 esporos ao acaso, em diferentes campos microscópicos.

#### 4.5.2. Limpeza com Metil-tiofanato

O fungicida metil-tiofanato é recomendado por *STEINER e BYTHER (1972)* para o tratamento de colmos de cana-de-açúcar inoculados com *U.scitaminea*, segundo eles sem nenhuma interferência nos trabalhos de inoculação. Visando-se determinar a eficácia do fungicida metil-tiofanato (Cercobin M 75%) em eliminar contaminantes sem afetar a germinação dos esporos de *U.scitaminea*, preparou-se uma solução estoque na concentração de 200 ppm de princípio ativo. Da solução estoque foram preparadas soluções aquosas com as seguintes concentrações de princípio ativo: 0, 20, 30, 40, 50 e 100 ppm.

Cerca de 0,1 g de esporos foram imersos em 100 ml de cada uma das soluções com diferentes concentrações do fungicida durante 15 minutos. Em seguida, os esporos foram filtrados e lavados sob condições assépticas por duas vezes com água destilada estéril para eliminar tanto quanto possível o resíduo do fungicida. Após a lavagem, os esporos foram resuspensores em água destilada estéril. De cada uma das suspensões pipetou-se 0,1 ml, em placas de Petri contendo meio AA. As placas de Petri semeadas foram incubadas a 29°C. A avaliação das porcentagens de germinação usada foi a descrita em 4.5.1..

#### 4.6. Influência do substrato na germinação de esporos de *U.scitamínea*

De acordo com *MATA (1975)*, substratos enriquecidos aumentaram as porcentagens de germinação de esporos pouco vigorosos. Como os tratamentos com fungicidas inibiram o vigor e a taxa de germinação, procurou-se determinar se meios de cultura mais ricos poderiam estimular a germinação de esporos tratados.

Esporos tratados com sulfato de cobre a 0,05% por 60 minutos, como descrito em 4.5.1., foram comparados com aqueles tratados só com água destilada estéril, usando-se os seguintes tratamentos: a. meio GLN e esporos tratados; b. meio GLN e esporos não tratados; c. meio AA e esporos tratados; d. meio AA e esporos não tratados.

As placas de Petri contendo 20 ml de meio foram semeadas e mantidas na mesma incubadora por 6 horas. A seguir, os esporos foram mortos, determinando-se as porcentagens de germinação, seguindo-se a metodologia citada em 4.5.1..

O delineamento experimental usado foi blocos ao acaso com 4 tratamentos e 5 repetições perfazendo o total de 20 parcelas. Cada placa de Petri constituiu uma repetição.

#### 4.7. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *U.scitamínea*, 24 e 48 horas após o semeio

Bandejas esmaltadas contendo 400 ml de meio AA formando uma camada de 1 cm de espessura foram semeadas com 500 cariópses de cana



-de-açúcar provenientes da variedade PR 980 e cobertas com placas de vidro, segundo a metodologia descrita em 4.3.. As bandejas semeadas foram mantidas sob luz constante de 6 lâmpadas fluorescentes luz do dia, de 40 watts, à distância de 70 cm de altura e à temperatura ambiente. A amplitude de variação das temperaturas foi de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , registrada em termô-grafo.

Como não se conhecia o momento em que os cariópses deveriam ser inoculados, fizeram-se as inoculações 24 e 48 horas após a semeadura com uma suspensão de esporos na concentração de  $6 \times 10^6$  esporos/ml. Usaram-se 5 ml da suspensão do inóculo por bandeja. Bandejas semeadas com cariópses não inoculados serviram de testemunha. Depois de 3 dias a contar da semeadura, fêz-se a seleção das plântulas inoculadas e das testemunhas, uniformemente desenvolvidas, transferindo-se 20 plântulas por placa de Petri contendo 30 ml de meio AA.

Das plântulas inoculadas 24 horas após a semeadura, colheram-se 6 placas de Petri e 2 placas testemunhas, no 3º, 5º, 7º e 9º dia a contar da data da semeadura. Cada placa de Petri constituiu uma repetição. Nas placas de Petri contendo plântulas inoculadas 48 horas após a semeadura e nas placas de Petri testemunhas, a primeira amostragem foi retirada no 4º dia a contar da semeadura, seguindo-se as demais de 2 em 2 dias até o 10º dia. Depois da coleta, as plântulas foram transferidas para frascos de 10 ml, procedendo-se à coloração dos tecidos como em 4.4.1.. Concluído o processo de coloração, as plântulas foram examinadas microscopicamente para determinação da presença ou ausência de micélio interno de *U.scitaminea* na raiz, mesocótilo e folhas. A presença de mi-

célio interno em uma das 3 partes da plântula foi considerada como leitura positiva.

O delineamento usado nos dois ensaios foi de parcelas inteiramente casualizadas com 4 tratamentos e 6 repetições.

#### 4.8. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por *U.scitaminea*

Visando-se determinar se plântulas de cana-de-açúcar reagem de modo diferente à penetração e colonização por *U.scitaminea*, de acordo com a idade, sementes botânicas de cana-de-açúcar, provenientes das variedades PR 980 e CP 5848, foram usadas. Foram instalados 2 ensaios com a variedade PR 980 e 1 ensaio com a variedade CP 5848. Após o beneficiamento das sementes obtiveram-se os cariópses livres das pálea, lema e pedúnculos, seguindo-se o método descrito em 4.3.. Em placas de Petri contendo 30 ml de meio AA foram semeados 50 cariópses que foram colocados a germinar sobre papel preto, onde permaneceram nas mesmas condições estabelecidas no ítem 4.7.. As parcelas foram semeadas no mesmo dia e as inoculações feitas em dias diferentes.

Os tratamentos usados foram inoculações aos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a semeadura. A técnica de inoculação usada foi a de aspersão de 0,5 ml de uma suspensão de esporos do patógeno na concentração de  $6 \times 10^6$  esporos/ml, por placa de Petri. Para cada tratamento, 2 placas de Petri semeadas e não inoculadas serviram de testemunha.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com

6 tratamentos e 8 repetições. Cada duas placas de Petri constituíu uma parcela. Das parcelas de cada tratamento selecionaram-se 20 plântulas, coletadas separadamente aos 10 dias após a inoculação usando-se pinça cirúrgica de ponta chata para retirar as plântulas do substrato, procurando-se evitar danos mecânicos. Tendo-se acondicionado as plântulas em frascos de 10 ml, procedeu-se à coloração dos tecidos e avaliação seguindo-se a metodologia citada em 4.7.. As plântulas foram selecionadas ao acaso para o cálculo das porcentagens. A idade das plântulas foi calculada considerando-se desde o momento em que os cariópses foram semeados nas placas de Petri.

#### 4.9. Relação entre presença de micélio interno de *U.scitaminea* em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chicotes

Sementes de cana-de-açúcar variedade PR 980 foram beneficiadas como no ítem 4.3.. Com os cariópses livre de contaminantes externos, fêz-se a semeadura em placas de Petri contendo 30 ml de meio AA. Após a semeadura, as placas de Petri semeadas foram colocadas em condições ótimas para a germinação, descritas em 4.7.. Seis dias após a semeadura, as plântulas foram inoculadas por aspersão de 0,5 ml de uma suspensão de esporos do fungo ( $6 \times 10^6$  esporos/ml) por placa.

Quando as plântulas atingiram 3 cm de altura (aos 20 dias de idade), foram repicadas com pinça para solo esterilizado e enriquecido com matéria orgânica, contido em sacos de polietileno e mantidas em condições de casa-de-vegetação. Cada saco de polietileno conteve 3 plântulas. Cinquenta e sete dias após a repicagem, as plantas sobreviventes

foram individualizadas, cada uma em um saco de polietileno e separadas em 2 grupos de 14 plantas com manchas nas folhas e 14 plantas sem manchas nas folhas. As plantas testemunhas formaram o terceiro grupo de 14 plantas que diferiu dos outros dois grupos por não ter recebido o inóculo. Realizado o transplântio, a primeira folha verdadeira de cada planta foi destacada, dividida em pequenas porções e submetidas ao processo de coloração citado no ítem 4.4.1..

A avaliação foi expressa em presença e ausência de micélio interno nos tecidos foliares examinados ao microscópio. Com as folhas destacadas das plantas onde foi constatado a presença de micélio interno do patógeno, fêz-se a correlação com o aparecimento posterior de chicotes nas plantas originais, mantidas em casa-de-vegetação para comparação final.

#### 4.10. Transformações usadas nas análises dos experimentos

Em vista dos dados serem expressos em porcentagens, em todas as análises os dados foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{\text{porcentagens}}$  e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Limpeza das sementes

Na Tabela 1. são apresentadas as porcentagens de germinação de sementes de cana-de-açúcar provenientes de polinização livre das variedades PR 980 e CP 5848, semeadas com pálea e lema íntegras e destituídas de pálea e lema, sobre meio AA em placas de Petri.

**Tabela 1.** Porcentagens de germinação de sementes de cana-de-açúcar provenientes de polinização livre das variedades PR 980 e CP 5848, com remoção das pálea e lema (casca).

Tratamentos	Variedades	
	PR 980	CP 5848
Com casca	55,50	45,00
Sem casca	73,34	71,67
Diferença (%)	17,84	26,67

## 5.2. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos

Os fungos contaminantes presentes nas partidas de esporos coletados em diferentes épocas, ensaiadas como o descrito no ítem 4.4., são apresentados na Tabela 2.

### 5.2.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esporos

A reação das plântulas de cana-de-açúcar variedade PR 980 inoculadas com os contaminantes das partidas de esporos, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Contaminantes presente em 5 lotes de esporos de *U. scitaminea* .

Diluições	Partidas de esporos				
	1	2	3	4	5
$6 \times 10^6$	Bactéria indet.	<i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>Helminthosporium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	-
$6 \times 10^5$	<i>Cladospodium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	-
$6 \times 10^4$	-	<i>Fusarium</i> sp	<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	-
$6 \times 10^3$	-	-	-	-	-
$6 \times 10^2$	-	-	<i>Helminthosporium</i> sp <i>Aspergillus</i> sp	-	-
$6 \times 10$	-	-	-	-	-

Tabela 3. Reação de 20 plântulas de cana-de-açúcar de polinização livre da variedade PR 980 inoculadas com fungos contaminantes de esporos de *U.scitaminea*.

Contaminantes Inoculados	Plântulas		Plântulas colonizadas(%)
	Sadias	Doentes	
<i>Aspergillus</i> sp	20	0	0
<i>Cladosporium</i> sp	18	2	10
<i>Fusarium moniliforme</i>	2	18	90
<i>Fusarium</i> sp	4	16	80
<i>Helminthosporium</i> sp	11	9	45
<i>Penicillium</i> sp	20	0	0
Testemunha	20	0	0



### 5.3. Limpeza dos esporos

#### 5.3.1. Limpeza com Sulfato de Cobre

As Figura 1 e Apêndice 1 apresentam as porcentagens de germinação dos esporos de *U.scitamínea* em diferentes tempos de imersão em solução de sulfato de cobre e horas de incubação, calculadas como descrito em 4.5.1.

#### 5.3.2. Limpeza com Metil-tiofanato

Na Figura 2 e Apêndice 2 são apresentados os resultados obtidos com diferentes concentrações de metil-tiofanato na germinação de esporos de *U.scitamínea*.

### 5.4. Influência do substrato na germinação dos esporos de *U.scitamínea*

Os resultados referentes às porcentagens de germinação dos esporos tratados com sulfato de cobre e não tratados encontram-se na Tabela 4.

A análise de variância dos dados transformados revelou F significativo entre os tratamentos. O coeficiente de variação foi 7,0%.

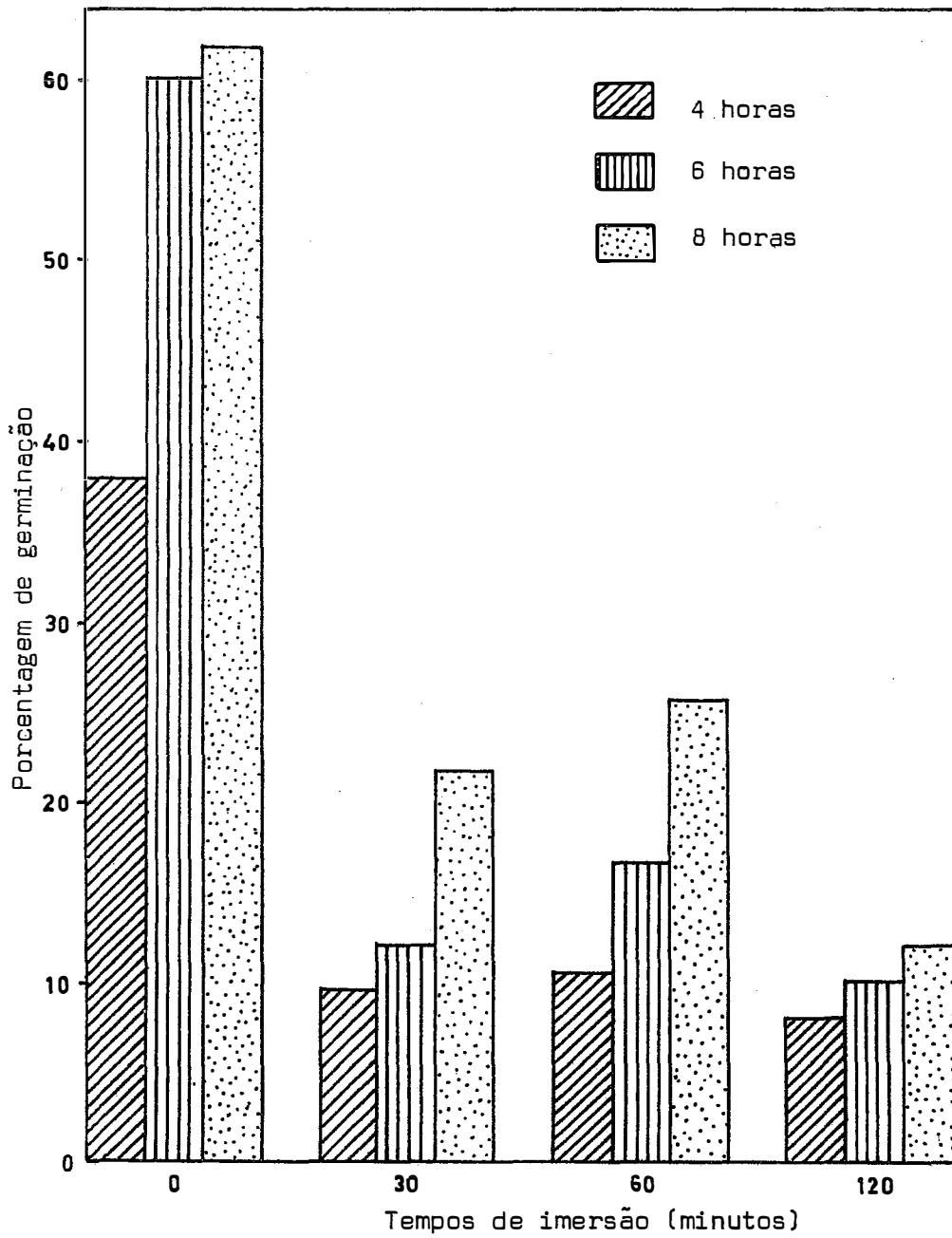


Figura 1. Efeito do tempo de imersão em solução de sulfato de cobre e horas de incubação sobre a porcentagem de germinação de esporos de *U.scitaminea* (média de 3 repetições).

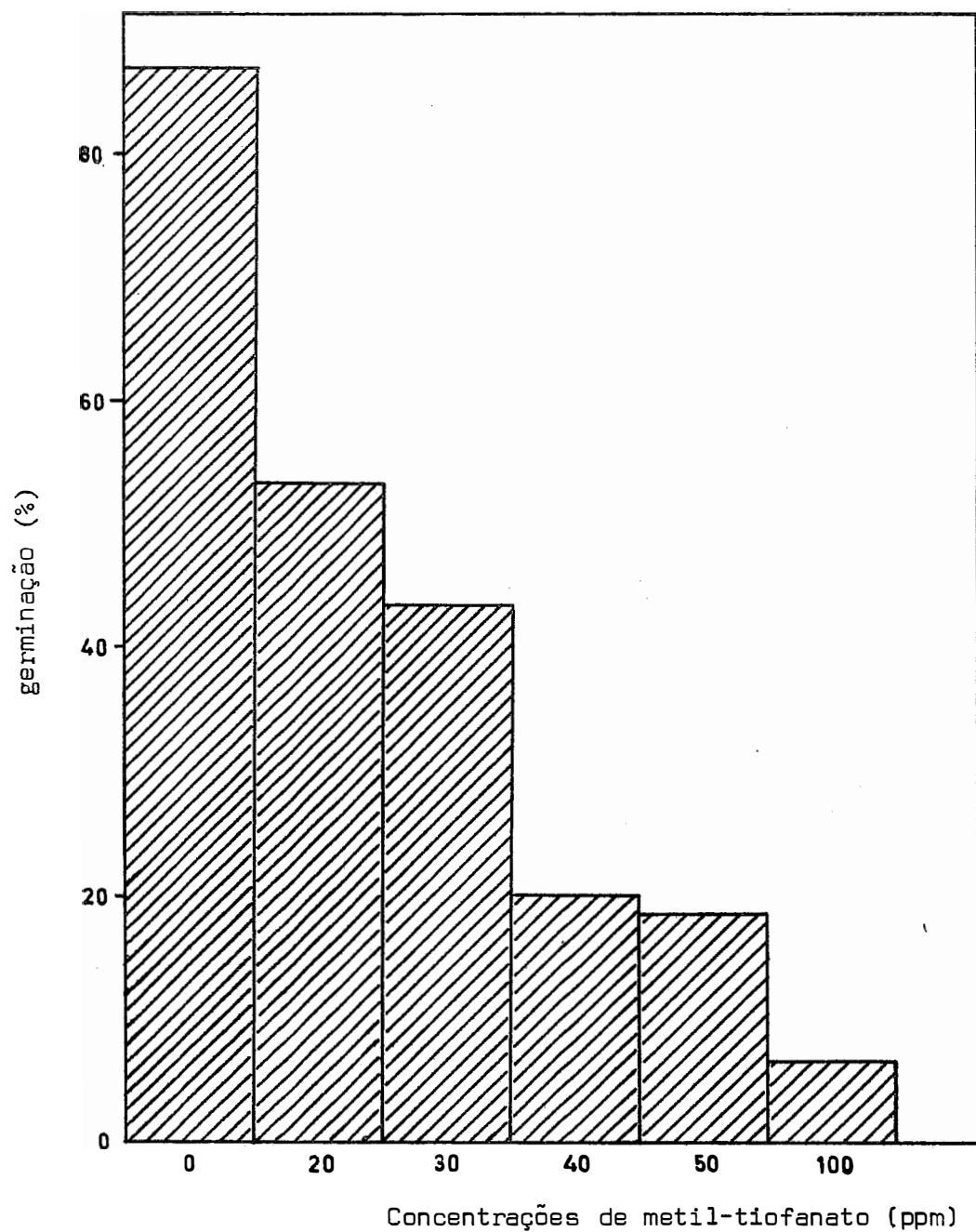


Figura 2. Porcentagens de germinação de esporos de *U.scitaminea* após o tratamento com metil-tiofanato em diferentes concentrações (média de 10 repetições).

**Tabela 4.** Porcentagens de germinação de esporos de *U. sicutiminea* tratados com sulfato de cobre e não tratados germinados em diferentes substratos.

Substratos de Germinação	Tratamento com Sulfato de cobre a	0,05%	Repetições					Médias
			1	2	3	4	5	
GLN	Sim		23,43	24,00	27,00	19,61	20,00	22,81 a
	Não		66,00	75,11	77,04	76,89	76,54	74,45 b
AA	Sim		20,19	21,21	16,67	28,74	20,14	21,39 a
	Não		64,27	57,89	60,62	57,38	67,28	61,49 b

GLN = glicina, leucina, nicotinamida

AA = ágar, água

Os dados representam porcentagem estimada em 400 esporos

CV = 7,0%

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos

### 5.5. Determinação da época de coleta de amostras de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas 24 e 48 horas após a semeadura, com *U.scitaminea*

Os resultados referentes às porcentagens de plântulas provenientes da variedade PR 980 com micélio interno de *U.scitaminea*, inoculadas 24 e 48 horas após a semeadura e coletadas em épocas diferentes, encontram-se nos Apêndices 3 e 4. Com os dados obtidos construiu-se a Figura 3. Aspectos dos micélios de *Helminthosporium* sp, *Phoma* sp e *U.scitaminea* no interior dos tecidos das plântulas são apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

A análise de variância dos dados transformados nos dois experimentos revelou F significativo e altamente significativo, respectivamente. Os coeficientes de variação foram 24,4% e 31,3%, respectivamente.

### 5.6. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por *U.scitaminea*

Os resultados dos 2 ensaios realizados com sementes de polinização livre da variedade PR 980 e os do ensaio com as sementes provenientes da variedade CP 5848, visando-se determinar a influência de idade das plântulas na penetração e colonização por *U.scitaminea*, são apresentados na Figura 8 e Apêndices 5, 6 e 7.

Houve diferenças significativas entre os tratamentos, nos dois experimentos com a variedade PR 980. No experimento com a variedade

de CP 5848, a análise de variância dos valores transformados apresentou F altamente significativo entre os tratamentos. Os coeficientes de variação dos três experimentos foram 21%, 24,7% e 25,3%, respectivamente.

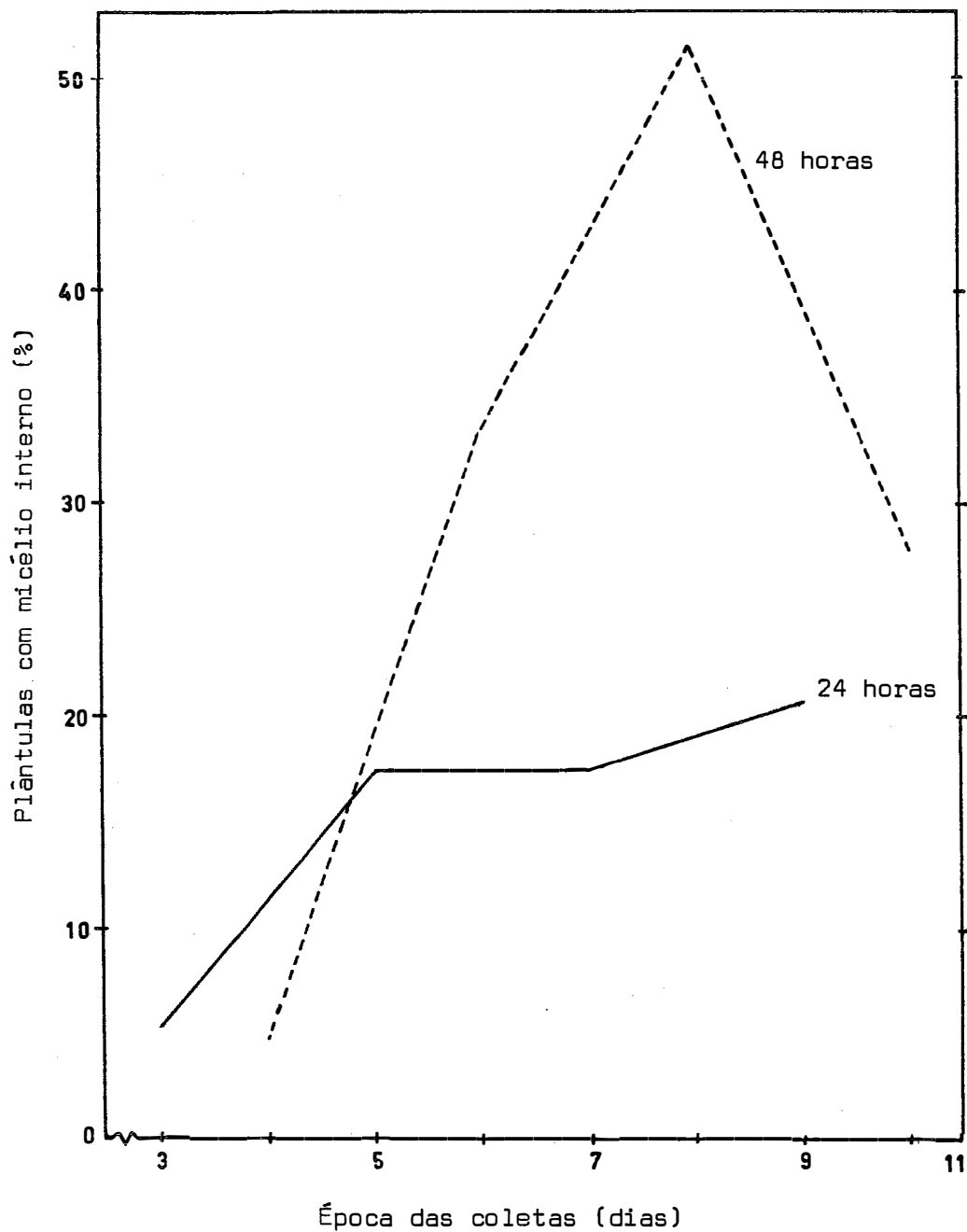


Figura 3. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açú car, provenientes da variedade PR 980 com maior porcentagem de micélio interno de *U.scitaminea* inoculadas 24 e 48 horas após a semeadura (média de 6 repetições).

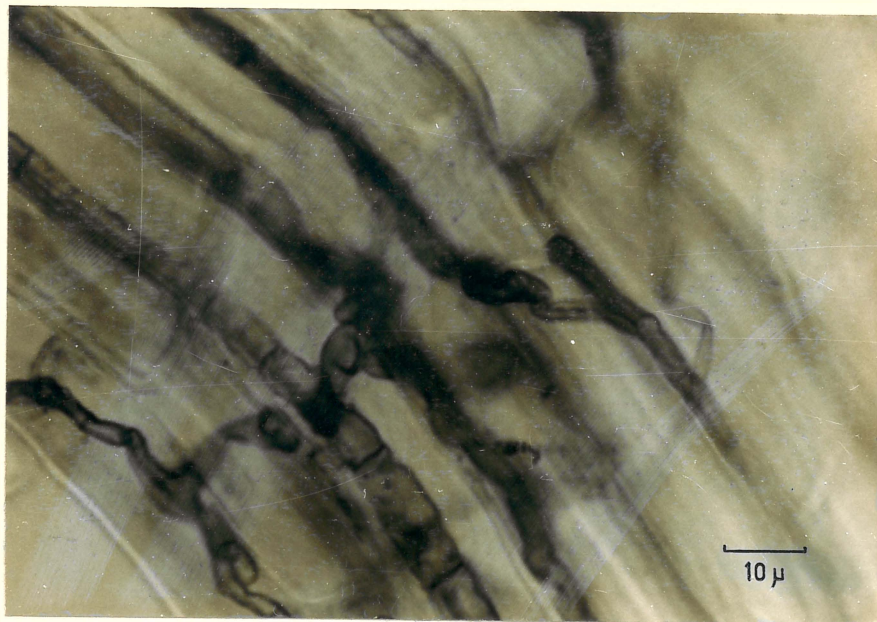


Figura 4. Micélio de *Helminthosporium* sp em tecido radicular de plântula de cana-de-açúcar. As hifas caracterizam-se pela forma, diâmetro e tamanho das células.

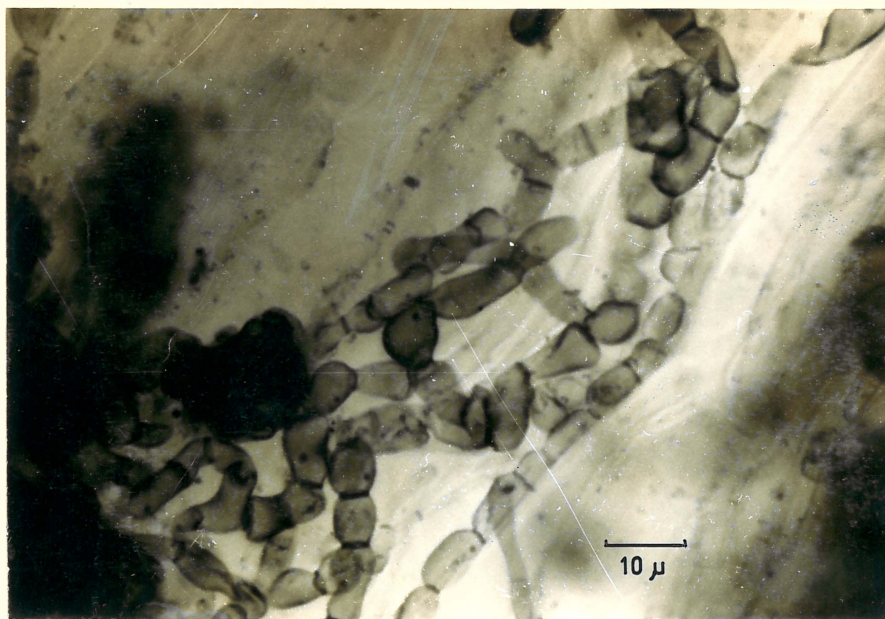


Figura 5. Micélio de *Phoma* sp em tecido de folha de plântula de cana-de-açúcar proveniente da variedade PR 980, mostrando hifas com células grossas e curtas.



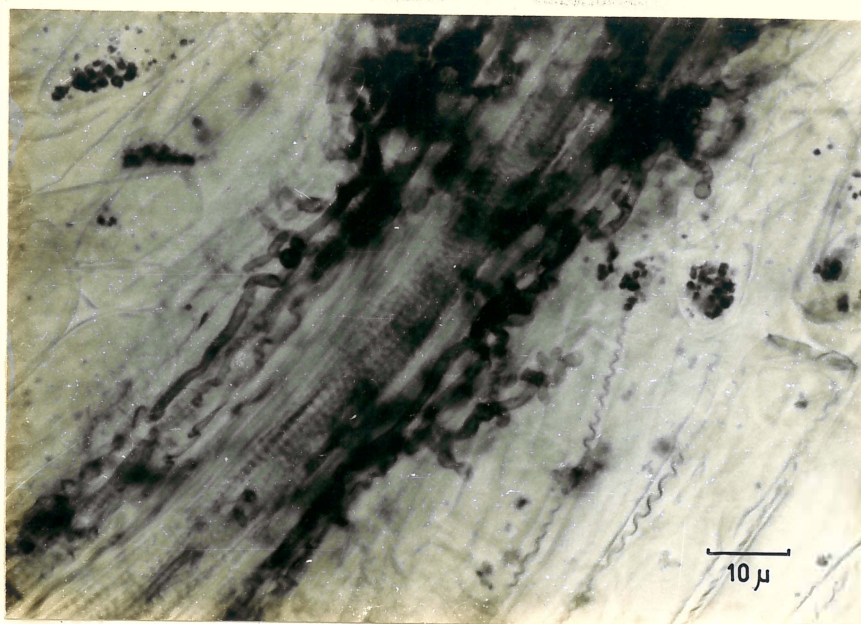


Figura 6. Micélio de *U.scitaminea* colonizando tecido vascular de plântulas de cana-de-açúcar da variedade PR 990, mostrando contorções do micélio.

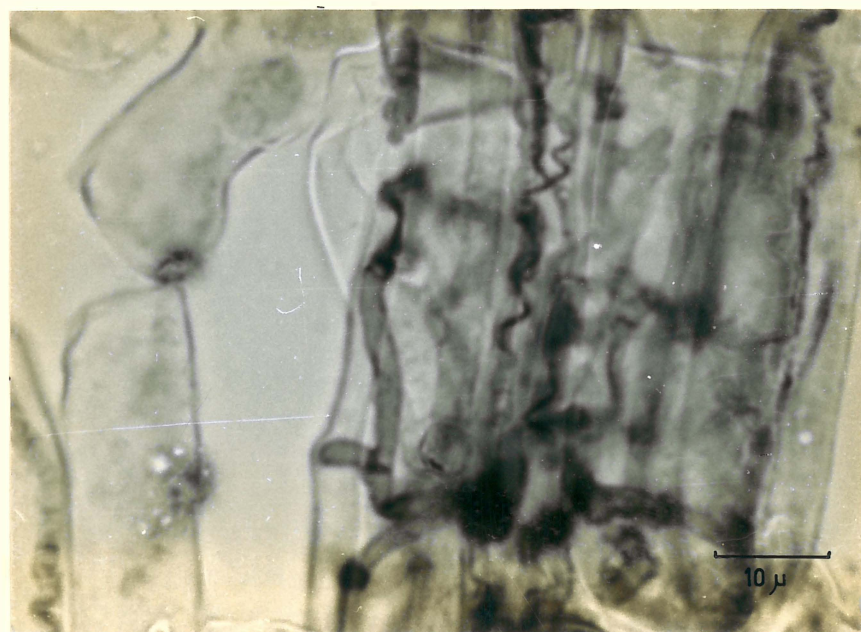


Figura 7. Micélio inter e intracelular de *U.scitaminea* nos tecidos foliares de plântula da variedade PR 980.

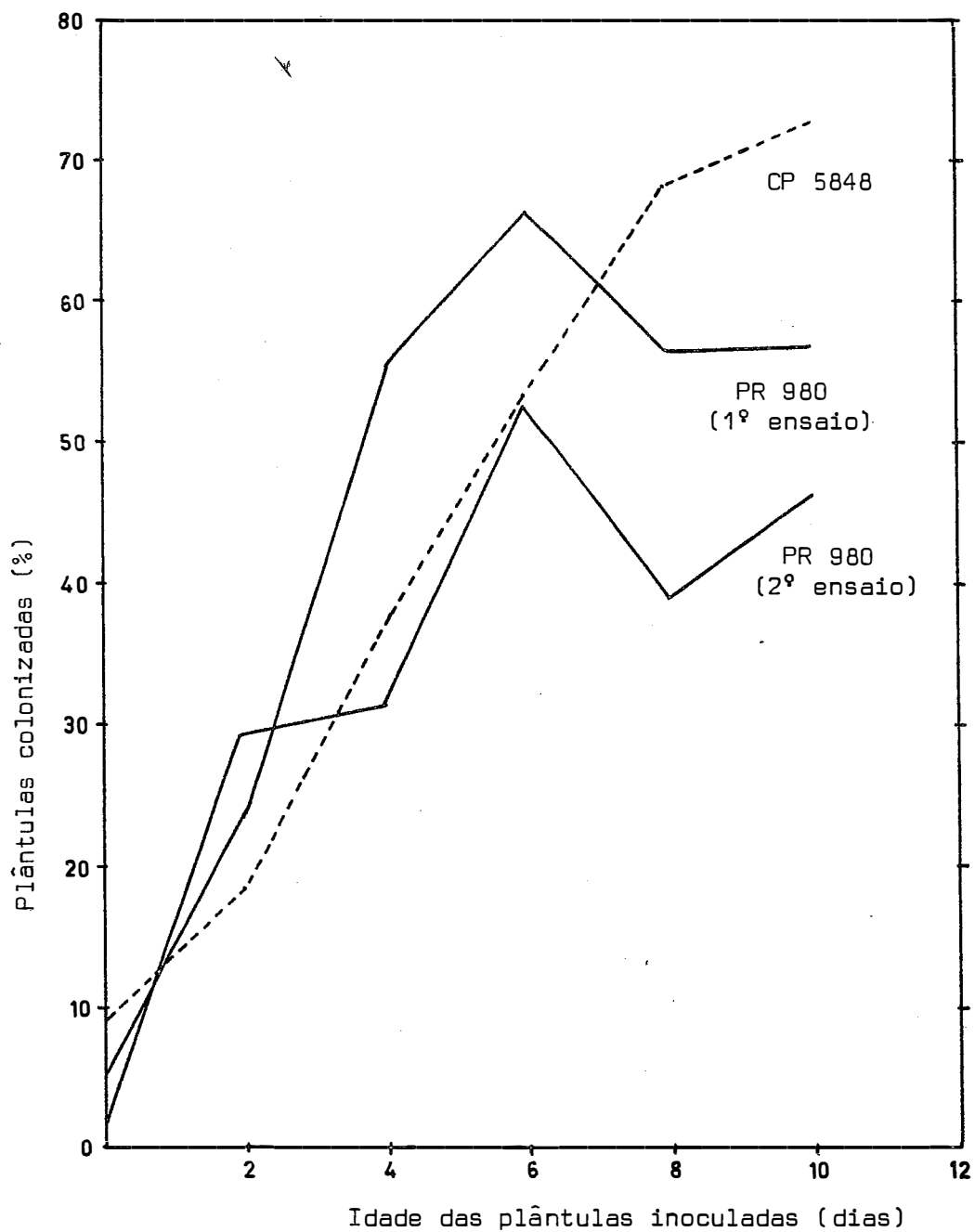


Figura 8. Colonização de plântulas de cana-de-açúcar provenientes das variedades PR 980 e CP 5848 inoculadas em diferentes idades, com *U.scitaminea* (média de 8 repetições).

### 5.7. Relação entre presença de micélio interno de *U.scitamínea* em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chicotes

Os resultados referentes à determinação microscópica de micélio interno de *U.scitamínea* em tecidos de folhas primárias de plantas de cana-de-açúcar e posterior aparecimento de chicotes, encontram-se na Tabela 5. Detalhes sobre a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno são mostrados nas Figuras 9 e 10.

As leituras foram feitas ao microscópio com aumento de 40 vezes. Das plantas examinadas apenas em duas delas não foi constatado micélio interno nas folhas primárias examinadas, mas, produziram chicotes tardiamente.

Tabela 5. Plantas de cana-de-açúcar provenientes de polinização livre da variedade PR 980, com micélio interno de *U.scitaminea* nas folhas primárias e que posteriormente produziram chicotes em casa-de-vegetação.

Número das Plantas	Testemunha		Inoculadas			
	sem		Sem manchas		Com manchas	
	Inocular		nas		nas	
	Micélio	Chicote	folhas		folhas	
		Micélio	Chicote	Micélio	Chicote	
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	-	+	+
13	-	-	+	+	+	+
14	-	-	+	+	-	-

- Ausência de micélio interno nas folhas;

+ Presença de micélio interno nas folhas ou produção de chicotes.

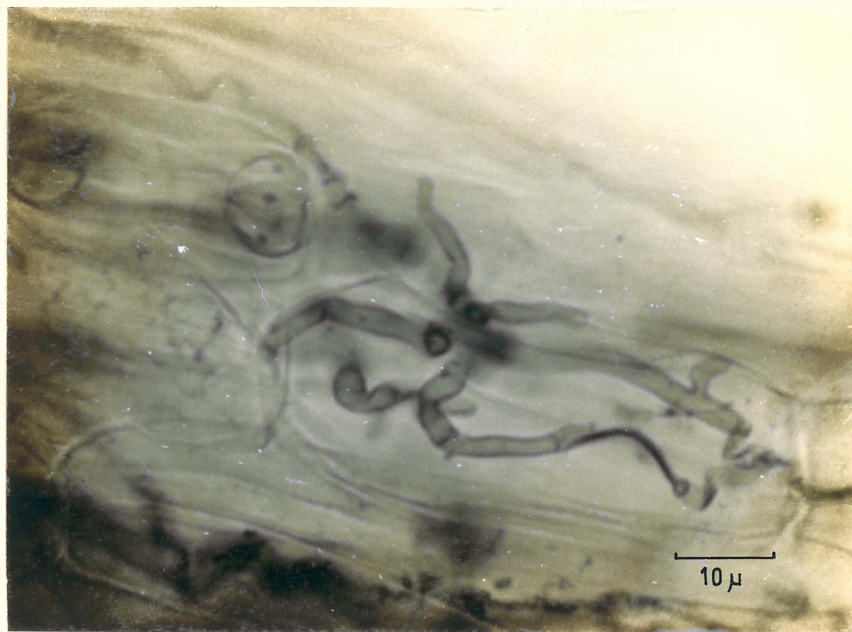


Figura 9. Micélio inter e intracelular de *U.scitaminea* em células do pa-  
rênquima foliar

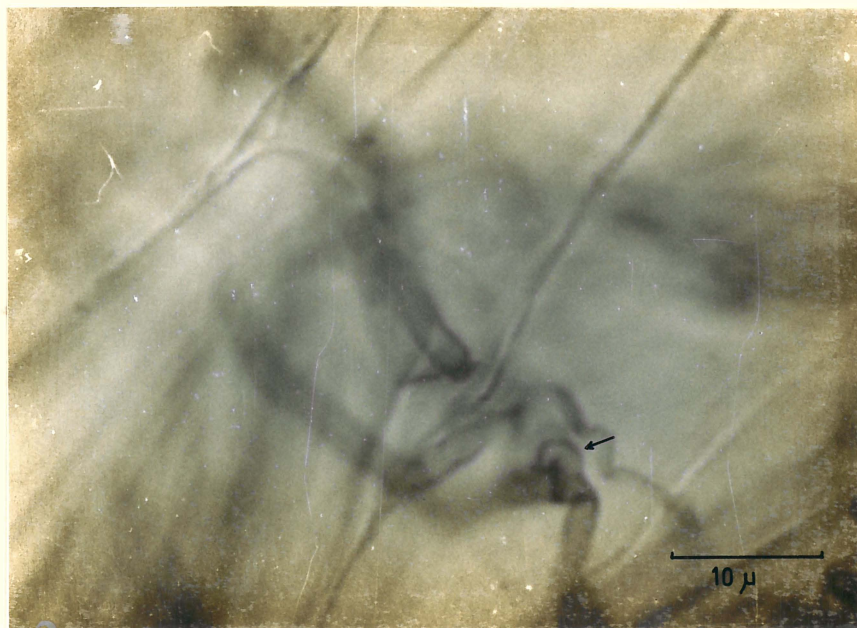


Figura 10. Tecido foliar colonizado por *U.scitaminea*. A seta indica es-  
trutura semelhante a um grampo de conexão.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Limpeza das sementes

As sementes originárias de polinização livre das variedades PR 980 e CP 5848 foram submetidas ao processo de eliminação das pálea, lema e pedúnculos, visando diminuir a interferência de *Helminthosporium* sp, *Curvularia* sp e *Phoma* sp, que colonizam estes tecidos. Além disso, muitas sementes de cana-de-açúcar são abortadas ou mal formadas e pelo processo de separação dos cariópses, obtêm-se uma melhor germinação e plantinhas mais uniformes e vigorosas do que quando se usam sementes completas. As sementes usadas, apresentaram maior porcentagem de germinação quando semeadas sem casca do que quando semeadas completas, provavelmente devido aos fatores acima relacionados. Isto é bem evidente na Tabela 1., onde o aumento na germinação foi de 17,84% para a variedade PR 980 e 26,67% para a variedade CP 5848.

Aliado a estes fatos e baseados nos trabalhos de *TISDALE e TAPKE (1924)* e *BAYLES e COFFMAN (1929)*, que estudaram os processos de

infecção de *Ustilago nuda* e *Ustilago avenae* em sementes de cevada e aveia, observa-se que estes autores obtiveram maiores porcentagens de plantas doentes quando inocularam as sementes de cevada e aveia, sem casca, em relação às inoculações em sementes com casca. Pelo exposto, observa-se que há várias vantagens no uso de sementes de cana-de-açúcar com as pálea e lema removidas, nos estudos de inoculação com *Ustilago scitaminea*. Há porém, necessidade de se efetuarem novos trabalhos para melhor aquilatar os efeitos da remoção da pálea e da lema nas inoculações em sementes de cana-de-açúcar com *U.scitaminea*.

## 6.2. Determinação qualitativa dos contaminantes dos esporos de *U.scitaminea*

Nas condições de casa-de-vegetação, os contaminantes mais freqüentes foram *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium* sp, *Fusarium* sp e bactérias não identificadas.

Quando chicotes são coletados no campo, na época chuvosa, com alta umidade relativa do ar (80% a 90%), observa-se alta incidência de chicotes contaminados por *F.moniliforme*, *Cladosporium* sp, *Monília* sp e bactérias não identificadas que provocam a fermentação dos esporos.

Em condições de campo, *SREEAMULU e VITTAL (1972)* observaram que na Índia, durante o período chuvoso com umidade relativa do ar de 90% e velocidade dos ventos de 25 km/h, a concentração de esporos de *U.scitaminea* no ar é muito baixa quando comparada à do período de estiagem, sugerindo que a ação conjunta destes três fatores reduz a quantidade

de de esporos no ar devido à lavagem dos esporos pela chuva. O umedecimento dos esporos torna-os mais pesados, dificultando sua liberação e favorecendo o desenvolvimento de contaminantes, o que poderia explicar também, o decréscimo na concentração de inóculo observado por estes autores.

Não existem dados na literatura que possam servir de comparação para estas observações e é provável que em outras condições ambientais ocorram maior número de espécies de contaminantes, do que as observadas nas condições estudadas no presente trabalho.

#### 6.2.1. Teste de patogenicidade dos contaminantes dos esporos

Os resultados dos testes de patogenicidade com os contaminantes que se encontravam associados aos esporos de *U.scitaminea* em plântulas provenientes de polinização livre da variedade PR 980 (Tabela 3) demonstraram que *Fusarium moniliiforme*, *Fusarium* sp e *Helminthosporium* sp são os contaminantes dos esporos de *U.scitaminea* mais patogênicos para as plântulas de cana-de-açúcar. O fungo *Cladosporium* sp foi o menos patogênico. As espécies *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp não foram patogênicos para a cana-de-açúcar, nas condições estudadas.

*SANGUINO (1976)* obteve resultados semelhantes quando testou estes mesmos gêneros de fungos, isolados de sementes botânicas de cana-de-açúcar, em plântulas em condições de caixas de Petri. Face a estes resultados fica evidente que tanto os contaminantes das sementes como dos esporos podem interferir no sucesso da inoculação de sementes de cana-de-açúcar com *U.scitaminea*.



### 6.3. Limpeza dos esporos

#### 6.3.1. Limpeza com Sulfato de Cobre

O exame geral dos dados apresentados na Figura 1 e Apêndice 1 indicam que, quando esporos de *U.scitaminea* são tratados com sulfato de cobre, a porcentagem de germinação cai para 30% em relação à observada nos esporos não tratados. Quando os esporos permaneceram imersos no sulfato de cobre por 30 minutos, a porcentagem média de germinação foi de 14,44%, enquanto que quando imersos por 60 a 120 minutos as porcentagens médias de germinação foram 17,81% e 10,36%, respectivamente. Se compararmos estes dados com os obtidos no tratamento controle, notamos que neste tratamento a porcentagem média de germinação foi três vezes maior do que no tratamento de imersão por 60 minutos que apresentou maior porcentagem média de germinação.

*STAKMAN et alii (1929)* obtiveram clamidósporos de *Ustilago zae* livres de contaminantes tratando-os com solução de sulfato de cobre a 1% durante 24 horas, ou seja, uma solução 20 vezes mais concentrada e por um período 24 vezes maior do que o usado no presente trabalho. Os resultados obtidos com *U.scitaminea* demonstraram que seus esporos são mais sensíveis ao sulfato de cobre do que os de *U.zae*, podendo-se inferir que o uso de sulfato de cobre no tratamento de esporos de fungos do gênero *Ustilago* spp não pode ser generalizado.

Em relação ao período de incubação, observou-se que quando os esporos foram incubados por um período de 8 horas, apresentaram maiores porcentagens de germinação quando comparado aos períodos de 4 e

6 horas.

O tratamento com sulfato de cobre inibe a germinação, com portando-se os esporos como se tivessem sofrido processo de envelhecimento. Por esta razão é que após 8 horas de incubação é que foi observado maior número de esporos germinados. Os dados obtidos concordam com os obtidos por *MATA (1975)*, onde o autor observou que à proporção que os esporos ficam mais velhos há um retardamento na germinação enquanto que esporos mais jovens iniciam o processo 2 a 4 horas após a semeadura, fato também observado por *HIRCHHORN (1950)*.

### 6.3.2. Limpeza com Metil-tiofanato

De acordo com a Figura 2 e Apêndice 2, nota-se que o fungicida metil-tiofanato teve um efeito inibidor na germinação de *U.scitaminea*, pois, à proporção que a concentração do produto aumentou, a taxa de germinação decresceu, havendo uma relação inversamente proporcional entre taxa de germinação e concentração do produto.

Os resultados não correspondem aos obtidos por *STEINER e BYTHER (1972)*, que recomendam o uso deste fungicida para tratamento das extremidades de colmos de cana-de-açúcar após a imersão em suspensão de esporos de *U.scitaminea*. Os autores não constatarem efeito danoso do fungicida no sucesso das inoculações, embora tenham usado solução do fungicida na concentração de 200 ppm. No presente trabalho, o uso de metil-tiofanato na concentração de 100 ppm reduziu a germinação de 87,2% para 6,50%.

#### 6.4. Influência do substrato na germinação dos esporos de *U.scitamínea*

Esporos tratados com sulfato de cobre e colocados a germinar em meio de cultura enriquecido com diferentes aminoácidos apresentam uma taxa de germinação semelhante àquela obtida em substrato pobre. Esporos não tratados germinando em substratos enriquecidos apresentam uma taxa de germinação maior do que a obtida sobre substrato pobre. Estes resultados mostram que os aminoácidos glicina, leucina e nicotinamida estimulam a germinação dos esporos quando estes não são tratados com sulfato de cobre (Tabela 4).

As comparações pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, entre as médias das porcentagens de germinação dos esporos não tratados germinados sobre substrato enriquecido e substrato pobre não foram significativas, mas, há uma tendência para melhor germinação no substrato enriquecido (Apêndice 3). Estes dados estão de acordo com os de MATA (1975) que obteve estímulo na germinação de esporos pouco vigorosos com estes aminoácidos.

#### 6.5. Determinação da época de amostragem de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas 24 e 48 horas após a semeadura com *U.scitamínea*.

A Figura 3, representativa dos Apêndices 4 e 5, apresenta as porcentagens de plântulas de cana-de-açúcar provenientes da variedade PR 980, contendo micélio interno de *U.scitamínea*. Observa-se que em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas 24 horas após a semeadura com *U.*

*scitaminea*, a porcentagem de plântulas com micélio interno apresenta a tendência de aumentar do 3º ao 9º dia, que corresponde à última época de coleta. Quando as inoculações foram feitas 48 horas após a semeadura, a porcentagem de plântulas com micélio interno aumenta vertiginosamente do 4º dia após a semeadura até o 8º dia, quando apresentaram um pico máximo decrescendo daí até o 10º dia.

Plântulas inoculadas 24 horas após a semeadura apresentaram porcentagem máxima de micélio interno quando coletadas aos 9 dias após o semeio, enquanto que naquelas inoculadas 48 horas após o semeio ocorreu aos 8 dias após a semeadura.

A comparação entre as médias das porcentagens de plântulas contendo micélio interno usando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade nos dois ensaios, indicou diferenças significativas só quando as coletas foram feitas aos 3 e 4 dias após o semeio, nas demais épocas de coletas não houve diferença significativa. Do exposto, pode-se dizer que plântulas originárias da variedade PR 980 quando inoculadas com suspensões de esporos ( $6 \times 10^6$  esporos/ml) de *U.scitaminea* 24 horas após a semeadura podem ser coletadas para verificação do número de plântulas colonizadas, a partir do 5º dias depois da semeadura, sendo que no 9º dia acusam maior porcentagem de micélio interno (20,83%); quando plântulas provenientes desta variedade são inoculadas 48 horas após a semeadura, as coletas de amostras poderão ser feitas a partir do 6º dia a contar da data da semeadura, e a porcentagem máxima de plântulas colonizadas é obtida 8 dias após a semeadura (51,67%). Observa-se nestes ensaios que as inoculações feitas 48 horas após a semeadura produziram

maiores porcentagens de plântulas colonizadas do que aquelas inoculadas 24 horas após a semeadura.

Os contaminantes internos mais freqüentes nas plântulas foram *Helminthosporium* sp, *Phoma* sp e em menor freqüência *Curvularia* sp. Estes patógenos podem colonizar os tecidos das plântulas de cana-de-açúcar, mas, as características morfológicas de seus micélios são diferentes daquelas do micélio de *U.scitaminea*. O fungo *Helminthosporium* sp (Figura 4), coloniza todos os tecidos da plântula, desde a raiz até as folhas. Seu micélio apresenta 4,2 a 7,1  $\mu$  de largura e cora-se de azul muito intenso quando os tecidos das plântulas são submetidos ao processo de coloração proposto por *POPP (1958 b)*, além de esporular abundantemente; *Phoma* sp (Figura 5), coloniza os tecidos intracelularmente e seu micélio no interior das plântulas se caracteriza por apresentar as células das hifas grossas e curtas, além de produzir boa quantidade de picnídios; enquanto que o micélio de *Curvularia* sp assemelha-se ao de *Helminthosporium* sp, porém, esporula bem sobre as plântulas infetadas. O micélio interno de *U.scitaminea* diferencia-se bem dos fungos citados pelas seguintes características (Figuras 6, 7, 9 e 10): o micélio possui diâmetro menor (2,0 a 5,0  $\mu$ ) e apresenta contorções características (Figura 6) não observada nos micélios dos outros contaminantes. Esta contorção característica foi observada também por *HIRSCHHORN (1950)*. Seu desenvolvimento nos tecidos das plântulas após a inoculação inicia no mesocótilo, na região da cicatriz do escutelo e uma vez no interior dos tecidos, caminha pelos vasos do floema e xilema (Figura 6) distribuindo-se por todo parênquima foliar (Figura 9). Estas observações sobre a colonização dos tecidos das plântulas pelo patógeno estão de acordo com as de

BYTHER e STEINER (1973) que constataram micélio de *U.scitamínea* nos tecidos dos nós e entre-nós, demonstrando a total colonização dos tecidos da cana-de-açúcar por *U.scitamínea*. Raramente foi observada penetração nos tecidos radiculares das plântulas provenientes da variedade de cana-de-açúcar PR 980.

Plântulas colonizadas por *U.scitamínea* raramente encontram-se também colonizadas por *Helminthosporium* sp, o que leva a suspeitar que haja antagonismo entre estes dois patógenos da cana-de-açúcar, pois, o número de plântulas mortas devido a *Helminthosporium* sp sempre foi maior nas parcelas testemunhas quando comparadas com as parcelas inoculadas com o agente do carvão de cana-de-açúcar.

#### 6.6. Influência da idade das plântulas na penetração e colonização por *U.scitamínea*

Os dados resultantes da avaliação da reação de plântulas de cana-de-açúcar provenientes das variedades PR 980 e CP 5848 apresentados nos Apêndices 6, 7, 8 e Figura 8, mostram que as plântulas da variedade PR 980 à proporção que se desenvolvem apresentam-se mais suscetíveis ao fungo e que as porcentagens máximas de plântulas com micélio interno de *U.scitamínea* obtêm-se quando estas são inoculadas aos 6 dias de idade (66,25% e 52,50%). Quando os dados obtidos nos dois ensaios com esta variedade são transcritos para gráfico, nota-se que as curvas dos dois ensaios são análogas (Figura 8).

Quando se analisa os dados obtidos com a variedade PR 980

e aqueles obtidos com a variedade CP 5848 (Figura 8), nota-se que a porcentagem de plântulas colonizadas pelo fungo aumenta proporcionalmente em relação à idade, obtendo-se uma porcentagem máxima quando as plântulas são inoculadas aos 10 dias da idade (72,63%).

Considerando-se as duas variedades estudadas, observa-se que as plântulas da variedade PR 980 são mais suscetíveis até 6 dias de idade, quando então começa a decrescer o período de suscetibilidade. Esta variedade comportou-se de modo semelhante nos dois ensaios realizados. Quanto à variedade CP 5848, as plântulas tornam-se mais suscetíveis com a idade sendo que aos 10 dias apresentam-se mais suscetíveis. Até onde vai o período de suscetibilidade não foi possível determinar por que quanto mais tardias as leituras dos resultados maior a chance de interferência de contaminantes. Pelos resultados apresentados, observa-se que as variedades de cana-de-açúcar reagem diferentemente à ação de *U. scitaminea*. A análise conjunta dos experimentos de determinação da época de coleta de amostras de plântulas de cana-de-açúcar colonizadas e influência da idade das plântulas na penetração e colonização por *U. scitaminea*, mostra que as plântulas provenientes de polinização livre da variedade PR 980 inoculadas 48 horas após a semeadura e coletadas 10 dias após a inoculação, apresentaram em média 28,15% de plântulas colonizadas (Apêndice 5). Esta condição experimental é idêntica à observada nos Apêndices 6 e 7, onde se estudaram a influência da idade das plântulas na penetração e colonização pelo fungo. Nestes experimentos, vemos que as plântulas inoculadas 2 dias após a semeadura apresentaram porcentagens médias de 23,75% e 29,38%, respectivamente.

Estes três experimentos podem ser comparados nas condições pré-fixadas e demonstram que o método de inoculação é reproduzível, com resultados comparáveis, mesmo quando aplicado em épocas tão diferentes.

*BRANDWEIN (1940)*, inoculando plântulas de aveia com *Ustilago levis* em diferentes horas, observou que em variedades suscetíveis e parcialmente suscetíveis o período de maior suscetibilidade ocorre durante os primeiros estágios de desenvolvimento e quando as plântulas se desenvolvem este período de suscetibilidade diminui; que após a emergência das primeiras folhas, a suscetibilidade cai para zero ou próximo de zero. Os resultados obtidos com a variedade PR 980 concordam com os obtidos por *BRANDWEIN (1940)*, quanto ao período máximo de suscetibilidade. Quando as folhas primárias emergem ainda são suscetíveis, pois, quando estas folhas jovens são inoculadas por aspersão de suspensão de esporos do fungo ( $6 \times 10^6$  esporos/ml), este pode penetrar diretamente e colonizar os tecidos foliares das plântulas suscetíveis, inclusive os tricomas. Este fato também foi observado por *DASTUR (1920)*. *WALLER (1970)* estudando o modo de penetração de *U. scitaminea* em gemas de cana-de-açúcar observou que após a germinação dos esporos há formação de apressórios. É provável que se formem apressórios quando as folhas das plântulas são inoculadas com o patógeno, pois, não foi observado nenhum caso de penetração através dos estômatos, embora em alguns casos, tenha sido observado células anexas colonizadas.

As plântulas da variedade CP 5848 apresentaram-se mais suscetíveis ao fungo do que aquelas da variedade PR 980. Algumas planti



nhas exibiram clorose e crescimento radicular interrompido. *TISDALE e TAPKE (1924)*, também observaram anomalias semelhantes em plântulas de cevada inoculadas com *Ustilago nuda*. Segundo os autores, estas anomalias deve-se mais à ação direta do fungo nos tecidos do hospedeiro porque não encontrou nenhuma evidência da presença de toxinas, mas, adverte ainda os autores que se for uma toxina, esta deve ser formada nos tecidos do hospedeiro. Em relação à *U.scitaminea* não se sabe ainda a verdadeira causa destas anomalias, seja devido à ação de toxinas produzidas pelo fungo ou pelo hospedeiro, mas, poderá ser objeto de estudos posteriores. Foi observado também nesta variedade, plantinhas totalmente colonizadas pelo fungo desde a raiz até as folhas, enquanto que naquelas da variedade PR 980 raramente foram observadas plantinhas nestas condições.

As plântulas de cana-de-açúcar de ambas variedades estudadas, apresentaram diferentes graus de reação ao patógeno. Examinando-se as plântulas após o processo de coloração, encontrou-se as seguintes condições: plântulas totalmente colonizadas; micélio interno só nas folhas; micélio confinado na região do mesocótilo; e plântulas totalmente sadias. Tendo-se como base estas observações pode-se pensar que a distribuição de esporos usada não era a mais adequada e que ocorreu o fenômeno de escape ou então que as plântulas sem micélio interno eram na realidade resistentes ao fungo.

Considerando-se a primeira hipótese, ela dificilmente pode ocorrer devido ao processo de aspersão de esporos ter sido feito em toda placa de Petri de maneira a cobrir todas as plântulas e se a técnica de inoculação não fosse eficiente não se teria obtido porcentagens

médias de plântulas colonizadas pelo fungo, relativamente altas (72,63%). Pelo exposto, restam apenas as hipóteses de escape e resistência. Estudos que pudessem comprovar a natureza da reação destas plântulas frente ao patógeno não foram realizados com as plântulas fixadas porque estas foram mortas antes que fossem feitas as leituras, mas, estudos preliminares foram efetuados procurando-se correlacionar presença de micélio interno e produção de chicotes.

#### 6.7. Relação entre presença de micélio interno de *U.scitaminea* em folhas de cana-de-açúcar e aparecimento de chicotes

O ensaio de correlação entre presença de micélio em folhas primárias e suscetibilidade, reforça a validêz deste método de inoculação de *U.scitaminea* para seleção de variedades de cana-de-açúcar e fornece mais uma evidência de que plântulas sem micélio de *U.scitaminea* são plantas resistentes ou que escaparam à colonização por outras causas físicas ou biológicas. Os resultados obtidos neste experimento (Tabela 5), mostram que no lote de plantas sem manchas foliares, somente em folhas primárias de 3 plantas foi constatado micélio interno; no lote com manchas foliares, foi constatado micélio interno do fungo em 6 plantas (Figuras 9 e 10), enquanto que no lote testemunha as folhas de todas as plantas examinadas apresentaram-se sem micélio interno. Relacionando-se estes resultados obtidos em laboratório com a produção de chicotes observa-se que, com exceção de uma planta no lote sem manchas foliares e outra do lote com manchas foliares, todas as plantas em cujas folhas primárias foi constatada a presença de micélio interno do fungo produziram

chicotes em condições de casa-de-vegetação, confirmando as observações feitas por *SILVA (1973)\**. O período de formação dos chicotes variou de 51 dias até 100 dias. Estes dados estão próximos dos obtidos por *HIRSCHHORN (1950)*.

Observou-se que nem todas as plantas do lote com manchas foliares produziram chicotes como era esperado. Como os sintomas iniciais em folhas de plântulas de cana-de-açúcar causados por *Helminthosporium sacchari* e *Curvularia lunata* apresentam características semelhantes às manchas pardo claras que aparecem nas folhas das plântulas causadas por *U.scitamínea*, é provável que durante a seleção das plântulas para composição do lote com manchas foliares estas plantas tenham sido incluídas neste lote.

O aparecimento tardio de chicotes na planta 9 do lote com manchas foliares e na 11 do lote sem manchas foliares pode ser explicado se considerarmos que nestas duas plantas a quantidade de micélio interno do patógeno era muito pequena que não foi possível detectar nos exames microscópicos dos tecidos foliares.

Os resultados obtidos abrem novas perspectivas para detecção de plantas afetadas por *U.scitamínea*, uma vez que, pode-se indicar qual a planta que está afetada antes que esta produza o chicote, fazendo-se um exame microscópico das folhas primárias destacadas e coradas.

---

(\*) *SILVA*, op. cit., p. 10.

## 7. CONCLUSÕES

Após a apresentação e discussão dos resultados obtidos, po de-se concluir que:

a. Os contaminantes mais freqüentes nas partidas de esporos de *Ustilago scitaminea* Syd. e mais patogênicos para plântulas de cana-de-açúcar foram *Fusarium moniliforme*, *Fusarium* sp e *Helminthosporium* sp.

b. Os fungicidas sulfato de cobre e metil-tiofanato tiveram efeito fungicida nas dosagens usadas para desinfestar os lotes de esporos de *U.scitaminea*.

c. Os aminoácidos glicina, leucina e nicotinamida não estimularam a germinação de esporos tratados com o fungicida sulfato de cobre.

d. A coleta de amostras para verificação de micélio interno de *U.scitaminea* em plântulas de cana-de-açúcar pode ser feita a partir do 5º dia, se a inoculação dos cariópses for feita 24 horas após a semeadura e a partir do 6º dia se a inoculação dos cariópses for feita 48 horas após a semeadura.

e. Plântulas provenientes da variedade PR 980 são mais suscetíveis quando inoculadas aos 6 dias de idade, enquanto que as provenientes da variedade CP 5848 são mais suscetíveis aos 10 dias de idade, indicando que o período de suscetibilidade varia de acordo com a variedade.

f. A presença de manchas pardo-claras em folhas de plântulas inoculadas e crescendo em casa-de-vegetação está correlacionada com a presença de micélio interno de *U.scitaminea* e suscetibilidade, desde que não haja interferência de *H.sacchari*, *Curvularia lunata* e outros fatores.

g. Plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *U.scitaminea* e sem manchas nas folhas podem conter micélio interno e serem suscetíveis ao patógeno.

h. O método de inoculação de sementes botânicas de cana-de-açúcar é promissor e apresenta correlação entre presença de micélio em folhas primárias e produção de chicotes nas plantas suscetíveis.

## 8. SUMMARY

Studies were done with *Ustilago scitaminea* Syd. to determine and eliminate spore contaminants, to set the time of harvesting inoculated seedlings, the effect of age on seedling penetration and colonization, and finally, correlation between external symptoms and development of the fungus in sugarcane seedlings tissues.

The assays carried out showed that *U.scitaminea* spore contaminants more frequent and more pathogenic to sugarcane seedlings were *Helminthosporium* sp, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium* sp.

In an attempt to clean spore sample of *U.scitaminea* from contaminants, spores produced under greenhouse conditions were treated with copper sulfate and methyl-thiophanate in different concentrations. The treatments with copper sulfate and methyl-thiophanate reduced the percentage of germination and both killed the spores.

Inoculation of *U.scitaminea*, by spraying spores  $(6 \times 10^6$

spores/ml), on caryopsis from open pollinated seeds of variety PR 980, demonstrated that seedling sampling, to verify internal mycelium of the pathogen, can be started four days after inoculation, when inoculation is performed 24 or 48 hours after sowing.

Tests to determine the influence of age of seedlings, originated from varieties PR 980 and CP 5848, on penetration and colonization of *U.scitaminea*, indicated that seedlings of the former variety are more susceptible 6 days after sowing (66,25%), while seedling of the latter turned out to be more susceptible after 10 days (72,63%).

Plants with mycelium of *U.scitaminea* in the leaflets, produced whips appendages under greenhouse conditions. The presented data are discussed.

## 8. LITERATURA CITADA

- BOCK, E.R.**, 1964. Studies on sugar-cane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenia. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 47 (3): 403-417.
- BRANDWEIN, P.F.**, 1940. Infections studies on the covered smut of oats. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, New York, 67: 637-691.
- BRIEGER, F.O.**, 1965. Carvão da cana-de-açúcar: mal epidêmico. *Brasil Açucareiro*, São Paulo, 65: 78-80.
- BYLES, B.B. e F.A. COFFMAN**, 1929. Effects of dehulling seed and of date of seeding on germination and smut infection in oats. *Journal of the American Society of Agronomy*, Washington, 21: 41-51.



- BYTHER, R.S. e G.H. STEINER, 1973. Isolation of smut from infected stalkes. *Report. Hawaiian Sugar Planter's Association Experiment Station*, Honolulu: 32-33.
- BYTHER, R.S. e G.W. STEINER, 1973. Comparison of inoculation techniques for smut diseases testing in Hawaii. *Proceedings. International Society of Sugar Cane Technologists*, Havana, 12: 280-288.
- BYTHER, R.S. e G.W. STEINER, 1974. Unusual smut symptoms on sugarcane in Hawaii. *Plant Disease Reporter*, Washington, 58 (5): 401-405.
- CARVALHO, R. de S., 1949. Carvão da cana. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 6: 1-12.
- DASTUR, J.F., 1920. The mode of infection by smut in sugar-cane. *Annals of Botany*, London, 34: 391-397.
- DOROGIN, G.N., 1924. Instructions for the testing of seeds for contamination with fungous pests. *Review of Applied Mycology*. London, 3: 221-222.
- DURAIRAJ, V.; S. NATANAJAN e D. PADMANABHAN, 1972. Reactions of some sugarcane varieties to smut (*Ustilago scitaminea* Syd.). *Pest Articles and New Summaries*, London, 18: 171-172.

- HIRSCHHORN, E., 1943. Algunos caracteres del "carbon" de la caña de azúcar. *Serie botánica. Instituto del Museo de la Universidad Nacional de La Plata*, Tucumán, 6 (39): 1-39.
- HIRSCHHORN, E., 1949. Un nuevo método de infección artificial con el carbon de la caña de azúcar. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, Buenos Aires, 3 (4): 335-344.
- HIRSCHHORN, E., 1950. Caracteres del ciclo evolutivo del carbon de la caña de azúcar. *Revista de investigaciones Agrícolas*, Buenos Aires, 4 (3): 317-324.
- HIRSCHHORN, E., 1955. Comportamiento sexual de *Ustilago scitaminea*. *Instituto de Fitotecnia del Ministerio de Agricultura y Ganadería*, Buenos Aires, (112): 317-324.
- HSIO-TSENG, C., 1971. Sugar cane disease in Taiwan. *Taiwan Sugar*, Taipei, 1/2: 220-229.
- KAVANAGH, T., 1959. A technique for seedlings inoculation with chlamyospores of *Ustilago nuda* and *U. tritici*. *Phytopathology*, Lancaster, 49 (9): 542.
- KAVANAGH, T., 1961. Inoculating barley seedlings with *U. nuda* and wheat seedlings with *U. tritici*. *Phytopathology*, Lancaster, 51 (3): 175-177.

MATA, J.F. da, 1975. Preservação e determinação de viabilidade de clamidósporos de *Ustilago scitaminea*. Piracicaba, ESALQ/USP. 66 p. (Tese de Mestrado).

MORTON, D.J., 1960. A quick method of preparing barley embryos for loose smut examination. *Phytopathology*, Lancaster, 50 (4): 270-273.

MORTON, D.J., 1960. A seedling test for detecting viable *Ustilago nuda* mycelium following barley seed treatments. *Phytopathology*, Lancaster, 50 (9): 697.

MORTON, D.J., 1961. Trypan blue and boiling lactophenol for staining and clearing barley tissues infected with *Ustilago nuda*. *Phytopathology*, Lancaster, 51 (1): 27-29.

POPP, W., 1958. A new procedure for embryo examination for micelium of smut fungi. *Phytopathology*, Lancaster, 48 (1): 19-22.

POPP, W., 1958. An improved method for detecting loose-smut mycelium in whole embryos of wheat and barley. *Phytopathology*, Lancaster, 48 (12): 641-643.

ROSS, J.G.; W.M. SEMENIUK; D.K. TAYLOR; B.C. JENKINS, 1948. Factors affecting the degree of infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jeans) Rostr.). *Scientific Agriculture*. Ottawa, 28 (11): 481-492.

- RAO, N.V. e P. PRAKASAN, 1956. Studies on sugar-cane smut. *Proceedings. International Society of Sugar Cane Technologists*, Havana, 9: 1048-1057.
- RICAUD, C., 1970. Smut. *Report. Mauritius Sugar Industry Research Institute*, Port Louis, 18: 96-97.
- SANGUINO, A., 1976. Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari*. Piracicaba, ESALQ/USP. 77 p. (Tese de Mestrado).
- SHARMA, S.L., 1956. Morphological modifications in sugarcane plant by systemic infection of smut (*Ustilago scitaminea* Syd.). *Proceedings. International Society of Sugar Cane Technologists*, Havana, 9: 1134-1168.
- SILVA, W.M., 1974. Produção de "seedlings" de cana-de-açúcar pelo beneficiamento "Fuzz" e transplante precoce. Viçosa, UFV. 34 p. (Tese de Mestrado).
- SIMMONDS, P.M., 1946. Detection of loose smut fungi in embryos of barley and wheat. *Scientific Agriculture*, Ottawa, 26 (2): 51-58.
- SKVORTZOFF, S.S., 1938. A simple method for detecting hiphae of loose-smut in wheat grains. *Review of Applied Mycology*, London, 17: 382.

SREERAMULU, T. e B.P.R. VITTAL. 1972. Spore dispersal of the sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*). *Transaction of the British Mycological Society*, London, 58 (2): 301-312.

STAKMAN, E.C.; J.J. CHRISTENSEN; C.J. EIDEN e B. PETURSON, 1929. Mutation and hybridization in *Ustilago zea*. *Technical Bulletin. Minnesota Agricultural Experiment Station*, St. Paul, n.65. 108 p.

STEINER, G.W. e R.S. BYTHER, 1972. Chemicals to control smut. *Report. Hawaiian Sugar Planter's Association Experiment Station*, Honolulu; 47-48.

TALBALLA, H.A., 1969. Smut on true seedlings of sugarcane. *Plant Disease Reporter*, Washington, 53 (12): 992-993.

TISDALE, W.H. e V.F. TAPKE, 1924. Infection of barley *Ustilago nuda* through seed inoculation. *Journal of the Agricultural Research*, Washington, 29 (6): 263-284.

VISWANATHAN, T.S., 1964. Behavior of *Ustilago scitaminea* Syd. obtained from diverse localities in India. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, Deen Haag, 23 (3): 203-209.

WALLER, J.M., 1969. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. I. Epidemiology. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 52 (1): 139-151.

WALLER, J.M., 1970. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. II. Infection and Resistance. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 54 (1): 405-414.

WELLS, S.A. e A.W. PLATT, 1949. The effect of loose smut on the viability of artificially inoculated barley seeds. *Scientific Agriculture*, Ottawa, 29 (1): 45-52.

YABLOKOWA, V.A., 1945. The application of fluorescent microscopy for detecting of live mycelium of *Ustilago tritici* in the heated and non-heated wheat grain. *Review of Applied Mycology*, London, 24: 93-94.

ZABALA, S., 1955. El "carbon" de la caña de azúcar. *Idia*, Buenos Aires, (87): 1-11.

APÉNDICES

APÊNDICE 1. Percentagens de germinação de esporos de *U.scitaminea* imersos em solução de sulfato de cobre, após 4, 6 e 8 horas de incubação.

Horas de Incubação	Porcentagem de germinação de esporos após os tempos de imersão (minutos)			
	0	30	60	120
4	21,07	6,15	12,88	9,87
	38,48	7,31	7,22	8,66
	54,67	15,49	12,09	6,58
6	28,44	9,80	19,70	9,57
	69,93	12,93	14,06	11,19
	82,50	13,31	16,59	10,24
8	56,87	19,78	27,15	13,00
	57,22	20,83	22,22	12,08
	71,57	24,39	28,39	12,08
Médias	52,42	14,44	17,81	10,36

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Horas de Incubação (H.I.)	2	591,97	295,99	7,49 **
Tempos de Imersão (T.I.)	3	4483,77	1494,59	37,81 ***
H.I. x T.I.	6	179,66	29,94	0,76 n.s.
Resíduo	24	948,71	39,53	
TOTAL	35	6204,11		

CV = 22,4%

F 5% H.Incubação - 3,40

Tukey 5% = 8,18

F 5% T.Imersão - 3,01

F 5% Interação - 2,51



APÊNDICE 2. Efeito de diferentes concentrações de metil-tiofanato sobre a germinação de esporos de *U.scitaminea*

---

Concentrações de metil-tiofanato (ppm)	Germinação dos esporos (%)
0	87,20 <u>a/</u>
20	53,32
30	43,42
40	20,03
50	18,56
100	6,50

---

a/ Contagem média de 10 placas de Petri

APÊNDICE 3. Influência de meios de cultura enriquecidos e não enriquecidos com diferentes aminoácidos na germinação de esporos de *U. scitaminea*.

Repetições	Tratamentos			
	GLN e ET	GLN e ENT	AA e ET	AA e ENT
1	23,40	66,70	20,20	64,30
2	24,00	75,10	21,20	57,90
3	27,00	77,00	16,70	60,60
4	19,60	76,90	28,70	57,40
5	20,00	76,50	20,10	67,30
Médias	22,80	74,44	21,40	61,50

GLN = Glicina, Leucina, Nicotinamida

AA = agar-água

ET = Esporo tratado com  $SO_4Cu$

ENT = Esporo não tratado

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	4002,73	1334,24	151,91 ***
Blocos	4	5,47	1,37	0,16 n.s.
Resíduo	12	105,39	8,78	
TOTAL	19	4113,59		

CV = 7,1%

F 5% = 3,49 (Tratamentos)

Tukey 5% = 5,57

F 5% = 3,26 (Blocos)

APÊNDICE 4. Porcentagens de plântulas provenientes da variedade PR 980 com micélio interno de *U.scitaminea* inoculadas 24 horas após a semeadura e coletadas em épocas diferentes.

Repetições	Dias de coleta			
	3	5	7	9
1	5,00	15,00	15,00	25,00
2	5,00	10,00	20,00	35,00
3	10,00	15,00	15,00	15,00
4	5,00	15,00	10,00	15,00
5	0,00	30,00	20,00	15,00
6	10,00	20,00	25,00	20,00
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	5,83	17,50	17,50	20,83

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	744,91	248,30	8,52 **
Resíduo	20	582,60	29,13	
TOTAL	23	1327,51		

CV = 24,4%

F 5% = 3,10

Tukey 5% = 8,73

APÊNDICE 5. Porcentagens de plântulas provenientes de polinização livre da variedade PR 980 com micélio interno de *U. scitaminea* inoculadas 48 horas após a semeadura e coletadas em dias diferentes.

Repetições	Dias de coleta			
	4	6	8	10
1	5,00	20,00	50,00	20,00
2	10,00	25,00	45,00	78,90
3	0,00	40,00	50,00	10,00
4	5,00	50,00	65,00	20,00
5	5,00	20,00	50,00	25,00
6	5,00	45,00	50,00	15,00
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	5,00	33,33	51,67	28,15

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	3675,89	1225,30	13,10 **
Resíduo	20	1870,46	93,52	
TOTAL	23	5546,35		

CV = 31,3%

F 5% = 3,10

Tukey 5% = 15,6

APÊNDICE 6. Porcentagens de plântulas de cana-de-açúcar de polinização livre da variedade PR 980 contendo micélio interno de *U. scitaminea* e inoculadas em diferentes dias (1º ensaio).

Repetições	Idade das plântulas inoculadas em dias					
	0	2	4	6	8	10
1	10,00	40,00	60,00	50,00	45,00	75,00
2	5,00	30,00	45,00	90,00	65,00	55,00
3	5,00	15,00	70,00	50,00	65,00	50,00
4	5,00	15,00	60,00	60,00	50,00	70,00
5	5,00	35,00	65,00	70,00	45,00	65,00
6	5,00	25,00	45,00	70,00	65,00	10,00
7	0,00	10,00	60,00	60,00	45,00	60,00
8	5,00	20,00	40,00	80,00	70,00	70,00
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	5,00	23,75	55,63	66,25	56,25	56,88

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	10856,84	2171,37	30,45 **
Blocos	7	434,09	62,01	0,87 n. s.
Resíduo	35	2495,39	71,30	
TOTAL	47	13786,32		

CV = 21%

F 5% = 2,48 (Tratamentos)

Tukey 5% = 12,72

F 5% = 2,64 (Bloco)

APÊNDICE 7. Porcentagens de plântulas de cana-de-açúcar de polinização livre da variedade PR 980 contendo micélio interno de *U. scitaminea* e inoculadas em diferentes dias (2º ensaio).

Repetições	Idade das plântulas inoculadas em dias					
	0	2	4	6	8	10
1	0,00	50,00	50,00	75,00	25,00	41,20
2	0,00	20,00	25,00	40,00	40,00	55,00
3	15,00	30,00	20,00	50,00	50,00	45,00
4	0,00	25,00	25,00	35,00	30,00	45,00
5	0,00	60,00	35,00	60,00	35,00	50,00
6	0,00	15,00	25,00	65,00	45,00	25,00
7	0,00	20,00	45,00	35,00	25,00	46,60
8	0,00	15,00	25,00	60,00	65,00	58,80
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	1,88	29,38	31,25	52,50	39,38	45,83

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	9723,62	1944,73	29,83 ***
Blocos	7	495,40	70,77	1,09 n.s.
Resíduo	35	2281,23	65,18	
TOTAL	47	12500,25		

CV = 24,7%

F 5% = 2,48 (Tratamentos)

Tukey 5% = 12,16

F 5% = 2,64 (Bloco)

APÊNDICE 8. Porcentagens de plântulas de cana-de-açúcar de polinização livre da variedade CP 5848 contendo micélio interno de *U. scitaminea* e inoculadas em diferentes dias.

Repetições	Idade das plântulas inoculadas em dias					
	0	2	4	6	8	10
1	0,00	15,00	30,00	10,00	40,00	45,00
2	15,00	0,00	15,00	50,00	80,00	80,00
3	6,30	20,00	10,00	40,00	65,00	75,00
4	5,30	5,00	45,00	70,00	85,00	90,00
5	5,00	10,00	25,00	70,00	70,00	61,00
6	10,00	20,00	70,00	85,00	55,00	75,00
7	5,00	40,00	40,00	50,00	65,00	85,00
8	25,00	38,90	60,00	50,00	85,00	70,00
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	8,95	18,61	36,88	53,13	68,13	72,63

#### ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	12462,34	2492,47	24,87 ***
Blocos	7	2176,15	310,88	3,10 *
Resíduo	35	3507,21	100,21	
TOTAL	47	18145,70		

CV = 25,3%

Tukey 5% = 15,08

F 5% = 2,48 (tratamentos)

F 5% = 2,64 (Bloco)