**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar:
influência de variáveis ambientais e desenvolvimento
de método para diagnose precoce**

Cassiara Regina Noventa Corrêa Bueno

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Cassiara Regina Noventa Corrêa Bueno
Engenheiro Agrônomo

Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Bueno, Cassiara Regina Noventa Corrêa

Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce / Cassiara Regina Noventa Corrêa Bueno. - - Piracicaba, 2010.
68 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Cana-de-açúcar 2. Carvão (Doença de planta) 3. Fungos fitopatogênicos 4. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 633.61
B928i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.

John F. Kennedy

*À Hilton e Gabriela,
Pelos momentos que ainda estão por vir,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Setor de Fitopatologia pela realização do curso;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Junior pela orientação e oportunidade;

À Alfredo Seiiti Urashima pelas exigências e puxões de orelhas (acho que deram certo);

Ao Dr. Álvaro Sanguino pela confiança, oportunidade e estímulo a pesquisa;

À Dra. Haiko Enok Sawazaki pelo apoio e colaboração na realização dos trabalhos;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira pelo espaço e material cedidos;

Aos colegas de trabalho Adhair, Carla, Cecília, Daniela, Deodato, Enrico, Eveline, Fabiana, Luiz Carlos, Paulo, Silvana e Thatiane pela amizade e convívio;

À minha amiga Noemia Aparecida de Souza pelo incentivo, apoio e entusiasmo em todos os momentos;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia por todos os ensinamentos;

Aos meus amigos de turma André, Cândida, Cristina, Fabrício, Isolda, Leonardo, Marisa, Raquel e Vanessa;

À minhas amigas Thaïs e Maria Eugenia pelos auxílios e momentos agradáveis com pizzas;

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

Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1 Revisão Bibliográfica.....	18
2.1.1 Importância da cana-de-açúcar.....	18
2.1.2 Histórico do carvão.....	18
2.1.3 Danos e perdas causadas pelo carvão	20
2.1.4 Etiologia.....	21
2.1.5 O processo de infecção.....	22
2.1.5 A variabilidade do patógeno	23
2.1.7 Inoculações para testes de resistência de variedades	25
2.1.8 Diagnóstico da doença.....	27
2.2 Material e métodos.....	29
2.2.1 Produção do inóculo.....	29
2.2.2 Determinação da viabilidade dos teliósporos e preparo do inóculo.....	30
2.2.3 Variedades de cana-de-açúcar	30
2.2.4 Inoculações	31
2.2.5 Condições pós-inoculações: temperatura, umidade e período de incubação	31
2.2.6 Plantio do hospedeiro e condução dos ensaios	32
2.2.7 Avaliações	33
2.2.8 Teste da idade do hospedeiro: idade das gemas.....	33
2.2.9 Teste da idade do hospedeiro: pré-brotação das gemas	34
2.2.10 Concentração do inóculo.....	34
2.2.11 Teste do tipo de inoculação.....	34
2.2.12 Delineamento estatístico	35

2.2.13 Teste dos iniciadores específicos bE4 e bE8	35
2.2.14 Isolamento dos endofíticos e teste de especificidade dos iniciadores bE	37
2.2.15 Teste de detecção em plantas: folhas e meristemas de plantas inoculadas	37
2.2.16 Teste de detecção em meristemas de cultivo " <i>in vitro</i> "	38
2.2.17 Desenvolvimento de iniciadores específicos Hs e Ha.....	38
2.2.18 Teste de especificidade dos iniciadores Hs e Ha	38
2.2.19 Teste de sensibilidade dos iniciadores Hs e Ha	39
2.2.20 Teste de detecção em meristemas de cultivo " <i>in vitro</i> "	39
2.2.21 Teste de detecção em folhas de plantas sintomáticas.....	39
2.2.22 Teste de detecção em plantas inoculadas assintomáticas	39
2.3 Resultados e discussão	40
2.3.1 Produção de inóculo e viabilidade	40
2.3.2 Condições de pós-inoculação na brotação das gemas da cana-de-açúcar.....	41
2.3.3 Condições de pós-inoculação na incidência de carvão	43
2.3.4 Idade dos hospedeiros.....	46
2.3.5 Pré-brotação das gemas.....	47
2.3.6 Concentração do inóculo	47
2.3.7 Tipo de inoculação.....	48
2.3.8 Teste com os iniciadores bE	50
2.3.9 Teste de especificidade: fungos endofíticos	52
2.3.10 Teste de detecção em plantas inoculadas.....	52
2.3.11 Teste de meristemas de cultivo " <i>in vitro</i> "	53
2.3.12 Desenvolvimento dos iniciadores específicos Hs e Ha.....	54
2.3.13 Teste de especificidade dos iniciadores específicos Hs e Ha.....	54
2.3.14 Teste de sensibilidade dos iniciadores específicos Hs e Ha.....	55
2.3.15 Teste de meristemas de cultivo " <i>in vitro</i> "	56
2.3.16 Teste em plantas sintomáticas	56
2.3.17 Teste em plantas assintomáticas.....	57
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnóstico precoce

O carvão é uma das doenças mais importantes da cana-de-açúcar. Grande parte dos Programas de Melhoramento Genético dessa cultura utiliza inoculações artificiais para selecionar e caracterizar as variedades quanto a sua resistência a doenças. Assim o conhecimento das condições favoráveis para infecção torna-se indispensável. Neste trabalho foram estudadas as condições que afetam a infecção de gemas pelo fungo *Sporisorium scitamineum*. Do ponto de vista do hospedeiro foi avaliada a incidência de chicotes para diferentes idades das gemas e das brotações das variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066. As gemas mais novas mostraram-se mais suscetíveis que as medianas e velhas, porém na variedade mais suscetível, a SP84-2066, não houve diferenças na taxa de infecção das gemas mais novas e velhas. Gemas sem pré-brotação e com pré-brotação de 1 dia foram infectadas pelo fungo enquanto que gemas pré-brotadas com 4, 6, 8 e 10 dias não foram infectadas. Para o patógeno, foi avaliada a concentração de teliósporos para a inoculação. As concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 foram as únicas que produziram sintomas e sinais, não diferindo a incidência da doença entre elas. Como condições de pós inoculação foram testadas as variáveis temperatura de 25, 28 e 32 °C, umidade de 65, 80 e 95% e período de incubação de 24, 48 e 96 horas. Foram realizados dois experimentos em tempos diferentes, sendo que no primeiro foram utilizadas as variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066 e no segundo, além das citadas, foram acrescentadas as variedades SP79-2312 e IAC66-6. O tratamento de 28°C, 65% de umidade por um período de 24 horas foi o que promoveu maior índice de infecção, para todas as variedades, exceto a SP84-2066 que foi favorecida por umidade de 95%. Além desses parâmetros foi avaliado o método de inoculação por aspersão de teliósporos e do fermento seguido por aspersão de teliósporos. A inoculação por fermento proporcionou maior índice de infecção para as variedades NA56-79, RB72-454, IAC66-6, SP70-1143, mas não teve interferência nas variedades SP79-1011, SP80-185 e SP86-155. Um segundo objetivo do trabalho foi validar um método de diagnose precoce para o carvão. Para isto foram desenvolvidos iniciadores específicos para a detecção de *S. scitamineum*. Esses iniciadores foram avaliados quanto a sua especificidade e sensibilidade e demonstraram bons resultados. Para a validação prática, plantas de 12 variedades inoculadas tiveram suas folhas amostradas aos 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias após o plantio. Todas as plantas que apresentaram o chicote puderam ser diagnosticadas precocemente com o método criado. As datas de diagnóstico precoce foram de no mínimo 30 dias e no máximo 120 dias antes do aparecimento do sintoma/sinal. Este é um método que pode ser incorporado para os testes de quarentena reduzindo a permanência de plantas na casa de vegetação e reduzindo os custos de manutenção dessas plantas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Carvão; *Sporisorium scitamineum*; Diagnose

ABSTRACT

Infection by *Sporisorium scitamineum* on sugarcane: influence of environmental variables and development of a method for early diagnosis

Smut is one of the most important diseases of sugarcane. Most part of genetic breeding programs from this culture use artificial inoculation in order to select and characterize the varieties regarding their resistance to diseases. Therefore knowledge of favorable conditions for infection becomes indispensable. This work studied conditions that affect bud infection by the fungus *Sporisorium scitamineum*. From the standpoint of the host it was assessed the whip incidence for different bud ages and shoot of the varieties NA56-79, SP71-1406 and SP84-2066. The younger buds were more susceptible than median and older ones, but in the susceptible variety, SP84-2066, there were no differences in the younger and older bud infection rates. Buds with and without shoots of 1 day were infected with the fungus while pre-sprouting buds with 4, 6, 8 and 10 days were not infected. For the pathogen it was evaluated teliospore concentration for inoculation. The concentrations 1×10^6 and 1×10^8 were the only ones that produced symptoms and signs, not differing disease incidence among them. As pos-inoculation conditions the variables tested were temperature of 25, 28 and 32 °C, humidity of 65, 80 and 95% and incubation period of 24, 48 and 96 hours. Two experiments were performed at different times, the first one were used NA56-79, SP71-1406 and SP84-2066 varieties and the second one, besides those mentioned, it was added SP79-2312 and IAC66-6 varieties. The treatment of 28 °C, 65% humidity and for a period of 24 hours was the one that promoted the highest infection rate, for all varieties, except for SP84-2066 that was favored by 95% of humidity. Besides these parameters, it was evaluated the inoculation method by teliospore spraying and wound followed by teliospore spraying. Inoculation by wounding provided higher infection rate for the NA56-79, RB72-454, IAC66-6, SP70-1143 varieties, however it had no interference in SP79-1011, SP80-185 and SP86-155 varieties. A second objective was to validate a method of early diagnosis of smut. Thus, it was developed specific primers to detect *S. scitamineum*. These primers were evaluated for their specificity and sensibility and showed good results. To practice validation, plants of 12 varieties inoculated had their leaves sampled at 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 and 150 days after planting. All the plants that presented whip could be early diagnosed by the created method. The dates of premature diagnosis were of at least 30 days and a maximum of 120 days before symptom/sign onset. This method can be incorporated for quarantine tests, reducing permanence of plant in greenhouse and reducing maintenance costs of these plants and varieties selection.

Keywords: Sugarcane; Smut *Sporisorium scitamineum*; Diagnosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Teste de extração de DNA. Colunas: 1 – Marcador molecular 1kb Fermentas[®], 2 – Controle positivo do gel, de 3 a 8 – extração Saghai-Marooof, de 9 a 14 – extração TNES e de 15 a 20 – extração Dellaporta..... 51
- Figura 2 - Amplificações com os iniciadores bE. Colunas: 1 – marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia NA56-79, 4 – folha da variedade NA56-79 com sintomas, 5 – folha da variedade SP84-2066 com sintomas, 6 – folhas da variedade SP71-1406 com sintomas, de 7 a 11 – meristemas inoculados da variedade NA56-79, de 12 a 15 – meristemas inoculados da variedade SP84-2066 e de 16 a 19 – meristemas inoculados da variedade SP71-1406.ncidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação..... .51
- Figura 3 - Teste de especificidade. Colunas: 1 – Marcador molecular 1kb Fermentas[®], 2 a 4 – *Sporisorium scitamineum*, de 5 a 8 – *Colletotrichum*, 9 a 12 – *Curvularia*, 13 a 16 – *Fusarium* e de 17 a 20 – *Trichoderma*. 52
- Figura 4- Teste de especificidade. Colunas: 1 – Marcador molecular 100 bp Fermentas[®] – 2 – *Sporisorium scitamineum*, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 7 – *Colletotrichum*, 8 a 11 – *Curvularia*, 12 a 15 – *Fusarium* e de 16 a 19 – *Trichoderma*. ... 55
- Figura 5 - Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 6 – controles positivos de folhas de plantas infectadas, 7 – teliósporos sem diluição, 8 – diluição de 1:1, diluição de 1:10, 9 – diluição de 1:50, 9 – diluição de 1:100, 10 – diluição de 1:1.000, 11 – diluição de 1:2.000, 12 – diluição de 1:5.000, 13 – diluição de 1:10.000, 14 – diluição de 1:15.000, 15 – diluição de 1:25.000, 16 – diluição de 1:100.000, 17 – diluição de 1:250.000, 18 – diluição de 1:800.000.. 55
- Figura 6 - Teste em meristemas. Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 7 – meristemas da variedade IAC66-6, 8 a 11- meristemas da variedade SP84-2066, 12 a 15 – meristemas da variedade NA56-79 e 16 a 19 – meristemas inoculados da variedade SP71-1406. 56

Figura 7 - Teste em plantas sintomáticas. Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 - controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 e 5 – limbo de folha -2, 6 – nervura de folha -2, 7 e 8 – limbo de folha -1, 9 – nervura de folha -1, 10 e 11 – limbo de folha 0, 12 – nervura de folha 0, 13 e 14 – limbo de folha +1, 15 – nervura de folha +1, 16 e 17 – limbo de folha +2, 18 – nervura de folha +2, 19 – controle positivo: teliósporos e 20 – controle negativo: água.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Brotação das gemas sadias e inoculadas com teliósporos de <i>Sporisorium scitamineum</i> submetidas a diferentes tratamentos de temperatura e umidade por diferentes períodos.....	41
Tabela 2 - Incidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação. Experimento safra 2006-07..	43
Tabela 3 - Incidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação. Experimento safra 2008-09.	44
Tabela 4 - Incidência de carvão em três variedades de cana-de-açúcar quando inoculadas gemas de diferentes idades fisiológicas.....	47
Tabela 5 - Incidência de carvão em três variedades de cana-de-açúcar quando inoculadas gemas brotadas por diferentes períodos.....	47
Tabela 6 - Incidência de carvão nas variedades de cana-de-açúcar quando inoculado com teliósporos de <i>Sporisorium scitamineum</i> em diferentes concentrações.....	48
Tabela 7 - Incidência de carvão em sete variedades de cana-de-açúcar inoculadas por aspersão de teliósporos e por fermento da gema seguido de aspersão de teliósporos de <i>Sporisorium scitamineum</i>	50
Tabela 8 - Correlação entre o número de plantas com chicote e o número e tempo de diagnóstico dessas plantas.	58

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o Estado de São Paulo é o maior produtor nacional sendo que atualmente é a cultura que tem o mais alto índice de geração de empregos. Como é uma cultura de grande extensão territorial, grande parte desse sucesso deve-se aos Programas de Melhoramento Genético que selecionam as melhores variedades inclusive à resistência a doenças. O controle de doenças nessa cultura é realizado basicamente pelo uso de variedades resistentes e por esse motivo as inoculações artificiais para testes de doenças tornam-se tão necessárias, podendo ser usadas como critério de seleção além de caracterizar as variedades. O carvão da cana-de-açúcar causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* é uma das doenças mais importantes dessa cultura, visto que é considerada em todos os Programas de Melhoramento Genético. Para que a caracterização das variedades utilizando inoculações artificiais seja efetiva é necessário o conhecimento das condições predisponentes para a infecção de cada uma delas. No caso do carvão, muitos parâmetros permanecem obscuros, tornando-se um interessante objeto de estudo. O primeiro objetivo desse trabalho foi estudar os fatores que interferem na infecção das gemas pelo patógeno. Dessa forma foram estudadas características do hospedeiro como idade das gemas e das brotações, concentração do inóculo do patógeno, tipo de inoculação com fermento ou apenas aspersão dos teliósporos nas gemas e fatores ambientais como a temperatura, umidade relativa e período de incubação.

Uma das fases do Programa de Melhoramento Genético inclui a importação de variedades de outros Programas para aumentar e diversificar o material genético para os cruzamentos que irão gerar novos clones. Esses materiais ficam em quarentena por até dois anos dependendo da doença e o carvão é uma doença de longo período de latência. Conseguir detectar o carvão antes do aparecimento do chicote é um grande ganho de tempo e de redução de custos para as importações de quarentena. Dessa forma o segundo objetivo desse trabalho foi desenvolver um método que detecte as plantas infectadas antes do aparecimento dos sintomas e sinais pela técnica de PCR de forma que possa ser incorporado à Programas de Melhoramento.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.2 Importância da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com 570 milhões de toneladas processadas, sendo o Estado de São Paulo responsável por 65% desta produção. A agroindústria do açúcar e do álcool é uma das principais atividades econômicas do país, gerando aproximadamente R\$ 28 bilhões no ano de 2008. Apenas o Estado de São Paulo reúne 400 mil empregos diretos no setor e o agronegócio da cana-de-açúcar é responsável por 35% do Produto Interno Bruto – PIB do Estado (UNICA, 2009).

Como é uma cultura de grande importância econômica para o país, a cana-de-açúcar tem sido estudada, principalmente quanto aos aspectos produtivo e fitossanitário.

As doenças de plantas constituem uma das principais causas que limitam os rendimentos das culturas e a qualidade dos produtos. No caso da cana-de-açúcar, existem mais de 100 doenças já identificadas (RAMALLO et al., 2000). O carvão, o mosaico, a escaldadura das folhas, o raquitismo das soqueiras e a ferrugem são as mais importantes, pois seus danos podem representar um fator limitante na produção das variedades e é por isso que são consideradas em todos os programas de melhoramento genético, tanto na seleção de genitores resistentes, como no comportamento das progêies (ANTOINE, 1961; IRVINE, 1982; COMSTOCK et al., 1983; BERGAMIN FILHO et al., 1987; FERREIRA; COMSTOCK, 1989; TOKESHI; RAGO, 2005).

2.1.3 Histórico do carvão

O carvão da cana-de-açúcar está distribuído por quase todos os países produtores do mundo e tem uma característica interessante que em todas as regiões do mundo onde tem ocorrido, há alternância de períodos com incidência epidêmica da

doença e períodos nos quais a doença é dificilmente encontrada. Essa alternância está, de um modo geral, intimamente relacionada com o nível de suscetibilidade da variedade predominante nestes períodos (BERGAMIN, 1987).

O carvão teve seu primeiro relato em Natal, na África no Sul em 1877 (ANTOINE, 1961) e a partir daí o foi relatado em outros países, como Java (1881), Mauritius (1982), Filipinas (1908), Moçambique (1910) e Birmânia (atualmente União de Mianmar, 1925) (ANTOINE, 1961, BERGAMIN, et al 1987, RABOIN et al, 2007). Nas décadas de 30 e 40 a doença chegou nas ilhas Reunião e Madagáscar e nos países Paquistão, Afeganistão, China, Formosa, Sri Lanka e Quênia. O carvão permaneceu por muito tempo no hemisfério oriental.

A primeira observação nas Américas foi na província de Tucumán, na Argentina, em 1940 (HIRSCHHORN, 1949) e disseminou para o Paraguai em 1944 (JAMES, 1978) e para o Brasil em 1946 (VEIGA, 1972), mas não foram observadas epidemias. No oeste da África, a doença foi primeiro detectada em Tchade in 1969 e em seguida foi relatada uma epidemia em Burkina Faso (BARAT, 1971).

No Brasil a primeira constatação foi em 1946 no engenho de Tarumã no município de Assis, Estado de São Paulo. O levantamento fitossanitário realizado na época revelou ser o município de Assis o maior foco da doença, mas touceiras atacadas também foram encontradas em Cândido Mota, Palmital e Macaraí. Em 1951 a doença foi identificada em Piracicaba, na Usina Monte Alegre. Poucos anos mais tarde o carvão da cana-de-açúcar já se já se encontrava em diversos Estados brasileiros, desde o Rio Grande do Sul até o Espírito Santo, Minas Gerais, sul de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No entanto, somente em 1985 é que o patógeno chegou até o Nordeste, tendo sido encontrado no município de Cascavel no Ceará. No ano seguinte, novas regiões foram atingidas pelo fungo, tendo a doença alcançando a região central de Goiás e Bahia (COPERSUCAR, 1987).

Com a disseminação do fungo pela Argentina e Brasil, tendo atingido também o Paraguai em 1944 e a Bolívia em 1957, somente duas regiões produtoras de cana-de-açúcar no mundo estavam livres do carvão no início da década de 70, a América do Norte e Central e o continente australiano. A doença rapidamente atingiu o norte da

América do Sul (Guianas, em 1974), praticamente toda a América Central (de 1975 a 1981) e também os Estados Unidos (Flórida em 1978, Lousiana e Texas em 1981).

Foi apenas em 2006, mesmo com fortes barreiras fitossanitárias, que o carvão atingiu a Austrália, numa propriedade em Queensland, tornando-se uma doença disseminada por todos países produtores da cana-de-açúcar (CONVENCIÓN INTERNACIONAL DE PROTECCIÓN FITOSANITARIA, 2006; CROFT; BRAITHWAITE, 2006).

Na década de 80, Tokeshi (1987) avaliando campos plantados com a variedade NA56-79, que ocupava 50% da área plantada do Estado de São Paulo, relatou a ocorrência de 30 a 40 mil chicotes por ha, incidência que ultrapassava 80% das plantas. Atualmente a doença encontra-se distribuída em todas as áreas comerciais da cultura em todo território nacional, inclusive na região Nordeste (SANTOS et al., 1986; BERGAMIN FILHO et al., 1987).

2.1.4 Danos e perdas causadas pelo carvão

Os prejuízos econômicos causados pela doença tem se mostrado variáveis, em função principalmente da suscetibilidade da variedade utilizada. Estes são, segundo Antoine (1961), difíceis de serem avaliados, sendo que as ocorrências de doenças são relatadas mais em termos de canas ou touceiras afetadas do que propriamente a porcentagem de perda. Segundo esse autor a severidade da doença depende principalmente de três fatores: tipo de infecção (primário ou secundário), época de infecção (precoce ou tardia) e reação varietal.

Rao e Prakasam (1956) relataram perdas na produção de cana de 39-56% na cana-planta e de 52-73% na cana-soca. Antoine (1961) indicou a perda na produção de cana de 50% e Lee-Lovick (1978) de 73% nas soqueiras. James (1973) verificou a redução em sacarose das plantas afetadas pela doença, o que foi explicado pelo decréscimo do diâmetro das plantas doentes.

A diminuição na produtividade é provocada por um conjunto de fatores, que incluem: eliminação, redução no diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução dos perfilhos industrializáveis e perdas do teor de sacarose pelo aumento de fibra e

conseqüente menor extração de açúcar (LEE-LOVICK, 1978; FERREIRA; COMSTOCK, 1989, CASAGRANDE, 1998).

O carvão foi relatado em 1946 causando epidemias no Brasil sobre as variedades POJ36 e POJ213 no município de Assis, Estado de São Paulo. Desde então, a disseminação foi rápida, atingindo outros Estados. Na década de 80 ocorreu a maior epidemia registrada no país sobre a variedade argentina NA56-79, que ocupava cerca de 50% da área canavieira, registrando-se incidências de até 80% nas áreas comerciais. Num estudo realizado nessa variedade, o número de chicotes por hectare passou de 0,62 para 6025 de 1981 para 1987 (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Uma estimativa de danos causados pelo carvão revelou que cada incremento de 1% na área sob a curva de progresso da doença provoca 0,7 - 0,86% de dano (HOY, 1986; CASAGRANDE, 1998).

2.1.5 Etiologia

O patógeno do carvão foi primeiramente descrito e identificado em 1870 (MUNDKUR, 1939) como *Ustilago sacchari* Rabenth, nome que foi originalmente atribuído a um fungo atacando as flores de *Erianthus ravennae* Beauv. no Irã (GIGLIOTI, 1993). Sydow (1924) foi o primeiro a concluir que o agente causal do carvão da cana é completamente distinto de *U. sacchari* Rabenth, chamando-o de *U. scitaminea* Sydow, um fungo da Divisão Basidiomycota, Classe Ustilaginomycetes, Ordem Ustilaginales, Família Ustilaginaceae (HAUKSWORTH et al., 1995). Recentemente o nome *Sporisorium scitamineum* foi sugerido para o fungo modificando a atual denominação (PIEPENBRING et al., 2002), mas como criou controvérsia entre os fitopatologistas do mundo todo, e a alguns trabalhos publicados após essa alteração ainda mantém a denominação anterior.

S. scitamineum, como todas as espécies do gênero *Ustilago*, é parasita de tecidos meristemáticos, penetrando por hifas dicarióticas no hospedeiro através de tecidos não diferenciados da parte basal das gemas ou pela base das primeiras folhas emergentes (TOKESHI, 1985).

Os teliósporos são unicelulares e diplóides, ocorrendo meiose na germinação. A pró-basídia, produzida na germinação, produz basidiósporos e estes, sendo

compatíveis, com mating-types opostos, formam uma hifa dicariótica ou hifas infectivas (HIRSCHHORN, 1950). As hifas infectivas não penetram nas escamas das gemas, mas crescem entre elas até atingirem a região basal interna da gema, onde fica o meristema, formando um apressório. O apressório só é formado em tecido não diferenciado (WALLER, 1970; ALEXANDER; RAMAKRISMAN, 1980).

2.1.6 O processo da infecção

As gemas representam o ponto de entrada e infecção e assim possuem um papel crucial na interação patógeno-hospedeiro. Gemas dormentes têm uma maior resistência à infecção, mas gemas em processo de brotação, têm um acesso mais fácil entre as escamas para as hifas infectivas, aumentando as chances de penetração (WALLER, 1970).

A resistência das variedades é dada por dois mecanismos distintos de defesa, pré-formados estruturais e pós-formados bioquímicos. Muitos trabalhos mostram que a morfologia da gema é um fator importante para a resistência (WALLER, 1970; PADMANABAN et al., 1988; HECTOR et al., 1992 e AMORIM et al., 2000), pois a taxa de infecção aumenta quando se remove escamas. Variedades resistentes que tiveram as suas escamas ao redor das gemas removidas, com posterior inoculação, tornam-se suscetíveis quando cana-planta, recuperando-se apenas nos próximos cortes de soqueira (AMORIM et al., 2000). Na resistência bioquímica alguns mecanismos já foram estudados. Padmanaban et al. (1988) verificou que cultivares resistentes produzem extratos capazes de inibir a germinação do teliósporo; Lloyd e Naidoo (1983) e Borrás-Hidalgo et al. (2005) encontraram uma boa correlação entre resistência e produção de flavonóides e glicosídeos.

No interior do hospedeiro, o crescimento do micélio é intercelular havendo apenas emissão de haustórios para o interior das células (ANTOINE, 1961). As hifas apresentam-se retorcidas, com grande número de grampos de conexão, que garantem a condição de dicariose. As estruturas de reprodução (teliósporos) são formadas após a diferenciação do meristema apical do hospedeiro. Quando a gema infectada de cana-de-açúcar germina, o fungo induz modificações morfológicas severas no hospedeiro, formando um apêndice escuro no ápice do perfilho, conhecido como “chicote”. Esta

estrutura de comprimento variando de alguns centímetros a mais de um metro com taxa de crescimento de 2,5 a 4,0 cm/dia (AMORIM; RICCI JR, 1987), é recoberta por teliósporos e constitui o sinal do carvão. Usualmente, o chicote começa a surgir nos canaviais 2 a 7 meses após o plantio, liberando até 100 bilhões de teliósporos em 3 meses (WALLER, 1969).

2.1.7 A variabilidade do patógeno

Comstock et al. (1983) acreditam que algumas mudanças na patogenicidade do *S. scitamineum* podem resultar em alterações nas reações varietais. Um exemplo ocorreu no Havaí, onde até 1976 apenas uma raça do patógeno era conhecida. Esta raça, nomeada de raça A, não afetava as variedades H50-7209 e H59-3775 que ocupavam 60% da área de plantio na época. Nesse ano, foi detectada uma raça, a raça B, que atacava estas duas variedades, e após dois anos, o carvão tornou-se a doença mais ameaçadora para a indústria açucareira Havaiana e variedades suscetíveis a raça B precisaram ser trocadas. As raças A e B possuem a mesma aparência do chicote, o mesmo tamanho e cor dos teliósporos, mesmo tempo de germinação, o mesmo padrão de crescimento micelial e a mesma sensibilidade ao tratamento térmico.

Leu e Tseng (1974) relataram a ocorrência de duas raças fisiológicas em Taiwan, que puderam ser diferenciadas pelas variedades NCo310 e F134. Hirschhorn e Astiz-Gasso (1988) inocularam três isolados argentinos nas variedades CP48-103, CP65-357, Tuc68-18, Tuc69-105, Tuc67-27 e POJ2878, que mostraram-se diferenciais para estes isolados.

Grisham e Hogart (2001) encontraram pequena variabilidade patogênica entre populações testando 11 variedades de 14 localidades em 10 diferentes países durante sete anos. As respostas das variedades variaram de uma localidade para outra, porém apenas em Taiwan houve indícios da existência de raças.

Estudando populações do fungo coletados no Estado de São Paulo, RAGO et al. (2009) verificou diferenças na agressividade entre essas populações quando comparadas à incidência da doença e à área sob a curva de progresso da doença.

Alguns resultados de variabilidade foram criticados por ROBINSON (1976), TOKESHI (1983, 1985) e BERGAMIN FILHO et al. (1987), pois as inoculações que deram origem aos resultados foram muito drásticas e variáveis, além de não respeitarem a ocorrência da resistência morfológica representada pelas escamas das gemas.

GLORIA et al. (1999) também consideram alguns resultados de variabilidade de *S. scitamineum* controversa e acreditam que não exista variabilidade ou que esta seja muito pequena. Isto porque essas afirmações são baseadas em trabalhos que utilizaram diferentes técnicas de inoculação em diferentes países. Ferreira e Comstock (1989) relembra que é difícil avaliar a variabilidade desse patógeno, já que a resistência ao carvão é devida a diversas características em conjunto e também é provável que seja governada por diversos genes.

Em estudos mais recentes, utilizando técnicas aprimoradas moleculares e morfológicas, Brathwaite et al. (2004) e Singh et al. (2005) analisaram 38 isolados do fungo correspondendo a 13 países produtores comerciais de cana-de-açúcar. Os resultados demonstraram uma baixa ou nenhuma variação genética, dividindo 96% de identidade nas seqüências que é um total de 17 mudanças de bases nas regiões ITS1 e ITS2. Não houve nenhuma diferença significativa entre os isolados coletados em 1985 e aqueles coletados 15 anos mais tarde na mesma área, embora os isolados de Taiwan serem 3,6% divergentes dos outros isolados. XU et al. (2004) estudando a variabilidade pela técnica molecular do RAPD, verificou que a variabilidade de isolados asiáticos poderia estar aliado a sua origem geográfica. De acordo com essa informação, Raboin et al. (2006) estudando 142 teliósporos isolados de 15 países verificou que as populações de *S. scitamineum* da África do Sul, Zimbábue, Maurício, Estados Unidos (Lousiana, Florida, Texas, Hawaii), Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela tem um baixo nível de diversidade genética. Em contraste um alto nível de polimorfismo nos isolados asiáticos de Taiwan, Tailândia e Filipinas.

2.1.8 Inoculações para testes de resistência de variedades

O carvão, além de danos diretos na produção, que acarretam severos prejuízos ao setor sucroalcooleiro, também provoca a restrição do uso de variedades suscetíveis altamente produtivas e a eliminação de grande número de clones ricos e produtivos no programa de melhoramento genético devido à suscetibilidade à doença (CASAGRANDE, 1998). Entre as medidas de controle mais eficientes estão a produção de mudas sadias a partir de viveiros e o plantio de variedades resistentes.

Dessa forma, todos os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil e diversos no mundo utilizam inoculações artificiais para a avaliação da resistência das progênies. As seleções das variedades necessitam ser executadas sob ambientes controlados e usando técnicas de inoculação que assegurem a expressão dos sintomas como ocorrem no campo, assegurando os diferentes tipos de resistência que podem interferir na suscetibilidade das variedades.

Assim, para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis, alguns parâmetros devem ser analisados e padronizados, sendo os de extrema importância: a variabilidade do patógeno, as técnicas de inoculação, as condições predisponentes para a ocorrência da infecção e a avaliação dos resultados.

As técnicas de inoculação de *S. scitamineum* variam extensivamente de acordo com o objetivo que deseja ser alcançado. As mais comumente utilizadas em programas de melhoramento são as aspersões de teliósporos (COPERSUCAR, 1995; RAGO, 2005; RAGO et al., 2009), a imersão de toletes em suspensão de teliósporos (HIRSCHHORN, 1950, WHITENEAAD, 1967, CASAGRANDE, 1998), a imersão de toletes + vácuo (HIRSCHHORN, 1950, SANGUINO; TOKESHI, 1976; TOFFANO, 1977; DEAN, 1982), a injeção de teliósporos nas gemas (WHITENEAAD, 1967, PEROS; BAUDIN, 1983), o pincelamento de pasta de teliósporos sobre as gemas com ou sem fermento (SRINIVASAN, 1969, LEU et al., 1970 e MATSUOKA et al., 1986) e a inoculação de “seedlings” (DUARTE, 1976; SILVA, 1978).

A técnica empregada deve ser escolhida criteriosamente considerando os objetivos de trabalho como descarte de progênies suscetíveis ou classificação de resistência de variedades, onde poderiam ser empregadas diferentes técnicas de

inoculação. O respeito aos mecanismos de resistência morfológicos da planta, ficam a critério do tipo de trabalho, pois Byther e Steiner (1974), Nasr (1977), Lee-Lovick (1978), Dean (1982) e Benda (1987) demonstraram haver baixa correlação entre a reação de plantas submetidas à inoculação com ferimentos e a reação de plantas no campo. O trabalho de Amorim et al. (1998) conclui que a variabilidade de resultados é menor quando usado gemas feridas, porém há perda de resistência morfológica.

As condições predisponentes para a infecção ainda permanecem obscuras e podem alterar significativamente resultados de classificação de suscetibilidade. Entre as condições predisponentes para a ocorrência da infecção podemos avaliar sob duas perspectivas: a do hospedeiro e a do ambiente.

Na perspectiva do hospedeiro, um fator que parece afetar os resultados de resistência de algumas variedades é a idade da gema que foi inoculada. Waller (1970) verificou que quanto mais jovem é a gema, maior é sua suscetibilidade à penetração do *S. scitamineum*. Esse resultado foi sustentado por Prada e Delmonte (1989), Hector et al. (1995) e Giglioti (1993). Giglioti (1993) verificou a menor quantidade de doença na primeira gema, quando comparada a segunda, a terceira e a quarta, em plantas já infectadas, atribuindo este resultado a diferença da idade ou um possível escape. Se essa condição se repete para gemas inoculadas artificialmente e se o objetivo é a classificação da suscetibilidade, é necessário conhecer a idade mais propensa infecção e colonização por *S. scitamineum*, para que possa ocorrer uma padronização. A idade da brotação também é uma variável a ser analisada, pois as gemas em processo de brotação parecem facilitar o acesso das hifas infectivas (WALLER, 1970).

Sob a perspectiva do ambiente, é necessária que as condições após a inoculação sejam favoráveis para a germinação do patógeno, produção de hifas infectivas e a infecção do hospedeiro. Para *S. scitamineum* esse período é essencial, pois além da germinação do teliósporos, há a formação do promicélio e dos basidiósporos. *S. scitamineum* só é infectivo na sua fase dicariótica, por isso entre a germinação do teliósporos e a infecção ocorrem os eventos de fusão de basidiósporos, de células promicelares ou de hifas, na qual o patógeno é muito sensível a dessecação (ALEXANDER; RAMAKRISHNAM, 1977). Dessa forma as condições ambientais são essenciais para o sucesso da infecção.

Apesar de essencial, estudos de temperatura e umidade relacionando melhores condições de infecção para *S. scitamineum* não têm sido explorados e há uma ampla variação empregada nos trabalhos. A temperatura de incubação após a inoculação varia de 25 a 32 °C (JAMES, 1973; TOFFANO, 1977; DEAN, 1982; RAGO, 2005; PEROS; BAUDIN, 1993; ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1977) de acordo com cada pesquisador. O período de umidade é bem mais variável, sendo usadas condições pós-inoculação sem câmara úmida (CASAGRANDE, 1998), câmara úmida de 24 horas (TOFFANO, 1977; PEROS; BAUDIN, 1993), por 48 horas (JAMES, 1973; DEAN, 1982), 72 horas (GIGLIOTI, 1998; RAGO, 2005) ou até 120 horas (LAMBAT, 1966).

Deve ser ressaltado que a cana-de-açúcar tem como temperatura basal para seu desenvolvimento a faixa entre 20 e 38 °C, com ótimo entre 22 a 30°C (BARBOSA, 2005) enquanto a faixa de temperatura que favorece a infecção é mais estreita, pois para a germinação dos teliósporos a temperatura favorável é de 17 a 35 °C e para a produção de basidióporos de 23 a 32 °C (COPERSUCAR, 1987; BERGAMIN FILHO et al., 1987).

2.1.9 Diagnóstico da doença

A introdução de plantas no Brasil tem sido e continuará sendo uma das fontes poderosas para o desenvolvimento da agricultura nacional. A maioria dos cultivos econômicos em exploração no país resultou de introduções bem sucedidas. A quarentena de plantas é uma atividade que visa excluir de uma região ou país, pragas e enfermidades de significativa importância para a agricultura. Assim, a quarentena deve ser encarada como uma das facetas nos programas nacionais de controle ou manejo integral de pragas e doenças. As suas ações são baseadas em atos legislativos e em procedimentos técnicos, cuja eficácia depende fundamentalmente da existência de pessoal treinado e de estrutura operacional adequada. O serviço de quarentena também deve envolver uma ativa cooperação de toda comunidade, na medida em que as restrições impostas pela legislação sejam devidamente aceitas e acatadas integralmente (ROCHA, 1985).

Para a introdução de gemas de cana-de-açúcar no Brasil é necessário, além de toda a documentação dos países envolvidos, instituições que possuam casas de

vegetação quarentenárias com compartimentos para a acomodação dos grandes vasos, com pé direito alto para todo o ciclo da cultura, com mão-de-obra especializada e com o diagnóstico de patógenos presentes no país ou exóticos. Para a cana-de-açúcar, o período ideal de quarentena, é de cerca de 2 anos, o que torna extremamente dispendioso a importação desse material. Atualmente medidas que possam reduzir o tempo de permanência das plantas nas casas de vegetação quarentenária são testadas para a redução dos custos. Uma das formas de reduzir esse tempo é utilizar técnicas que possam antecipar os resultados das doenças, ou seja, obter o diagnóstico antes do aparecimento dos sintomas. Muitas técnicas não são capazes de reproduzir em níveis desejáveis os mesmos resultados, e aí não satisfazem os requerimentos de uma quarentena, cujo limite de tolerância em relação à contaminação por patógenos deve ser zero. Estudos de diagnósticos para doenças que possuem um longo período de carência a antecipação dos resultados pode representar uma economia considerável de tempo, além da confiabilidade.

O carvão é uma doença de longo período de latência, podendo variar de 2 a 7 meses e como já mencionado anteriormente, a presença de chicotes permite a diagnose segura da doença (TOKESHI; RAGO, 2005). Apenas em alguns casos, antecedendo o aparecimento do chicote, a infecção muda o hábito de crescimento do hospedeiro e os perfilhos adquirem forma estiolada e ereta, com internódios curtos e finos, que conferem a algumas touceiras infectadas um aspecto de capim (GIGLIOTI, 1993). Obter um diagnóstico antecipado para o carvão é um grande passo para a redução do período de quarentena.

O uso de técnicas moleculares para diagnósticos de doenças de plantas vem crescendo dia-a-dia, especialmente a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por sua simplicidade, rigor, elevada especificidade e sensibilidade (SOUZA, 2001).

Após uma revisão de literatura foi possível verificar que havia apenas um par de iniciadores específicos relatados para *S. scitamineum* (ALBERT; SCHENCK, 1996).

Em 1998, Schenck utilizou esses iniciadores de uma forma prática, testando-os em plantas infectadas com o fungo. Inicialmente foram testados apenas os DNA do *S. scitamineum* e da planta sadia, extraídos separadamente, e após extração misturados.

A sensibilidade deste teste foi de 1:2.000 de DNA de fungo para DNA de planta, o que foi considerado pela autora um bom resultado, prosseguindo o teste de plantas doentes. Para a obtenção de plantas doentes, foram inoculadas gemas da variedade H50-2035, que é extremamente suscetível ao carvão, de forma a apresentar próximo a 100% de incidência da doença. Como foi utilizado o meristema para fazer o diagnóstico, as amostras eram destrutivas, não sendo possível a comparação da detecção da PCR com o aparecimento de chicotes no campo. Os resultados foram comparados por microscopia, mas ocorreram casos de falso positivo e falso negativo, mas mesmo assim o teste funcionou com mais rigor do que a detecção por microscopia pela opinião da autora. Nesse trabalho foi visto que é possível fazer a detecção do carvão antes do aparecimento dos sintomas e sinais, porém são necessários ajustes e utilizar uma metodologia em que seja comparável com os sintomas e sinais em plantas.

Com esses mesmos iniciadores Singh et al. (2004) detectaram o fungo causador do carvão em plantas de cultura de tecidos inoculadas após 12 horas da inoculação e também concluíram que a técnica de detecção por PCR foi significativamente melhor que a detecção por cortes microscópicos. Apesar desse trabalho mostrar bons resultados em pouquíssimo tempo, não foram tomados cuidados necessários para a não detecção dos teliósporos inoculados, que poderiam servir como uma contaminante da amostra resultando em falsos positivos, não detectando a infecção da planta, propriamente dita.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Produção do inóculo

Foi utilizado como inóculo teliósporos dos chicotes de carvão. Os chicotes foram coletados em três regiões produtoras de cana do Estado de São Paulo, Piracicaba, Jaú e Ribeirão Preto. De cada região foram coletados, em média, 20 chicotes, um por touceira, de 5 variedades comerciais diferentes, eliminando uma possível variabilidade. Após a coleta, os chicotes foram embrulhados em papel de jornal, levados ao laboratório e secos a temperatura ambiente o tempo suficiente para posteriormente realizar a extração dos teliósporos por meio de raspagem. A massa obtida foi peneirada para a retirada de resíduos vegetais e armazenadas em sacos de papel permeável em

vidros com sílica-gel a temperatura de 5 a 10 °C conforme recomendações de Mata (1975).

2.2.2 Determinação da viabilidade dos teliósporos e preparo de inóculo

Por ocasião das inoculações foi calculada a viabilidade dos teliósporos mediante testes de germinação em ágar-agua. Foi feito uma suspensão de teliósporos com a adição de um espalhante adesivo na concentração de 0,01% e uma alíquota de 60 µl foi espalhada em placas de Petri com meio ágar-agua com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Foram incubados a 27 °C no escuro por 8 horas. Após esse período, foi adicionado a placa, lactofenol para paralisação da germinação. Foram contados 100 teliósporos de quatro placas diferentes. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação. De acordo com a viabilidade dos teliósporos, foi calculada a massa, em gramas, de teliósporos necessária por litro de água destilada para que a suspensão ficasse com uma concentração de 10^6 teliósporos viáveis/ml. À essa suspensão foi acrescentado um espalhante adesivo para a homogeneização. A concentração das inoculações foi corrigida a partir da porcentagem de germinação ao longo das inoculações.

2.2.3 Variedades de cana-de-açúcar

As variedades utilizadas nos experimentos variaram em algumas ocasiões, pois eram dependentes da disponibilidade de material sadio em campo. A cada item será mencionado as variedades utilizadas. Todas as variedades utilizadas nos experimentos são classificadas historicamente como suscetíveis ou intermediárias a carvão, a saber:

Variedade	Classificação
SP70-1143	Intermediária
SP71-1406	Intermediária
SP79-1011	Intermediária
SP79-2312	Intermediária
SP80-185	Intermediária
SP84-2066	Suscetível
SP86-155	Intermediária
IAC66-6	Suscetível
RB72-454	Intermediária
NA56-79	Intermediária
NA96-2929	Suscetível
NA89-1090	Suscetível
NA84-3013	Intermediária
NA78-724	Intermediária
NA76-128	Intermediária
SL88-116	Intermediária
C11179	Intermediária

Fonte: Relatório Técnico CTC – Fitotestes

2.2.4 Inoculações

As gemas utilizadas para inoculação foram provenientes de plantas sadias cultivadas em viveiro, com aproximadamente 12 meses de idade. As inoculações seguiram a metodologia utilizada pelo programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (COPERSUCAR, 1995), onde a suspensão de teliósporos na concentração de 10^6 teliósporos viáveis/ml com a adição de espalhante adesivo na concentração 0,01% era aspergida sobre as gemas individuais dispostas para cima em recipientes plásticos e estes recipientes foram submetidos aos tratamentos.

2.2.5 Condições pós-inoculações: temperatura, umidade e período de incubação

Logo após as inoculações com teliósporos, as gemas foram levadas para uma câmara de vegetação com controle de temperatura e umidade. As temperaturas foram estudadas a partir das faixas de temperatura para desenvolvimento da cana-de-açúcar

e da germinação dos teliósporos. As temperaturas selecionadas para o experimento foram 25 °C, 28 °C e 32 °C.

Na câmara de vegetação foi realizado o controle de umidade ambiente. As umidades testadas foram 65%, 80% e 95%, aliadas as temperaturas já citadas acima. Para a confirmação da temperatura e da umidade, os valores foram registrados por termohigrógrafos que foram acompanhados diariamente durante a realização dos testes.

Para a formação dos tratamentos as temperaturas e umidades foram combinadas e aliadas ao período de incubação nessas condições. Foram escolhidos três períodos de incubação, 24 horas, 48 horas e 96 horas. Essa combinação resultou em 27 tratamentos num esquema 3x3x3. Este experimento foi realizado utilizando as variedades: NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066, com quatro repetições de 14 plantas por tratamento.

Após o término deste experimento foram selecionados os sete melhores tratamentos e repetidos no ano seguinte utilizando as variedades: NA56-79, SP71-1406, SP84-2066, SP79-2312 e IAC66-6. Neste experimento foram utilizadas quatro repetições de 28 plantas, totalizando 112 plantas por tratamento.

2.2.6 Plantio do hospedeiro e condução dos ensaios

Após os tratamentos as gemas inoculadas foram colocadas bandejas plásticas de 28 células com nichos de capacidade de 300ml sobre o substrato Plantmax®. As bandejas foram dispostas em casa de vegetação. A irrigação foi freqüente, fazendo-a sempre que necessária, deixando o solo próximo à capacidade de campo. Durante o experimento foram necessários tratos culturais e cuidados fitossanitários comumente empregados para o bom desenvolvimento das plantas, como manejo de plantas invasoras, controle de pulgões e ácaros e adubações.

2.2.7 Avaliações

O critério para avaliar a infecção foi a produção de sintomas e sinais, especialmente os chicotes. Na maioria das vezes, não foi possível detectar as plantas doentes sem o aparecimento dos chicotes. Logo após a exibição dos chicotes, as plantas foram eliminadas. As avaliações ocorreram semanalmente após o plantio e se prolongaram até os 170 dias após a inoculação.

Os dados foram anotados, transformados em porcentagem de infecção (incidência de doença) e corrigidos pela brotação das plantas testemunhas. Como o tratamento poderia interferir na brotação das plantas, o número de gemas brotadas na testemunha de cada tratamento foi considerado o número de brotação máxima e esse valor foi utilizado para fazer a correção da incidência.

Cada tratamento teve a sua testemunha correspondente, sendo estas inoculadas apenas com água. A testemunha serviu como padrão de germinação das gemas de cada variedade e caso houvesse infecção natural do material.

2.2.8 Teste da idade do hospedeiro: idade das gemas

Para testar experimentalmente a diferença de suscetibilidade correlacionada com idade fisiológica das gemas, estas foram individualizadas e divididas em três idades diferentes. Para isso as plantas utilizadas para inoculação estavam próximas de 12 meses pós-plantio, das variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066. Os colmos foram divididos em terço inferior, terço médio e terço superior, o que correspondeu a gemas velhas, medianas e novas, respectivamente. Grupos de gemas com as idades fisiológicas mencionadas foram inoculados com teliósporos de acordo com o método citado anteriormente nos itens 3.4. As gemas foram incubadas a temperatura de 28 °C e 65% de umidade por um período de 24 horas, plantadas e mantidas em casa de vegetação para posterior avaliação. A avaliação foi realizada como em 3.7. Foram utilizadas 112 gemas por tratamento, divididas em 4 repetições de 28 plantas. As testemunhas corresponderam em gemas não inoculadas.

2.2.9 Teste da idade do hospedeiro: pré-brotação das gemas

Para correlacionar a idade da brotação com a suscetibilidade, as gemas individualizadas das variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066 foram colocadas para brotação e permaneceram por 0, 1, 4, 6, 8 e 10 dias. Após os períodos mencionados, as gemas foram inoculadas com teliósporos como em 3.4 e mantidas como em 3.9. A avaliação foi realizada como em 3.7. Foram utilizadas 112 gemas por tratamento, divididas em 4 repetições de 28 plantas. As testemunhas corresponderam em gemas não inoculadas.

2.2.10 Concentração do inóculo

Para os experimentos de concentração de inóculo, gemas individualizadas das variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066 foram aspergidas com teliósporos nas concentrações de 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 teliósporos viáveis/ml. Após esses tratamentos as gemas foram mantidas nas mesmas condições citadas em 3.10.1. A avaliação foi realizada como em 3.7. Foram utilizadas 112 gemas por tratamento, divididas em 4 repetições de 28 plantas. As testemunhas corresponderam em gemas não inoculadas.

2.2.11 Teste do tipo de inoculação

Para o teste de tipos de inoculação foram comparados os métodos da aspersão e da inoculação com ferimento. Neste experimento foram utilizadas as variedades NA56-79, RB72-454, SP70-1143, SP79-1011, SP80-185 e SP86-155 com quatro repetições de 28 plantas. O método do ferimento consistiu em depositar uma gota de 40ul do inóculo a concentração de 10^6 teliósporos viáveis/ml sobre as gemas e em seguida perfurar, no centro da gota, a gema, com um alfinete entomológico. Após esses procedimentos gemas foram mantidas a temperatura de 28°C e umidade relativa de 65% por 24 horas. As avaliações foram realizadas como em 3.7. As testemunhas consistiram em gemas inoculadas com água para comparação do tratamento da aspersão e gemas perfuradas com água para comparação do tratamento da aspersão

com fermento. Foram utilizadas 112 gemas por tratamento, divididas em 4 repetições de 28 plantas.

2.2.12 Delineamento estatístico

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado na câmara de vegetação e o de blocos casualizados na casa de vegetação. Foram utilizadas quatro repetições de números diferentes de plantas por experimento. As mesmas condições sempre foram empregadas para as testemunhas.

2.2.13 Teste dos iniciadores específicos bE4 e bE8

Como não foram encontrados métodos de extração de DNA plantas de cana-de-açúcar infectadas com carvão, apenas o usado no teste dos iniciadores específicos de *S. scitamineum*, bE4 e bE8 descritos por Albert e Schenck (1998), foram testadas as extrações de DNA Saghai-Marooof (1984) usada por Albert e Schenck (1998) e as extrações universais TNES (MARTINS; BACCI, 2000) e Dellaporta modificada (DELLAPORTA, 1983).

Para todas as extrações as amostras foram acondicionadas em tubos de centrífuga e de microcentrífuga estéreis e as soluções foram esterilizadas por filtração. Na extração de Saghai-Marooof foram adicionados 15ml do tampão de extração (Tris-HCl 0,5M pH8,0; 0,7M de NaCl, 10mM de EDTA, 1% de CTAB; 0,1% de β -Mercaptoetanol) para a maceração do tecido. Os tubos foram incubados a 60 °C por uma hora e invertidos nesse período por 2 a 3 vezes. Foram adicionados 10ml de clorofórmio/octanol (24:1) e misturados por inversão. Os tubos foram centrifugados a 5.100g por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para outro novo tubo e foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente, centrifugados a 5.100g por 10 minutos e descartado o sobrenadante. Foram adicionados 20ml de etanol/ NH_4OAc e incubados por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 5.100g por 10 minutos e descartados o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 1,5ml de NH_4OAc /EDTA.

Para a extração TNES foram adicionados ao tubo contendo as amostras 600ul do tampão de extração TNES (Tris-HCl 0,25M, NaCl 2M, EDTA 01,M, SDS 25% pH7,5). As amostras foram maceradas com pistilos de vidro autoclavados. Após esse procedimento, os tubos foram incubados a 55 °C na presença de proteinase K por 3 horas. Foram adicionados 200ul de NaCl 5M e agitados em vortex para posterior centrifugação a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi colhido e colocado num novo tubo de microcentrífuga já contendo 600ul de isopropanol a -20 °C. Estes foram invertidos gentilmente e centrifugados a 12.000g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 600ul de etanol 70%. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000g por 3 minutos, descartado o sobrenadante, esperou-se secar o precipitado e foi adicionado 30ul de tampão TE.

Para a extração Dellaporta modificada foi adicionado a amostra 500ul de tampão Dellaporta (SDS 20% (p/v), NaCl 5M, Tris-HCl 1M pH8,0; EDTA 2Na 0,5M pH8,0) e macerado o tecido com um pistilo de vidro autoclavado. Após esse procedimento foram adicionados aos tubos 33ul de SDS 20% e incubados por 10 minutos a 65 °C. Foi adicionado 160ul de acetato de potássio 5M por tubo e agitados em vortex. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos e coletou o sobrenadante num novo tubo estéril. Ao sobrenadante foi adicionado 300ul de isopropanol 4 °C e os tubos foram invertidos gentilmente para a precipitação do DNA. Segui-se uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados aos tubos 300ul de etanol 75% a 4 °C e centrifugados a 12.000g por 5 minutos. Foi descartado o etanol, esperou-se secar o precipitado e este foi ressuspenso com 50ul de água Milli-Q.

Foram realizados os três tipos de extrações para teliósporos, meristemas infectados, folhas infectadas e folhas saudas. As extrações foram avaliadas quanto a concentração de DNA, integridade e pureza em gel de agarose 1% por eletroforese. Após conferir esses parâmetros, foi realizada uma reação com os iniciadores bE4 e bE8 como descrito em Albert e Schenck (1998), para selecionar o melhor método de extração de DNA.

2.2.14 Isolamento dos endofíticos e teste de especificidade dos iniciadores bE4 e bE8

Os iniciadores foram testados quanto a sua especificidade, pois existem diversos fungos endofíticos que convivem no mesmo nicho que *S. scitamineum* e que poderiam causar falsos positivos na reação caso houvesse uma compatibilidade. Para isto, foram realizados isolamentos como descrito em Stuart (2006) nas variedades do teste, NA 56-79, SP 71-1406 e SP 84-2066. Foram colhidas amostras das folhas e meristemas aos 30, 100 e 120 dias após a brotação de plantas sadias e plantas que apresentavam chicote.

Após o isolamento em ágar-água, os fungos foram identificados com base na morfologia (NELSON et al., 1927, BARNETT; HUNTER, 1982, HANLIN, 1989) e multiplicados em meio de cultura BDA por no mínimo, uma semana. Após esse período foram colhidos o micélio aéreo dos isolados que tiveram seu DNA extraídos pelo método Dellaporta (DELLAPORTA, 1983). O DNA foi utilizado como amostra para a reação com os iniciadores bE4 e bE8. A reação foi realizada como descrito em (ALBERT; SCHENCK, 1996) com a temperatura de anelamento alterada para 54 °C. Como controle positivo foi utilizado o DNA de teliósporos extraídos, os mesmos teliósporos que eram utilizados para as inoculações das gemas e como controle negativo DNA de plantas sadias. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corrente de 120V por 45 minutos.

2.2.15 Teste de detecção em plantas: folhas e meristemas de plantas inoculadas

Para testar os iniciadores em plantas que ainda não apresentavam sintomas foi necessária a condução de ensaios específicos de inoculação de gemas. Gemas das variedades NA56-79, SP71-1406 e SP84-2066 foram inoculadas como em 3.4. Foram coletadas cinco amostras de folhas e cinco amostras dos respectivos meristemas dessas plantas nas datas 2, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a inoculação. Nota-se que as plantas não eram as mesmas, já que com a coleta do meristema, a amostragem tornava-se destrutível. Essas amostras tiveram seus meristemas extraídos

pelo método Dellaporta e estes serviram como *template* para a reação de PCR com os iniciadores bE4 e bE8.

2.2.16 Teste de detecção em meristemas de cultivo “*in vitro*”

Foram extraídos meristemas das variedades NA 56-79, SP 71-1406, SP 84-2066 e IAC66-6. Após a extração, com uma agulha para aplicação de insulina *Ultra Fine*, foi injetada 5ul de uma suspensão de teliósporos na base do meristema. O meristema foi lavado em água estéril para remoção de teliósporos que estivessem na superfície e imediatamente colocados em frascos de cultura de tecidos com meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As culturas foram mantidas em sala com controle de temperatura a 28 °C, fotoperíodo de 12h e outras condições ideais de crescimento de explantes. Após 15 e 30 dias de cultivo, os explantes foram triturados e cada um serviu como uma amostra para a extração de DNA pelo método Dellaporta. Estes serviram como *template* para a reação de PCR com os iniciadores bE4 e bE8.

2.2.17 Desenvolvimento de iniciadores específicos Hs e Ha

O desenvolvimento dos iniciadores específicos foi feito pela pesquisadora do IAC Haiko Enok Sawazaki. As regiões selecionadas foram parte do “*Internal Transcribed Spacer 1*” (ITS1), o gene 5,8S do RNA ribossomal e parte do “*Internal Transcribed Spacer 2*” (ITS2). O programa utilizado foi “*Primer*”: versão 2. As seqüências foram selecionadas no GenBank e após a seleção foi realizado o BLAST para todas as seqüências depositadas e selecionado os melhores conjuntos de *primers* Hs e Ha, que foram enviados para a síntese.

2.2.18 Teste de especificidade dos iniciadores Hs e Ha

Para o teste de especificidade os fungos isolados citados em 3.15 foram utilizados para assegurar que outras espécies de fungos presentes na cana-de-açúcar não tivessem reações cruzadas com os iniciadores Hs e Ha. As reações foram realizadas como descritas em 3.18 e analisadas por eletroforese em gel de agarose.

2.2.19 Teste de sensibilidade dos iniciadores Hs e Ha

Para o teste de sensibilidade dos iniciadores, o DNA extraído dos teliósporos foi utilizado na reação nas seguintes proporções: puro, 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000, 1:25.000, 1:100.000, 1:250.000 e 1:800.000 diluídos em água estéril ultra pura. As concentrações de DNA das proporções foram analisadas no espectrofotômetro *Nanodrop 8.000®*. Nas mesmas concentrações foram adicionados DNA de planta sadia e repetidas as reações, que foram realizadas como em 3.18 e analisadas por eletroforese em gel de agarose.

2.2.20 Teste de detecção em meristemas de cultivo “*in vitro*”

As amostras de meristemas cultivados “*in vitro*” citadas em 3.17 foram utilizadas para uma comparação entre as reações de PCR geradas pelos iniciadores específicos bE4 e bE8 e Hs e Ha.

2.2.21 Teste de detecção em folhas de plantas sintomáticas

Apesar do fungo *S. scitamineum* causar infecção sistêmica, este pode estar distribuído de forma desuniforme pelas folhas e por esse motivo, alguns testes foram necessários conhecer a distribuição deste pelas folhas. Para isto, plantas que exibiam chicotes tiveram suas folhas seccionadas e divididas em: idade fisiológica (-2, -1, 0, +1 e +2), onde a folha +1 corresponde a primeira lígula visível, seções (próxima à bainha, porção mediana e ponta da folha), tipo de tecido (limbo foliar e nervura). Essas divisões foram desinfestadas superficialmente com álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e água estéril. Após esse procedimento foram utilizadas para a extração de DNA pelo método Dellaporta, os quais serviram como *template* para a reação de PCR com os iniciadores específicos Hs e Ha.

2.2.22 Teste de detecção em plantas inoculadas assintomáticas

Para testar os iniciadores em plantas que ainda não apresentavam sintomas foi necessária mais uma condução de ensaios específicos de inoculação de gemas. Gemas das variedades NA 56-79, SP 71-1406, SP 79-2312, SP 84-2066, IAC 66-6 foram inoculadas como em 3.4, perfazendo um total de 200 plantas. Plantas das

variedades NA 76-128, NA 78-724, NA 84-3013, NA 89-1090, NA 96-2929, SL 88-116, C 11179 e SP 84-2066, que já apresentavam chicotes no campo, serviram como fontes de gemas doentes para a montagem de outro ensaio. Essas gemas geraram 420 plantas.

Todas as plantas tiveram a folha +1 coletada aos 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias após o plantio para a extração de DNA pelo método Dellaporta. Estes serviram como *template* para a reação de PCR com os iniciadores específicos Hs e Ha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 180 dias e foram avaliados os sintomas a cada dois dias. Quando uma planta apresentava o chicote, ela era imediatamente retirada da casa de vegetação e anotada a data de aparecimento do chicote.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Produção do inóculo e viabilidade

Plantas que apresentavam chicote foram coletados de três regiões produtoras de cana-de-açúcar para eliminar uma possível variabilidade como sugerido por Rago et al. (2009). Utilizando o método de armazenamento de Mata (1975) foi possível permanecer com a mesma coleta de teliósporos viáveis para a inoculação por 3 anos. A redução da viabilidade foi gradual, menos no terceiro ano após a coleta, em que o inóculo teve uma brusca queda de germinação, de 82% para 48%. Após essa redução, novo material foi colhido e este serviu como inóculo para o último experimento de validação dos iniciadores específicos. A troca do material não interferiu nas inoculações, já que se manteve o mesmo índice de infecção esperado quando comparado aos outros experimentos. Isto mostra que o método de Mata (1975) é indicado para o armazenamento de materiais para experimentos de testes de variedades em Programas de Melhoramento Genético.

2.3.2 Condições de pós-inoculação na brotação das gemas de cana-de-açúcar

Como as condições de temperatura, umidade e período de incubação as quais os tratamentos foram submetidos após as inoculações podem afetar o desenvolvimento da cana-de-açúcar reduzindo a brotação, foram realizadas contagens de plantas para eliminar o efeito do tratamento. Esses dados encontram-se na tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Brotação das gemas sadias e inoculadas com teliósporos de *S. scitamineum* submetidas a diferentes tratamentos de temperatura e umidade por diferentes períodos de incubação (continua)

Tratamentos	(%) Brotação Gemas Sadias			(%) Brotação Gemas Inoculadas		
	Variedades			Variedades		
	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066
32 °C, 95 %, 24 h	100 ^a	98,21ab	100a	76,78cd	100a	10 0a
32 °C, 95 %, 48 h	98,21ab	100a	100a	89,28bc	92,85b	85,71bc
32 °C, 95 %, 96 h	26,0g	27,0g	27,0e	0i	0j	0i
28 °C, 95 %, 24 h	71,42e	96,42ab	96,42ab	23,21fg	0j	0i
28 °C, 95 %, 48 h	44,64f	100a	76,78c	10,71h	32,14f	37,50f
28 °C, 95 %, 96 h	66,07ef	100a	55,31d	42,85e	32,14f	14,28g
25 °C, 95 %, 24 h	100 ^a	100a	100a	100a	100a	100a
25 °C, 95 %, 48 h	100 ^a	100a	91,07b	82,14c	98,21ab	7 3,21d
25 °C, 95 %, 96 h	89,28c	91,07b	98,21ab	46,42e	73,2 1c	73,21d
32 °C, 80 %, 24 h	100 ^a	100a	100a	82,14c	100a	89,28b c
32 °C, 80 %, 48 h	100 ^a	100a	100a	85,71c	98,21ab	98, 21ab
32 °C, 80 %, 96 h	91,07bc	96,42ab	91,07b	51,78cde	0	42,85ef
28 °C, 80 %, 24 h	91,07bc	100a	91,07b	60,71d	100a	5 5,35e
28 °C, 80 %, 48 h	91,07bc	100a	71,42c	39,92f	55,35e	14,28g
28 °C, 80 %, 96 h	94,64b	85,71c	30,35e	16,07fgh	14, 28g	0
25 °C, 80 %, 24 h	100 ^a	100a	100a	89,28bc	98,21ab	10 0a
25 °C, 80 %, 48 h	35,71fg	46,42e	14,28ef	14,26fgh	8 ,92gh	7,14gh
25 °C, 80 %, 96 h	8,92h	46,42e	17,85ef	0i	1,78i	0i
32 °C, 65%, 24 h	0i	0h	0g	0i	0j	0i
32 °C, 65%, 48 h	0i	0h	0g	0i	0j	0i
32 °C, 65%, 96 h	0i	0h	0g	0i	0j	0i

Tabela 1 - Brotação das gemas sadias e inoculadas com teliósporos de *S. scitamineum* submetidas a diferentes tratamentos de temperatura e umidade por diferentes períodos de incubação (conclusão)

Tratamentos	(%) Brotação Gemas Sadias			(%) Brotação Gemas Inoculadas		
	Variedades			Variedades		
	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066
28 °C, 65 %, 24 h	100a	85,71c	98,21ab	98,21ab	83,92 c	96,42b
28 °C, 65 %, 48 h	89,28c	78,77cd	10,71f	67,25d	71,4 2cd	7,14gh
28 °C, 65 %, 96 h	32,14fg	71,42d	91,07b	17,85fgh	60,71de	42,85ef
25 °C, 65 %, 24 h	85,71d	44,64ef	0g	7,14h	0j	0i
25 °C, 65 %, 48 h	46,42f	35,71f	0g	0i	0j	0i
25 °C, 65 %, 96 h	0i	0h	0g	0i	0j	0i

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Transformação arco seno de x/100. Análise por coluna. CV 6,21.

De acordo com esses resultados, podemos observar que o tratamento que promoveu uma maior brotação das gemas sadias e inoculadas foi o de 25 °C, 95% de umidade por 24 horas de incubação, proporcionando completa brotação de todos os tratamentos.

O fator que mais interferiu na brotação das gemas foi o período de incubação. O período de 24 horas favoreceu a brotação, igualmente para o período de 48 horas para alguns tratamentos e o de 96 horas sempre foi o que mais inibiu a brotação.

A diferença entre as brotações sadias e inoculadas é ocasionada pelo fungo já que esta é a diferença entre os tratamentos e em alguns tratamentos, o patógeno inviabilizou completamente a brotação, provavelmente porque a infecção foi maior. Apesar da infecção ser maior nesses tratamentos, pois deve ser muito drástico, favorecendo o patógeno e desfavorecendo a brotação da planta, é impossível a avaliação por sintomas, o que torna-os inviáveis da utilização para comparação. É claro que esses tratamentos devem ser analisados em conjunto com os dados de incidência, porém apenas como o tratamento afeta a fisiologia da planta já dá um indício se as condições são adequadas para a inoculação. Dessa forma, os melhores tratamentos foram aqueles que apresentaram menos interferência na brotação de gemas sadias, aliados aqueles de menor interferência na brotação das gemas inoculadas, como: 32

℃, 95 %, 24 h; 32 ℃, 95 %, 48 h; 25 ℃, 95 %, 24 h; 25 ℃, 95 %, 48 h; 25℃, 80%, 24 h; 28 ℃, 65 %, 24 h; 32 ℃, 80 %, 24 h e 32 ℃, 80 %, 48 h.

Com esses dados pode ser observado que o longo período de incubação, especialmente em temperaturas mais altas, é prejudicial para a brotação da cana-de-açúcar, e mais aparente nas gemas inoculadas. Alguns trabalhos sugerem muitas horas de incubação como 72 horas de incubação (GIGLIOTI, 1998, RAGO, 2005) e até 120 horas (LAMBAT, 1966), porém nestes não foram realizadas contagens de brotação. não sendo possível fazer inferências se o tempo de incubação também interferiu no índice de brotação.

2.3.3 Condições de pós-inoculação na incidência de carvão

Os resultados dos dois experimentos realizados com diferentes temperaturas, umidades e períodos de incubação na pós-inoculação das gemas estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Incidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação. Experimento safra 2006-07 (continua)

Tratamento	Incidência média (%)					
	NA56-79		SP71-1406		SP84-2066	
32 ℃, 95 %, 24 h	4,70	bcd	3,56	BC	5,34	bc
32 ℃, 95 %, 48 h	0	d	3,99	BC	3,99	bc
32 ℃, 95 %, 96 h	0	d	0	C	0	c
28 ℃, 95 %, 24 h	0	d	0	C	1,77	c
28 ℃, 95 %, 48 h	0	d	0	C	12,50	b
28 ℃, 95 %, 96 h	0	d	8,91	BC	43,68	a
25 ℃, 95 %, 24 h	3,56	cd	0	C	8,92	bc
25 ℃, 95 %, 48 h	4,76	bcd	4,94	BC	3,60	bc
25 ℃, 95 %, 96 h	0	d	0	C	6,43	bc
32 ℃, 80 %, 24 h	5,34	bcd	5,41	BC	7,43	bc
32 ℃, 80 %, 48 h	0	d	3,56	BC	0	c
32 ℃, 80 %, 96 h	6,25	bcd	0	C	3,56	bc
28 ℃, 80 %, 24 h	10,35	b	5,34	BC	0	c

Tabela 2 - Incidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação. Experimento safra 2006-07 (conclusão)

Tratamento	Incidência média (%)		
	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066
28 °C, 80 %, 48 h	5,34 bcd	5,34 BC	0 c
25 °C, 80 %, 24 h	3,56 cd	0 C	0 c
25 °C, 80 %, 48 h	0 d	7,48 BC	0 c
25 °C, 80 %, 96 h	0 d	0 C	5,12 bc
32 °C, 65%, 24 h	0 d	0 C	0 c
32 °C, 65%, 48 h	0 d	0 C	0 c
32 °C, 65%, 96 h	0 d	0 C	0 c
28 °C, 65 %, 24 h	24,06 a	33,63 A	5,34 bc
28 °C, 65 %, 48 h	5,34 bcd	17,38 B	8,91 bc
28 °C, 65 %, 96 h	8,91 bc	17,34 B	0 c
25 °C, 65 %, 24 h	5,34 bcd	0 C	0 c
25 °C, 65 %, 48 h	0 d	0 C	0 c
25 °C, 65 %, 96 h	0 d	0 C	0 c

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Análise por coluna. C.V. 12,8.

Tabela 3 - Incidência média do carvão da cana-de-açúcar quando as gemas foram submetidas às diferentes condições de pós-inoculação. Experimento safra 2008-09

Tratamento	Incidência média (%)				
	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066	SP79-2312	IAC66-6
32 °C, 95 %, 24 h	15,4bc	8,4c	35,8a	3,2a	7,4d
32 °C, 80 %, 24 h	7,4d	10,9bc	21,5b	0b	19,3b
28 °C, 80 %, 24 h	20b	10,8bc	14,3bc	3,4a	12,5c
28 °C, 65 %, 24 h	25a	14,9a	14,3bc	3,2a	28,0a
28 °C, 65 %, 48 h	11,2cd	7,2c	11,2c	0b	3,7e
25 °C, 95 %, 24 h	3,4e	0d	3,6d	0b	8,0d
25 °C, 95 %, 48 h	11,6c	0d	3,7d	0b	4,2e

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Análise por coluna. CV 7,69.

O melhor tratamento nos ensaios da safra 2006-07, isto é, os tratamentos que mais produziram plantas infectadas, foram coincidentes para as variedades NA 56-79 e SP 71-1406, que foi 28 °C, 65% de umidade por um período de 24 horas. Este

tratamento proporcionou índices de infecção que variaram de 5,34 a 33,63%. Para a variedade SP 84-2066 o melhor tratamento foi o de 28 °C, 95% de umidade por 96 horas que garantiu 43,68% de infecção. É interessante notar que os tratamentos de alta umidade aliados a longos períodos foram as piores combinações de tratamentos para as brotações das gemas, ou seja, tinham grande influência negativa na brotação, mas no caso dessa variedade parece ter influenciado mais na infecção que na brotação.

Para os ensaios da safra 2008-09 foram selecionados os sete melhores tratamentos baseados em melhores porcentagens de infecção e de brotação de gemas. Além disso, foram inoculadas mais duas variedades para aumentar o grau de confiabilidade dos resultados.

Neste ensaio o tratamento 28 °C, 65% de umidade por um período de 24 horas continuou se destacando para as variedades NA56-79 e SP71-1406 e também mostrou-se melhor para as variedades SP79-2312 e IAC66-6, com índices de infecção variando de 3,2 a 28,0%. Para a variedade SP84-2066 o melhor tratamento foi o de 32 °C, 95% de umidade por 24 horas, que proporcionou 35,8% de gemas infectadas, confirmando que a alta umidade favorece a infecção nessa variedade.

Cardoso et al. (1986) verificou que a não padronização das condições de pós-inoculação poderiam gerar dados discrepantes, como no caso da variedade NA56-79 em que em um único experimento variou a incidência de 0 a 40%.

Apesar dos dados desse trabalho ser conflitantes com aqueles encontrados por Byther e Steiner (1973) que verificaram que a temperatura no período de pós-incubação não apresentou nenhum efeito na incidência da doença Bock (1964) sugeriu que as condições de pos inoculação e incubação deveriam ser padronizadas e mantidas constantes e faz uma indica a utilização de 31°C. A constatação de Byther e Steiner (1973) pode ter sido devido a uma altíssima suscetibilidade da variedade selecionada ou mesmo os parâmetros avaliados foram coincidentes.

Em experimentos de temperatura Anon. (1976) verificou a incidência de chicotes plantando gemas infectadas da variedade H49-3335 nas temperaturas de 22, 26, 30 e 34°C. A maior incidência foi verificada na temperatura mais alta. Como as gemas não foram inoculadas, ou seja, as gemas eram provenientes de plantas infectadas a

temperatura certamente não estava vinculada a infecção e sim a colonização dos tecidos.

2.2.4 Idade dos hospedeiros

As diferenças de suscetibilidade nas três idades diferentes de gemas estão apresentadas na tabela 4. De acordo com esses resultados podemos observar que existem diferenças estatísticas entre a incidência de carvão nas diferentes idades de gemas de acordo com a variedade testada. As variedades NA56-79 e SP71-1406 comportaram-se semelhantes, as gemas mais novas foram mais suscetíveis que as outras idades, enquanto as gemas medianas e velhas obtiveram o mesmo resultado.

A variedade SP84-2066 comportou-se diferentemente, já que tanto as gemas novas e velhas foram mais suscetíveis que as gemas medianas. A diferença no comportamento da variedade pode explicar porque esta variedade é mais suscetível, ou seja, o nível de infecção é sempre mais alto, pois todas as idades da gema apresentam grande suscetibilidade, o que resulta no campo em um maior nível de infecção.

Para todas as variedades o tratamento onde foram usadas as gemas mais novas proporcionou maior homogeneidade entre os resultados. As maiores incidências foram observadas entre os 90 e 110 dias após a inoculação para todos os tratamentos.

Bock (1964) observou pela primeira vez que a idade da gema referente a sua posição no colmo poderia influir no índice de infecção e a partir dessa observação sugeriu que em inoculações artificiais os fatores mais importantes de padronização eram a idade da gema e a concentração de teliósporos.

Os Programas de Melhoramento Genético de cana-de-açúcar, uma forma geral, não padronizam a idade das gemas devido ao grande número de gemas descartadas, o que consumiria mais plantas para a execução dos testes.

Tabela 4 - Incidência de carvão em três variedades de cana-de-açúcar quando inoculadas gemas de diferentes idades fisiológicas

Idade	Incidência média (%)		
Variedade	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066
Nova (ponta do colmo)	29,16a	40,0a	46,15a
Mediana (meio do colmo)	8,33b	15,78b	20,3b
Velha (pé do colmo)	9,09b	15,78b	45,29a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de significância de Tukey a 5 %. Análise por coluna. CV 6,32.

2.3.5 Pré-brotação das gemas

No ensaio de pré-brotação das gemas apenas os tratamentos sem pré-brotação e com pré-brotação de um dia tiveram gemas infectadas (tabela 5). Apenas para a variedade SP84-2066 o tratamento sem pré-brotação foi superior, diferindo estatisticamente do tratamento de pré-brotação de um dia. Os tratamentos com 4, 6, 8 e 10 dias de pré-brotação não tiveram suas gemas foram infectadas.

Tabela 5 - Incidência de carvão em três variedades de cana-de-açúcar quando inoculadas gemas brotadas por diferentes períodos

	Incidência média (%)		
Dias de brotação	NA56-79	SP71-1406	SP84-2066
0	8,90a	7,52a	17,34a
1	5,41a	5,12a	3,56b
4	0c	0c	0c
6	0c	0c	0c
8	0c	0c	0c
10	0c	0c	0c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de significância de Tukey a 5 %

2.3.6 Concentração do inóculo

No experimento de concentração do inóculo foram utilizadas quatro concentrações de teliósporos diferentes. Dessas quatro, as concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 teliósporos/ml produziram gemas infectadas sem diferir estatisticamente seus índices de infecção. As concentrações inferiores a 1×10^6 teliósporos/ml não produziram

plantas infectadas (tabela 6). A infecção média dos tratamentos efetivos variou de 10,71 a 18,12%, atingindo um máximo de 32,64%.

Outra observação de Bock (1964) foi que a concentração do inóculo influencia no índice de infecção, sendo que, sendo que 10^6 - 10^7 teliósporos/ml foram necessários para a infecção. Quando variedades resistentes foram inoculadas com concentrações maiores ainda assim, continuaram a ser resistentes, sendo que o efeito do inóculo pode ser melhor observado em variedades de resistência intermediária.

A partir desses dados podemos concluir que os Programas de Melhoramento podem padronizar a concentração dos teliósporos em 1×10^6 , concentração na qual obtém o melhor índice de infecção utilizando menos esporos.

Tabela 6 - Incidência de carvão nas variedades de cana-de-açúcar quando inoculado com teliósporos de *Sporisorium scitamineum* em diferentes concentrações

Concentração (teliosporos/ml)	Incidência média (%)	Incidência máxima (%)
10^2	0 b	0
10^4	0 b	0
10^6	18,12 a	32,64
10^8	10,71 a	25,62

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Análise por coluna.

2.3.7 Tipo de inoculação

A inoculação por fermento proporcionou um maior índice de infecção para as variedades NA56-79, RB72-454, IAC66-6 e SP70-1143 e não teve interferência na incidência das variedades SP79-1011, SP80-185 e SP86-155 (tabela 7). Como a inoculação por fermento pode eliminar resistências naturais da própria morfologia da gema, aumentando a incidência de doença em algumas variedades, este tipo de inoculação pode não representar o que ocorre em campo. Apesar disso, todas as variedades tiveram uma redução no período de incubação e latência de até 90 dias.

Bock (1964) foi o primeiro a utilizar a suspensão de teliósporos por pulverização das gemas, porém o método era difícil de ser executado, pois as gemas eram inoculadas com a planta ainda em pé no campo e amarrando-se sacos plásticos em cada gema para a manutenção da umidade. Byther; Steiner (1973) foram os primeiros a

estudar mais profundamente este método e conseguiram notar uma boa correlação entre a pulverização e a infecção natural.

Leu et al. (1970) utilizaram o método do ferimento das gemas com posterior inoculação e verificaram que as vantagens desse método foi a utilização de uma menor quantidade de inóculo e que os resultados puderam ser observados em menos tempo quando comparado a outros métodos. A desvantagem foi que o método é muito drástico. Essa opinião é semelhante à de Early (1970) que sugere que quando realizado o ferimento aumenta a incidência da doença, porém características morfológicas da gema não puderam ser indicadoras de resistência. Dean (1982) diz que é evidente que possa haver perda de resistência após a inoculação com ferimentos, mas o importante é sempre correlacionar com os resultados de inoculação natural. Não deve ser ignorado pelos Programas de Melhoramento o impacto da inoculação por ferimento. Os resultados são mais rápidos, porém ocorre uma redução do número de clones aceitáveis. Esse tipo de inoculação reduz a variabilidade dos dados, aumentando a precisão.

Wismer (1975) acredita que esse método só é válido se for para distinguir variedades altamente resistentes de altamente suscetíveis, pois ele acreditava que as variedades intermediárias seriam classificadas como suscetíveis.

Programas de Melhoramento que utilizam a técnica de inoculação por ferimento em fases de seleção de clones podem estar descartando materiais que se comportam como suscetível nas fases experimentais, porém poderiam comportar-se como intermediários ou até resistente e campo.

Tabela 7 - Incidência de carvão em sete variedades de cana-de-açúcar inoculadas por aspersão de teliósporos e por fermento da gema seguido de aspersão de teliósporos de *Sporisorium scitamineum*

Variedade	% de infecção da inoculação por	
	Aspersão	Ferimento
NA56-79	14,8b	26,93a
RB72-454	3,70b	22,0a
IAC66-6	10,71b	24,2a
SP70-1143	7,40b	21,42a
SP79-1011	7,14a	8,33a
SP80-185	7,40a	8,0a
SP86-155	11,12a	7,8a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Análise por linha. CV 9,1.

2.3.8 Testes com iniciadores bE

As extrações de DNA descritas por Saghai-Maroo (1984), TNES (MARTINS; BACCI, 2000) e Dellaporta (1983) foram eficientes na obtenção de DNA de boa qualidade e em grande quantidade, sem degradações (figura 1). A extração selecionada para dar continuidade ao trabalho foi a Dellaporta, por ser simples, rápida, econômica e reprodutível.

Os iniciadores específicos para *S. scitamineum*, bE4 e bE8 (ALBERT; SCHENCK, 1996) amplificaram o DNA de teliósporos num fragmento de 459 bp. Estudos de gradiente de temperatura de anelamento mostraram que a temperatura de 54 °C amplificava bandas mais nítidas e intensas que a temperatura de 52 °C, recomendada pelos autores. A partir desse estudo, todas as reações foram realizadas no programa com a temperatura de 54 °C.

Figura 1 – Teste de extração de DNA. Colunas: 1 – marcador molecular 1kb Fermentas[®], 2 – controle positivo do gel, de 3 a 8 – extração Saghai-Maroo, de 9 a 14 – extração TNES e de 15 a 20 – extração Dellaporta

Após a padronização da reação foram testadas amostras de teliósporos de diferentes concentrações, amostras de meristemas de plantas infectadas e de folhas de plantas infectadas. Porém só foi possível amplificar fragmentos nas amostras de teliósporos e de meristemas de plantas infectadas (figura 2). Em 32 amostras de folha apenas uma amostra foi possível diagnosticar como positiva, apresentando uma banda fraca.

Figura 2 – Amplificações com os iniciadores bE. Colunas: 1 – marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia NA56-79, 4 – folha da variedade NA56-79 com sintomas, 5 – folha da variedade SP84-2066 com sintomas, 6 – folhas da variedade SP71-1406 com sintomas, de 7 a 11 – meristemas inoculados da variedade NA56-79, de 12 a 15 – meristemas inoculados da variedade SP84-2066 e de 16 a 19 – meristemas inoculados da variedade SP71-1406

Nenhuma planta sadia provinda de viveiro com tratamento térmico teve resultado positivo, mostrando que não existiam resultados falsos positivos.

2.3.9 Teste de especificidade: fungos endofíticos

O teste de especificidade dos iniciadores bE4 e bE8 foi realizado com fungos endofíticos que poderiam causar diagnósticos falso positivos, por estarem no mesmo nicho ecológico de *S. scitamineum*.

Foi possível isolar 46 isolados fúngicos das variedades utilizadas, tanto de plantas sadias quanto de plantas doentes. Foram identificados com base na morfologia de colônias e de esporos os gêneros *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Trichoderma*.

Nas plantas doentes estava presente apenas o fungo *Trichoderma* e este gênero não apareceu nas plantas sadias. Nas plantas sadias não existiram diferenças entre as partes da planta, idade ou variedade. A distribuição dos três gêneros foi homogênea independente da condição.

Nenhum dos fungos isolados amplificaram com os iniciadores bE4 e bE8 juntamente com os controles positivos (teliósporos) amplificados, mostrando especificidade e confiabilidade para sua utilização em diagnósticos de plantas (figura 3).

Figura 3 – Teste de especificidade. Colunas: 1 – Marcador molecular 1kb Fermentas[®], 2 a 4 – *Sporisorium scitamineum*, de 5 a 8 – *Colletotrichum*, 9 a 12 – *Curvularia*, 13 a 16 – *Fusarium* e de 17 a 20 – *Trichoderma*

2.3.10 Teste de detecção em plantas inoculadas

Foram montados três experimentos independentes para testar os iniciadores bE4 e bE8 para a utilização em plantas provenientes do campo. Foram analisadas 45 amostras de folhas e 45 amostras de meristemas para cada uma das três variedades,

nos três experimentos, o que resultou em 810 amostras analisadas. Nenhuma amostra foi possível diagnosticar como positiva, pois não ocorreu amplificação do fragmento esperado, porém os controles amplificaram normalmente. As plantas foram avaliadas até os 90 dias após a inoculação já que o aparecimento do chicote para as três variedades avaliadas começa a partir desta data.

No artigo de relato dos iniciadores específicos bE4 e bE8 há a informação de que os ensaios de PCR utilizando esses iniciadores são capazes de detectar 50pg de DNA de *S. scitamineum*, o que representa 1:2.000 de DNA de fungo em DNA de planta.

É importante ressaltar novamente as que amostras eram destrutivas, assim esses resultados negativos não puderam ser confrontados com presença de sintomas e sinais. Porém em testes anteriores de inoculação realizados neste trabalho já se conheciam as médias de infecção das variedades que variaram de 5,34 a 33,63% de infecção, que em 810 amostras representaria, no mínimo, 43 plantas infectadas.

É difícil de avaliar a proporção de DNA do patógeno em relação ao DNA do hospedeiro, especialmente em relações do tipo sistêmica. O que pode ser concluído por meio deste teste é que a concentração do fungo nas folhas deveria ser inexistente ou menor que a concentração do fungo no tecido meristemático, ou seja, uma concentração inferior a 50pg, que é citada no trabalho.

Por causa da ausência de sucesso no ensaio, foi conduzido um ensaio com meristemas “*in vitro*” para testar as condições de reação e as hipóteses levantadas acima.

2.3.11 Teste de meristemas de cultivo in “*vitro*”

O teste de detecção de meristemas “*in vitro*” foi baseado no trabalho de Singh et al. (2004) já que este usou os iniciadores bE4 e bE8 e concluiu que era possível detectar *S. scitamineum* em meristemas inoculados.

Foram conduzidos um total de 75 meristemas, sendo 10 de cada variedade avaliado aos 15 dias após o início do cultivo e 10 meristemas das variedades NA 56-79 e SP 71-1406 e 25 da variedade SP 84-2066 avaliados 30 dias após o início do cultivo.

Foi possível a detecção do fungo em todos os meristemas, independente da variedade e da data de avaliação. Este resultado mostra que é possível a detecção do

fungo junto ao DNA de folhas de cana-de-açúcar, como antes não foi possível, porém o fungo detectado poderia não ter infectado as plantas, apenas estar presente pelo ato da inoculação. Assim esses resultados apenas confirmam a detecção, mas não podem ser aplicados em amostras reais.

2.3.12 Desenvolvimento dos iniciadores específicos Hs e Ha

Os iniciadores que mostraram maior especificidade baseados no programa BLAST foram os iniciadores Hs (5'-AAC ACG GTT GCA TCG GTT GGG TC-3') e Ha (5'-G CTT CTT GCT CAT CCT CAC CAC CAA-3') que foram testados em reações. Foram desenvolvidos uma reação e um programa específico, no qual foi otimizado com uma reação de 25ul finais contendo: 15,8 ul água Milli-Q; 2,5ul de *Taq* buffer com KCl; 2,5ul de 25mM de $MgCl_2$; 2,0ul de 2,5mM de dntp; 1ul de Hs a 30pM; 1ul de Ha a 30pM e 1U de *Taq DNA polimerase recombinant*. O programa constou de 2 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 56 °C; 45 segundos a 72 °C e 5 minutos a 72 °C. Os iniciadores promovem a amplificação de um fragmento de 509bp.

2.3.13 Teste de especificidade dos iniciadores específicos Hs e Ha

Para o teste de especificidade dos iniciadores específicos Hs e Ha foram utilizados os 46 isolados de fungos endofíticos isolados das plantas sintomáticas e assintomáticas que foram utilizados anteriormente.

Nenhum dos isolados amplificou o fragmento esperado mostrando especificidade e confiabilidade para sua utilização em diagnósticos de plantas (figura 4).

Figura 4 - Teste de especificidade. Colunas: 1 – Marcador molecular 100 bp Fermentas® – 2 – *Sporisorium scitamineum*, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 7 – *Colletotrichum*, 8 a 11 – *Curvularia*, 12 a 15 – *Fusarium* e de 16 a 19 – *Trichoderma*

2.3.14 Teste de sensibilidade dos iniciadores específicos Hs e Ha

O teste de sensibilidade mostrou que os iniciadores específicos Hs e Ha foram capazes de detectar menos que 20pg de DNA de *S. scitamineum*, ou seja, são bastante sensíveis para serem utilizados em testes de diagnósticos (figura 5).

Figura 5 – Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas®, 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 6 – controles positivos de folhas de plantas infectadas, 7 – teliósporos sem diluição, 8 – diluição de 1:1, diluição de 1:10, 9 – diluição de 1:50, 9 – diluição de 1:100, 10 – diluição de 1:1.000, 11 – diluição de 1:2.000, 12 – diluição de 1:5.000, 13 – diluição de 1:10.000, 14 – diluição de 1:15.000, 15 – diluição de 1:25.000, 16 – diluição de 1:100.000, 17 – diluição de 1:250.000, 18 – diluição de 1:800.000

2.3.15 Testes de meristemas de cultivo “*in vitro*”

As mesmas amostras utilizadas no teste dos iniciadores bE4 e bE8 foram utilizadas para verificar a possibilidade de emprego dos iniciadores Hs e Ha. Foi possível detectar o fungo em todas as amostras de meristemas inoculados, como com os iniciadores bE4 e bE8, porém com bandas mais nítidas e intensas (figura 6).

Figura 6 – Teste em meristemas. Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 – controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 a 7 – meristemas da variedade IAC66-6, 8 a 11- meristemas da variedade SP84-2066, 12 a 15 – meristemas da variedade NA56-79 e 16 a 19 – meristemas inoculados da variedade SP71-1406

2.3.16 Teste em plantas sintomáticas

Diferentes partes de folhas de plantas sintomáticas foram utilizadas como amostras para verificar a melhor forma de amostragem dos próximos ensaios.

Foram testadas folhas de diferentes idades fisiológicas, partes diferentes das folhas, limbo e nervura foliar. Foi possível a detecção do fungo em todas as amostras testadas das folhas, sem diferença de nitidez nas bandas, mostrando que o fungo estava distribuído por toda a planta de forma que poderia ser diagnosticado com reações utilizando os iniciadores Hs e Ha (figura 7).

Figura 7 – Teste em plantas sintomáticas. Colunas: 1 – Marcador molecular 100bp Fermentas[®], 2 - controle positivo: teliósporos, 3 – controle negativo: planta sadia, 4 e 5 – limbo de folha -2, 6 – nervura de folha -2, 7 e 8 – limbo de folha -1, 9 – nervura de folha -1, 10 e 11 – limbo de folha 0, 12 – nervura de folha 0, 13 e 14 – limbo de folha +1, 15 – nervura de folha +1, 16 e 17 – limbo de folha +2, 18 – nervura de folha +2, 19 – controle positivo: teliósporos e 20 – controle negativo: água

Para efeitos de padronização, os ensaios posteriores tiveram a porção mediana da folha +1 coletada para as análises com os iniciadores.

2.3.17 Teste em plantas assintomáticas

Os quatro ensaios resultaram num total de 529 plantas avaliadas, que perfazem 3.939 amostras analisadas. Do total de plantas, 107 plantas apresentaram chicotes e todas puderam ser diagnosticadas anteriormente com reações utilizando os iniciadores Hs e Ha (tabela 8). Como as amostras variaram o período de incubação, também as datas de diagnóstico precoce variaram, sendo no mínimo de 30 dias e máximo de 120 anteriores ao aparecimento do chicote. Com a possibilidade de detecção em folhas, neste experimento as amostras não eram destrutivas e foi possível avaliar o desempenho dos iniciadores comparados aos sintomas e sinais. Nenhuma planta sadia apresentou reação positiva ao diagnóstico, conferindo especificidade aos iniciadores.

Tabela 8 - Correlação entre o número de plantas com chicote e o número e tempo de diagnóstico dessas plantas

Variedade	Número de plantas			Diagnóstico por PCR	
	Analizadas	Com chicote	Com PCR positiva	Dias antes do chicote (mínimo)	Dias antes do chicote (máximo)
NA56-79	57	9	9	30	120
NA76-128	15	10	10	60	90
NA84-3013	42	2	2	45	45
NA78-724	34	7	7	0	105
NA89-1090	97	27	27	60	105
NA96-2929	48	29	29	75	105
SL88-116	55	3	3	75	120
IAC66-6	50	11	11	75	120
C11179	56	2	2	60	105
SP71-1406	30	3	3	60	120
SP79-2312	17	0	0	-	-
SP84-2066	28	4	4	75	120

Com a utilização dos iniciadores Hs e Ha foi possível detectar o patógeno nas folhas e assim foi possível acompanhar todo o desenvolvimento da planta, avaliar o desempenho dos iniciadores em diferentes fases e compará-lo com o aparecimento do chicote. Estes iniciadores mostraram-se eficientes em todas as folhas e porções de folhas de plantas infectadas, não mostrando distinção entre os resultados. O benefício da utilização dessa técnica é maior nas variedades que apresentam um maior período de latência. Essa característica proporciona uma maior aplicabilidade prática, como em casos de material exótico introduzido, já que estes podem ter quantidades de material para análise limitadas. Além desses materiais, o método também pode ser utilizado em experimentos e como seleção de variedades em casos específicos. Esses resultados mostram que é possível a detecção do carvão em plantas assintomáticas pelo uso dos iniciadores Hs e Ha.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com bases nos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- A melhor condição pós-inoculação foi a incubação de 24 horas a 28 °C e 65% de umidade, pois favorece a brotação das gemas e infecção;
- As gemas mais novas são mais suscetíveis e apresentam resultados mais homogêneos de índice de infecção;
- Gemas pré-brotadas além de um dia não foram infectadas;
- As concentrações de inóculo de 1×10^6 e 1×10^8 foram as que proporcionaram infecção sem distinção entre elas;
- A inoculação por aspersão pós-ferimento apresenta um maior índice de infecção para algumas variedades provavelmente por quebra de resistência morfológica, mas em todas as variedades houve redução do período de incubação e latência quando usado este tratamento;
- os iniciadores desenvolvidos apresentam ótima especificidade e sensibilidade e
- com o método de diagnose desenvolvido foi possível diagnosticar o carvão até 120 dias antes do aparecimento do sintoma ou sinal.

Referências

ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the *bE* mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.10, p.1189-1192, 1996.

ALEXANDER, K.C.; RAMAKRISHNAN, K. Studies on the smut disease (*Ustilago scitaminea* Sydow) of sugarcane: 4 – parasitism – germination – dikaryotisation and infection. **Proceedings Internacional Society Sugar Cane Technology**, São Paulo, v. 16, p.469-472, 1977.

AMORIM, L.; RICCI, A. Potencial infeccioso – um parâmetro epidemiológico da resistência ao carvão (*Ustilago scitaminea* Sydow). **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n.36, p.50-53, 1987.

AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; HAU, B. Wounded-bud inoculation of *Ustilago scitaminea* on the sugarcane smut curve. International. In: CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., 1998. Edinburg, **Anais...** v.2, 2.8.2, 1998.

A NEW race of smut. Hawaiian Sugarcane Planters Station. **Annual Report**, 1976. p. 55-59.

ANTOINE, R. Smut. In: MARTIN, J.P. ABBOTT, E.V., HUGHES, C.G. (Ed.). **Sugarcane diseases of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. v.1, p.326-353.

BARBOSA, E.A. **Avaliação fitotécnica de cinco variedades de cana-de-açúcar para o município de Salinas – MG**. 2005. 72p. Dissertação de (Mestrado na Área de Fitotecnia) – Universidade Estadual Sudoeste da Bahia, Salvador, 2005.

BARAT, H. Etat phytosanitaire des cannes a sucre de cote d'ivoire. Danger resultant de la presence du charbon em Haute-Volta. **Rapport IRAT**. 1971.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd. ed. Minnesota: Burgess, 1982. 242p.

BENDA, G.T.A. Breeding for disease resistance. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987. Piracicaba. **Proceeding...** Piracicaba: Copersucar. 1987. p.161-179.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ceres, 1996. 299p.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A.; IRVINE, J.E., SILVA, W.M. Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia. **Boletim Técnico Copersucar** (Ed. Especial), Piracicaba, p.1-23, 1987.

BOCK, K.R. Studies on sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. **Transactions British Mycological Society**, London, v.47, p.403-417, 1964.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B.P.H.J.; CARMONA, E.; BORROTO, C.J.; PUJOÇ, M. ARENCIBIA, A; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v.43, p.1115-1121, 2005.

BRAITHWAITE, K.S.; BAKKEREN, G.; CROFT, B.J.; BRUMBLEY, S.M. Genetic variation in worldwide collection of the sugarcane smut fungus *Ustilago scitaminea*. In: AUSTRALIAN SOCIETY SUGARCANE TECHNOLOGIST CONGRESS, 2004, Mackay, **Proceedings**...Mackay: AuSSCT, 2004. v.26. p.224-232.

BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Hot water control of smut. **Hawaiian Sugar Planters Association Annual Reports**, Honolulu. 1973. p. 31-32.

BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Comparison of inoculation techniques for smut disease testing in Hawaii. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, Mauritius, v.15, p.280-288, 1974.

CARDOSO, C.O.N; FERNANDES, C.R; AMORIM, L.; CASAGRANDE, M.V.; MORAES, V.A. Etiologia do carvão e da ferrugem da cana-de-açúcar – efeito da temperatura na germinação dos esporos. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, p.13-18, 1986.

CASAGRANDE, M.V. **Avaliação da incidência da doença e estimativa de danos ocasionados pelo carvão (*Ustilago scitaminea* Sydow) em variedades de cana-de-açúcar**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

COMSTOCK, J.C.; HEINZ, D.J. A new race of Culmicolous smut of sugarcane in Hawaii. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, n. 19, p.24-25, 1977.

COMSTOCK, J.C.; FERREIRA, S.A; TEW, T.L. Hawaii's approach to control of sugarcane smut. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, p.452-457, 1983.

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n.36-87, p.23, 1987.

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Avaliação de diferentes métodos de inoculação do carvão da cana-de-açúcar (*Ustilago scitaminea* Sydow)**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1995. 19p. (Relatório Anual 1994/95)

CROFT, B.J.; BRAITHWAITE, K.S. Management of an incursion of sugarcane smut in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Woodford, v.35, p.113-122, 2006.

DEAN, J.L. The effect of wounding and high pressure spray inoculation on the reactions of sugarcane clones. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 1023-1025, 1982.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Fort Collins, v.1, p.19-21, 1983.

DUARTE, M.; TOKESHI, H. Inoculation of sugarcane seedlings for selection of resistance to *Ustilago scitaminea*. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, London, v.16, p.383-393, 1978.

EARLY, M.P. Current programs in sugarcane diseases research centres: Kenya. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.5, p.32-34, 1970.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR.; A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of Sugarcane – Major Diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p.211-229.

GIGLIOTI, E.A. **Caracterização da resistência de variedades de cana-de-açúcar para *Ustilago scitaminea* através do inóculo das mudas e da evolução da doença em cana-soca**. 1993. 167p. Dissertação (Mestrado na Área de Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

GLORIA, B.A.; CAPOTE-ALBERNAS, M.C.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Morphological characteristics of sugarcane clones, susceptible and resistant to smut (*Ustilago scitaminea*). In: **Sugarcane Pathology: Fungal Diseases**, Enfield, Science Publishers, 1999. p.167-182.

GRISHAM, M.P.; HOGART, D.M. An international project on genetic variability within sugarcane smut. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 2001, Brisbane. **Proceedings...** Brisbane: ISSCT, 2001. p.459-461.

HAUKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8th ed. Cambridge: CAB International, 1995. 616p.

HANLIN, R.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. Minnesota: The American Phytopathological Society St. Paul, 1989. 263p.

HECTOR, E.; RODRIGUEZ, R.; PRADA, F.; DELMONTE, A.; GONZALEZ, R. Evidence for the presence of different smut resistance mechanisms in sugarcane. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, Veracruz, v.2, p.565-574, 1992.

HIRSCHHORN, E. Un nuevo metodo de infeccion artificial con el carbon de la can de azucar. **Revista de Investigaciones Agricolas**, Buenos Aires, v.4, p.335-344, 1949.

HIRSCHHORN, E. **Caracteres del ciclo evolutivo del carbon de la caña de azucar**. Ministerio de Agricultura Y Ganaderia, Buenos Aires, n.3, p.317-324, 1950. (Publicação Técnica).

HIRSCHHORN, E; ASTIZ-GASSO, M.M. Especialización fisiológica del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Sydow) en la Republica Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v.23, p.10-14, 1988.

HOY, J.W. Incidence of sugarcane smut in Louisiana and its effect on the yield. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, p.59-60, 1986.

IRVINE, J.E. Strategies for smut control. **Sugarcane Pathologist's Newsletter**, Beltsville, n.28, p.1-2, 1992.

JAMES, G. Smut spore germination on sugarcane internode surfaces. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, Veracruz, p.179-180, 1973.

LAMBAT, A.K.; SHENULU, U.V.; CHONA, B.L. Influence of soil temperature on infection of sugarcane by the smut fungus, *Ustilago scitaminea*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.19, n.2, p.237-238, 1966.

LEE-LOVICK, G. Smut of sugarcane – *Ustilago scitaminea*. **Review of Plant Pathology**, Wallingford, v.57, p.181-188, 1978.

LEU, L.S.; WISMER, C.A.; DANIELS, J.; HUTCHINSON, P.B. Cooperative programs for screening sugarcane varieties for resistance to diseases (1) Taiwan Program. **Sugar Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.4, p.36-37, 1970.

LEU, L.S.; TSENG, W.S. Culmicolous smut of sugarcane in Taiwan U. Two pathogenic strains of *Ustilago scitaminea* Sidow. **Proceedins ISSCT**, Mauritius, v.15, p.275-279, 1974.

LLOYD, H.L.; NAIDOO, G. Chemical assay potencially suitable for determination of smut resistance for sugarcane cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p.1103-1105. 1983.

MARTINS, V.G.; BACCI JUNIOR, M. Métodos moleculares para o estudo do DNA I: Extração e amplificação de DNA. Extensão. 2000. 22p.

MATA, J.F.R.; TOKESHI, H. Comparação em três métodos de preservação de *Ustilago scitaminea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.2, p.187-193, 1975.

MATSUOKA, S.; SORDI, R.A.; MASUDA, Y.; ARIZONO, H. Reliability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clones. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, Guatemala, v.19, p.375-385, 1986.

MUNDKUR, B.B. Taxonomy of the sugarcane smuts. *Kew Bulletin*, London, v.10, p.525-533, 1939.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Lund, v.15, p.473-497, 1962.

NASR, I.A. Standardization of inoculum techniques for sugarcane smut disease. **Sugarcane Pathologist's Newsletter**, Louisiana, v.18, p.2-5, 1977.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. MARASA, W.F.O. **Fusarium species**: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, 1927, 193p.

PADMANABAN, P.; ALEXANDER, K.C.; SHANMUGAN, N. Mechanism of smut resistance in sugarcane. **Sugar Cane**, 1988. ,p.14-16.

PEROS, J.P.; BAUDIN, P. Etude de la variabilité d' *Ustilago scitaminea* Syd., agent du carbón de la canne à sucre. **L'Agronomie Tropicale**, Montpellier, v. 38, p.234-240, 1983.

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea* and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, München, v.1, p.71-80, 2002.

POPP, W. An improved method of detecting loose-smut mycelium in whole embryos of wheat and barley. **Phytopathology**, Lancaster, v.48, p.641, 1958.

POPP, W. A new procedure for embryo examination for mycelium of smut fungi. **Phytopathology**, Lancaster, v.48, p.19-22, 1958.

RABOIN, L.M.; SELVI, A.; OLIVEIRA, K.M.; PAULET, F.; CALATAYUD, C.; ZAPATER, M.F.; BROTTIER, P.; LUZARAN, R.; GARSMEUR, O.; CARLIER, J.; D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. **Fungal Genetics and Biology**, Elsevier, v.44, p.64-76, 2007.

RAGO, A.M. **Variabilidade genética de *Puccinia melanocephala* e *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo**. 1995. 42p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

RAGO, A.M.; CASAGRANDE, M.V.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, p.93-97, 2000.

RAO, N.V.M.; PRASKAJAM, P. Studies on sugarcane smut. **Proceedings International Society Sugarcane Technologists**, New Delhi, v.9, p.1048-1057, 1956.

RAMALLO, J.; RAMALLO, N.E.V.; PLOPER, L.D. Diagnostico de enfermedades de la caña de azúcar: metodologías aplicadas por la EEADAC. **Avance Agroindustrial**, Tucumán, v.21, n.1, p.8-12, 2000.

ROBINSON, R.A. **Plant pathosystems**. Berlim: Springer-verlag, 1976. 184p.

ROCHA, H.M. Contribuição do serviço de quarentena como limitante a disseminação de patógenos por sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.7, n.1, p.175-182, 1985.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings National Academic Sciences**, Blacksburg, v.81, p.8014-8018, 1984.

SANGUINO, A.; TOKESHI, H. Vácuo e *Ustilago scitaminea* alterando a brotação de cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Araras, v. 6, p. 30-35, 1976.

SANTOS, A.A.; TEIXEIRA, L.M.S.; ARAUJO, F.E.; FREIRE, J.M. Ocorrência do carvão (*Ustilago scitaminea*) da cana-de-açúcar no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.794-751, 1986.

SILVA, W.M. **Pré-seleção de “seedling” de cana-de-açúcar resistentes a *Ustilago scitaminea*, pela inoculação de sementes**. 1978. 65p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PYLLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Science**, Chicago, v.167, n.5, p.987-994, 2004.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PYLLAY, D. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. **FEMS Microbiology Letter**, Birmingham, v.247, p.7-15, 2005.

SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N.; SANTOS, F.A.; MULLER, G. W.; MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.503-516, 2001.

SRINIVASAN, K.V. Methods for testing the resistance of sugarcane to disease sugarcane smut. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.1, n.2, p.7, 1969.

STUART, R.M. **Comunidade de fungos endofíticos associada a cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SYDOW, H. Notizen über Ustilagineen. **Annual Mycology**, Lexington, v.22, p.277-291, 1924.

TOFFANO, W.B. Influência de inoculações sucessivas de *Ustilago scitaminea* Syd. em cana-de-açúcar pelo método de vácuo sobre a germinação e a patogenicidade dos esporos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, p.27-31, 1977.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar *Ustilago scitaminea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.9, p.98-110, 1983.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar: etiologia e medidas de controle. **Revista da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**. Piracicaba: STAB, v.4 p.26-34, 1985.

TOKESHI, H. **Avaliação de perdas pelo carvão da cana-de-açúcar**. n.15, 1987. 26p. (Coleção Sopral)

TOKESHI, H.; RAGO, A.M. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap.21, p.185-196.

UNICA. Sociedade: Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/sociedade_mercados.asp. Acesso em: 10 mar. 2007. p. 185-196.

VEIGA, F.M. Smut in Brazil. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.9, p.17-25, 1972.

XU, M.L.; MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTEDT, T. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR based assays. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.4, p.390-217, 1999.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenia I. Epidemiology. **Transactions British Mycological Society**, London, v.52, p.139-151, 1969.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenia II. Infection and resistance. **Transactions British Mycological Society**, London, v.54, p. 405-414, 1970.

WHITENEAAD, C. Variety studies. **Reports Experimental Station African Sugar Association**. 1967. p.24-30.