**INFLUÊNCIA DO VÁCUO, FOTOPERÍODO E SUBSTRATO
NA SELEÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE A**
Ustilago scitaminea

AMARILES SANTOS DIAS
Engenheira Agrônoma

Orientador : Prof. Dr. HASIME TOKESHI

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril, 1981

*A Deus, por mais esta graça,
Aos meus velhos, Francisco e Aldenora,
pela alegria de tê-los como pais,
Aos meus irmãos, sobrinhos, tios, cu-
nhados e sogros, pelo apoio,*

*Ao José Fernando, companheiro
de todas as horas, pela graça
de tê-lo como esposo,*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Hasime Tokeshi, pelo exemplo de orientação, ensinamentos e versão do resumo para o inglês; a ele, esposa e filhos, pela amizade.
- À Empresa Maranhense de Pesquisa Agropecuária e Secretaria de Agricultura do Maranhão, pela oportunidade de aperfeiçoamento.
- Ao meu marido José Fernando Soares Dias, pela dedicação e análises estatísticas.
- Aos irmãos Itaan Santos da Fonseca, Vilma Santos da Fonseca, Gilson Mendes Caminha e Maria do Socorro Dias Caminha, pelo inesgotável apoio dispensado.
- Aos Professores Francisco Ferraz de Toledo, José Dias Costa e Ferdinando Galli, pelas considerações dispensadas.
- Ao Professor Hiroshi Kimati, pelos ensinamentos e revisão do original.
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos valiosos ensinamentos.
- À Coordenadoria do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar, pelas facilidades concedidas na realização deste trabalho.
- Aos amigos Mauro Sérgio Tenente, Renata Cesar Vilardi Tenente e Modesto Barreto, pelo excelente convívio mantido durante o Curso.

Aos funcionários Pedro Silva, Luiz Carlos Veríssimo e Antonio Vitti,
pela colaboração e amizade.

À Maria Izalina Ferreira Alves e família, e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Seção de Pós-Graduação da ESALQ, pelas atenções dispensadas.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela troca de idéias.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Método de Inoculação em Cariopses com <i>U. scitaminea</i>	3
2.1.1 - Uso do vácuo na inoculação com <i>U. scitaminea</i>	5
2.2 - Influência de Microrganismos na Germinação e Desenvolvimento de Plântulas de Cana-de-Açúcar	6
2.3 - Influência do Substrato na Germinação e Desenvolvimento de Plântulas de Cana-de-Açúcar	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 - Inóculo	10
3.1.1 - Obtenção, armazenamento e teste de germinação	10
3.1.2 - Determinação qualitativa dos fungos contaminantes dos esporos de <i>U. scitaminea</i>	11
3.2 - Cariopses	11
3.2.1 - Origem, beneficiamento e armazenamento	11
3.2.2 - Teste de germinação	12
3.2.3 - Determinação quantitativa dos fungos contaminantes	13
3.2.3.1 - Testes de patogenicidade com <i>Colletotrichum falcatum</i>	13

	Pág.
3.3 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses	15
3.4 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	16
3.5 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	17
3.6 - Influência da Cultivar e Inoculação com <i>U. scitaminea</i> na Mortalidade de Plântulas	18
3.7 - Relação entre a Presença de Micélio de <i>U. scitaminea</i> nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes	19
3.8 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i> e na Mortalidade de Plântulas ...	20
3.9 - Influência do Substrato e Inoculação com <i>U. scitami-</i> <i>nea</i> na Germinação de Cariopses, Colonização e Morta- lidade de Plântulas	22
3.9.1 - Influência do substrato e inoculação na ger- minação	22
3.9.2 - Influência do substrato na colonização	22
3.9.3 - Influência do substrato e inoculação na mor- talidade	23
3.9.4 - Delineamento experimental	23
3.10 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas	23
3.11 - Análise Estatística dos Dados	24
4. RESULTADOS	27
4.1 - Determinação Quantitativa dos Fungos Contaminantes de Cariopses	27

4.1.1 - Testes de patogenicidade com <i>C. falcatum</i> ..	27
4.2 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses	29
4.3 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	29
4.4 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	30
4.5 - Influência da Cultivar e Inoculação com <i>U. scitaminea</i> na Mortalidade de Plântulas,.....	31
4.6 - Relação entre a Presença de Micélio de <i>U. scitaminea</i> nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes	32
4.7 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i> e na Mortalidade de Plântulas ...	36
4.8 - Influência do Substrato e Inoculação com <i>U. scitami-</i> <i>nea</i> na Germinação de Cariopses, Colonização e Morta- lidade de Plântulas	37
4.8.1 - Influência do substrato e inoculação na ger- minação	37
4.8.2 - Influência do substrato na colonização	38
4.8.3 - Influência do substrato e inoculação na mor- talidade	38
4.9 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas	39
5. DISCUSSÃO	42
5.1 - Determinação Quantitativa dos Fungos Contaminantes de Cariopses	42

	Pág.
5.1.1 - Testes de patogenicidade com <i>C. falcatum</i> ..	43
5.2 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses	43
5.3 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	44
5.4 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i>	44
5.5 - Influência da Cultivar e Inoculação com <i>U. scitaminea</i> na Mortalidade de Plântulas	45
5.6 - Relação entre a Presença de Micélio de <i>U. scitaminea</i> nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes	46
5.7 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por <i>U. scitaminea</i> e na Mortalidade de Plântulas ...	48
5.8 - Influência do Substrato e Inoculação com <i>U. scitami-</i> <i>nea</i> na Germinação de Cariopses, Colonização e Morta- lidade de Plântulas	50
5.8.1 - Influência do substrato e inoculação na ger- minação	50
5.8.2 - Influência do substrato na colonização	52
5.8.3 - Influência do substrato e inoculação na mor- talidade	53
5.9 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas	54
6. CONCLUSÕES	56
7. LITERATURA CITADA	58

INFLUÊNCIA DO VÁCUO, FOTOPERÍODO E SUBSTRATO NA SELEÇÃO
DE CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE A *Ustilago scitaminea*

Autor: Amariles Santos Dias

Orientador: Dr. Hasime Tokeshi

RESUMO

A influência de contaminantes de cariopses de cana-de-açúcar, vácuo, fotoperíodo e substrato foi analisada quanto à germinação, mortalidade de plântulas inoculadas com *U. scitaminea* e relação entre a presença de micélio nas folhas e a produção de chicotes.

O fungo *Colletotrichum falcatum* foi encontrado pela primeira vez em cariopses de cana-de-açúcar.

As cariopses, das cultivares IAC 48/65, CO 419 e NA 56-79, foram inoculadas com *U. scitaminea* (6×10^6 esporos/ml). A aplicação do vácuo na inoculação prejudica a germinação e tende a aumentar a eficiência de seleção. O fotoperíodo não interfere na mortalidade de plântulas inoculadas com *U. scitaminea*.

O substrato vermiculita é superior ao ágar-água por

aumentar a germinação e eficiência de seleção, e não interferir na mortalidade de plântulas.

A causa mais importante de morte de plântulas é a presença de microrganismos patogênicos nas cariopses.

Plantas nas quais é detectado micélio de *U. scitami-
nea* nas folhas tendem a produzir chicotes precocemente e são mais suscetíveis do que aquelas nas quais isto não ocorre.

INFLUENCE OF VACUUM, PHOTOPERIOD AND SUBSTRATUM IN THE
SELECTION OF SUGARCANE RESISTANT TO *Ustilago scitaminea*

Author: Amariles Santos Dias

Adviser: Dr. Hasime Tokeshi

SUMMARY

The influence of sugarcane caryopses contaminants, vacuum, photoperiod and substratum were analysed in relation to their actions on germination, mortality of inoculated seedlings with *U. scitaminea* and relation of smut mycelium in the leaves and whips development.

The fungi *Colletotrichum falcatum* was found for the first time in sugarcane caryopses.

Sugarcane caryopses from cultivars IAC 48/65, CO 419 and NA 56-79 were inoculated with *U. scitaminea* (6×10^6 spores/ml). The vacuum application during the inoculation process decreased the germination with tendency to increase the selection efficiency. The photoperiod did not interfere in mortality of seedlings inoculated with *U. scitaminea*.

Vermiculite is substratum turned out to be better than water-agar to enhance the germination and selection efficiency, but did not interfere in seedlings mortality.

The main cause of seedlings death is the presence of pathogenic microorganisms in the caryopses.

Plants in which mycelium of *U. scitaminea* was detected tend to produce whips precociously and are more susceptible than those where mycelium was not observed.

1. INTRODUÇÃO

O carvão da cana-de-açúcar, causado pelo fungo *Ustilago scitaminea* Syd., é considerado de grande importância econômica para o Brasil (CARVALHO, 1949 e BRIEGER, 1965). Esta opinião atualmente é mais acentuada, uma vez que a cultura da cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque na política brasileira de álcool-combustível.

Por ser o plantio de cultivares resistentes a medida mais racional e econômica no controle do carvão da cana-de-açúcar (ANTOINE, 1961 e TOKESHI, 1980), a obtenção dessas cultivares é um dos requisitos dos programas de melhoramento dessa cultura. No atual programa de melhoramento da cana-de-açúcar, os clones são submetidos aos testes preliminares de carvão após a seleção a outras características agrônômicas e tecnológicas, cuja duração mínima é de quatro anos. Decorrido esse período de seleção, o número de clones dis

poníveis aos testes preliminares de carvão é limitado, o que contribui para elevar o custo desse material (TOKESHI, 1979).

Face às considerações sobre o atual programa de melhoramento da cana-de-açúcar, o Departamento de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, sentiu a necessidade de desenvolver um método mais precoce e eficiente de seleção de plântulas resistentes a *U. scitaminea*. Assim, trabalhos efetuados por MATA (1975), MATA e TOKESHI (1976), SANGUINO (1976), DUARTE (1976), DUARTE e TOKESHI (1978, 1978a), BLEICHER (1978), SILVA (1978), SANGUINO e TOKESHI (1980), BLEICHER e TOKESHI (1980, 1980a) e SILVA e TOKESHI (1980) foram conduzidos nesse Departamento, buscando informações sobre os possíveis fatores que poderiam ter influência nesse método.

Considerando-se que o método de seleção de plântulas resistentes a *U. scitaminea* é relativamente novo, alguns pontos inerentes a ele ainda são carentes de informações. Assim, visando fornecer-lhe subsídios, o presente trabalho foi conduzido principalmente para verificar a influência do vácuo, fotoperíodo e substrato na germinação de cariopses, colonização de plântulas por *U. scitaminea* e mortalidade de plântulas após o transplante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Método de Inoculação em Cariopses com *U. scitaminea*

O plantio de cultivares resistentes é a medida mais racional e econômica para controlar o carvão da cana-de-açúcar (ANTOINE, 1961 e TOKESHI, 1980). Sendo assim, a seleção para resistência ao carvão é um dos requisitos dos programas de melhoramento.

Vários métodos de inoculação em gemas de cana-de-açúcar, adotados em diversas partes do mundo, foram revisados por LEE-LOVICK (1978) e FERREIRA *et alii* (1980).

O primeiro relato de carvão em plântulas de cana-de-açúcar foi feito por TALBALLA (1969). Ao examinar flexas, para verificar a viabilidade do grão de pólen, observou a presença de numerosos teliosporos de *U. scitaminea*. Cariopses dessas flexas foram

semeadas em solo esterilizado e deram origem a plântulas que produziram chicotes, dez semanas após a semeadura.

A inoculação, em cariopses e plântulas de cana-de-açúcar, com *U. scitaminea* foi realizada por TALBALLA e NASR (1974), DUARTE (1976), BLEICHER (1978), DUARTE e TOKESHI (1978), SILVA (1978), BLEICHER e TOKESHI (1980) e SILVA e TOKESHI (1980).

O método de inoculação em cariopses de cana-de-açúcar é promissor e apresenta correlação entre a presença de micélio em folhas primárias e a produção de chicotes nas plantas suscetíveis (DUARTE, 1976 e DUARTE e TOKESHI, 1978).

Foi comprovado por SILVA (1978) e SILVA e TOKESHI (1980) que é válida a seleção de plantas resistentes a *U. scitaminea* na fase de plântula, pois há correlação entre a reação à doença nas fases juvenil e adulta. Os mesmos autores obtiveram uma eficiência de seleção de 66,11 e 66,68% para as progênies de PR 980 e CB 41-76, respectivamente.

O método de pré-seleção de plântulas a *U. scitaminea* já é empregado pela Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo - COPERSUCAR, que descarta anualmente 600.000 plântulas, 45 a 90 dias após a semeadura (SILVA, 1978 e SILVA e TOKESHI, 1980).

2.1.1 - Uso do vácuo na inoculação com *U. scitaminea*.

O uso do vácuo na inoculação, em gemas, com *U. scitaminea* foi utilizado por HIRSCHHORN (1949), TOFFANO (1965, 1966, 1966a), WALLER (1970), TOFFANO (1976) e SANGUINO e TOKESHI (1976).

Vários métodos de inoculação, em gemas, foram utilizados por HIRSCHHORN (1949). Observou que a inoculação por imersão numa suspensão concentrada de teliosporos, a um vácuo parcial e durante 15 a 20 minutos, foi a que deu maior percentagem de infecção. Comparações de métodos de inoculação foram também realizadas por TOFFANO (1976). Verificou que a inoculação à vácuo de 380 mm de Hg foi a que deu maior percentagem de infecção.

WALLER (1970) utilizou vácuo de 160 e 400 mm de Hg, durante três minutos, obtendo maior percentagem de infecção na pressão de 160 mm de Hg. SANGUINO e TOKESHI (1976) utilizaram vácuo de 612 mm de Hg, durante quatro minutos, concluindo que nos testes de resistência de cana-de-açúcar a *U. scitaminea*, o uso do vácuo é prejudicial à brotação das gemas.

O uso do vácuo na inoculação, em cariopses, com *U. scitaminea* foi utilizado por BLEICHER (1978) e BLEICHER e TOKESHI (1980). Verificaram que a inoculação à vácuo de 250 mm de Hg, durante dois minutos, elimina a necessidade de descascamento das cariopses, para obtenção de alta eficiência de inoculação com *U. scitaminea*. Verificaram também que esse nível de vácuo prejudica a germina

ção das cariopses.

Estudos com níveis de vácuo inferiores a 250 mm de Hg são necessários para avaliar seus efeitos na germinação de cariopses e colonização de plântulas por *U. scitaminea*.

2.2 - Influência de Microrganismos na Germinação e Desenvolvimento de Plântulas de Cana-de-Açúcar

Entre os fatores que afetam a qualidade das sementes encontra-se a presença de microrganismos. Muitas são as espécies de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos pelas sementes e causar doença nas próprias sementes, nas plântulas, nas plantas adultas e mesmo nas sementes da geração seguinte (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977).

No programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar, para obtenção de cultivares resistentes às doenças, são produzidas, anualmente, milhares de plântulas e freqüentemente surge problema na germinação. Estudos demonstraram que a maioria dos organismos patogênicos, da parte aérea da cana-de-açúcar, podem parasitar as cariopses e que as condições climáticas, nas quais as plantas florescem e frutificam, favorecem o ataque por outros organismos comuns a outras gramíneas (TOKESHI, 1980).

O primeiro relato de *Helminthosporium sacchari*, em cariopses de cana-de-açúcar, foi feito por LOVELESS e SMITH (1956).

Verificaram que o fungo foi o responsável pelo decréscimo na germinação, e morte de plântulas.

Foram citados como patógenos de plântulas de cana-de-açúcar os fungos *H. rostratum*, *H. hawaiiensis*, *Curvularia lunata* e *C. senegalensis* (BYTHER e STEINER, 1969; BYTHER *et alii*, 1971; BYTHER e STEINER, 1972; KHURANA e SINGH, 1972; YANG, 1973 e RAMALLO, 1975). Geralmente, a infecção deixou de ser fatal em plântulas com duas a três semanas de idade (BYTHER e STEINER, 1972). Observações semelhantes foram feitas por RAMALLO (1975). BYTHER e STEINER (1972) observaram ainda maior mortalidade de plântulas originadas de cariopses com um ano de idade, possivelmente, devida a perda de vigor.

No Brasil, os fungos dos gêneros *Helminthosporium*, *Curvularia* e *Fusarium* apresentam-se, em alta frequência, em cariopses de cana-de-açúcar, e são responsáveis por boa parte da baixa germinação e morte de plântulas. Os fungos dos gêneros *Pestalotia*, *Phoma* e *Cladosporium* não possuem grande patogenicidade sobre as cariopses, mas contribuem para aumentar o efeito global causado pelos patógenos mais agressivos (SANGUINO, 1976 e SANGUINO e TOKESHI, 1980). Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA (1978).

DUARTE (1976) e DUARTE e TOKESHI (1978) verificaram a colonização dos tecidos de plântulas de cana-de-açúcar por *Helminthosporium* sp, *Phoma* sp e *Curvularia* sp. Estes resultados foram confirmados por BLEICHER (1978), ao examinar plântulas mortas.

Com relação aos contaminantes de esporos de *U. scita*

minea, DUARTE (1976), DUARTE e TOKESHI (1978a) e SILVA (1978) observaram que *F. moniliiforme* e *Fusarium* sp foram os mais freqüentes e os mais patogênicos às plântulas de cana-de-açúcar. PLOPER e RAMALLO (1979) verificaram que *U. scitaminea* produz substâncias com propriedades antibióticas, as quais podem interferir na mortalidade de plântulas originadas de cariopses inoculadas.

Pelos trabalhos revisados, observa-se que os contaminantes patogênicos às plântulas de cana-de-açúcar, presentes nas cariopses e nos esporos de *U. scitaminea*, podem interferir no método de inoculação em cariopses. Pelos motivos expostos, verifica-se que há necessidade de utilizarem-se esporos e cariopses de melhor qualidade para obter-se maior eficiência no método de inoculação.

2.3 - Influência do Substrato na Germinação e Desenvolvimento de Plântulas de Cana-de-Açúcar

Para germinação de cariopses de cana-de-açúcar, MANGELSDORF (1966) recomenda como substrato barro-arenoso permeável. Quatro substratos foram comparados por GIBE e PANOL (1969), sendo que a melhor germinação foi obtida quando utilizaram três partes de torta de filtro Oliver para uma de cinza.

DONELAN (1980) verificou melhor desenvolvimento de plântulas quando resto de fibra de coco foi misturado ao solo. Atribuiu esse melhor desenvolvimento às melhores propriedades físicas, drenagem e aeração desse substrato.

Os substratos ágar-água (22 g de ágar por litro de água) e solo (três partes de torta de filtro Oliver para uma de solo não esterilizado) foram comparados por SILVA (1978) para as cultivares CB 41-76 e PR 980. A germinação foi significativamente maior no substrato ágar-água para a cultivar CB 41-76, tendo ocorrido o contrário para a cultivar PR 980.

SILVA (1978) observou que a maior mortalidade de plântulas, após o transplante, ocorreu quando foi utilizado o substrato ágar-água; entretanto, este substrato foi superior ao solo para seleção de plântulas resistentes a *U. scitaminea*.

Mais estudos são necessários para verificar-se a influência dos substratos na germinação de cariopses, colonização de plântulas por *U. scitaminea* e mortalidade de plântulas após o transplante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Inóculo

3.1.1 - Obtenção, armazenamento e teste de germinação

Os teliosporos de *U. scitaminea* foram produzidos em cana-de-açúcar, cultivar CP 52-1, em condições de casa de vegetação. Visando-se obter o máximo possível de teliosporos, livres de fungos contaminantes, o chicote foi revestido com saco de papel semipermeável. A coleta e o armazenamento dos teliosporos foram efetuados de acordo com as recomendações de MATA (1975) e MATA e TOKESHI (1976).

Nos ensaios, foram utilizados teliosporos coletados em dezembro de 1978 e janeiro de 1980 com 99 e 98% de germinação, respectivamente.

3.1.2 - Determinação qualitativa dos fungos contaminantes dos esporos de *U. scitaminea*

Dos teliosporos a serem analisados, foi preparada uma suspensão na concentração de 6×10^5 esporos/ml. Em seguida, foram retiradas, dessa suspensão, quatro alíquotas de 0,5 ml, que foram semeadas sobre o meio ágar-água (18 g de ágar por litro de água), contido em placas de Petri. Posteriormente, as placas foram incubadas sob condições de luz contínua (fornecida por nove lâmpadas fluorescentes, de 40 watts, luz do dia, a uma distância de aproximadamente um metro) e temperatura de 29°C, durante seis dias. Após esse período, foi feita a identificação dos fungos contaminantes de acordo com BARNETT e HUNTER (1972).

Os fungos contaminantes encontrados, nos teliosporos de *U. scitaminea*, foram *Monilia* sp e *Penicillium* sp para os coletados em dezembro de 1978 e *Monilia* sp para os de janeiro de 1980.

3.2 - Cariopses

3.2.1 - Origem, beneficiamento e armazenamento

Nos ensaios, foram utilizadas cariopses de cana-de-açúcar, obtidas por polinização livre das cultivares IAC 48/65 e CO 419 (provenientes da Estação de Floração e Cruzamento de Serra do Ouro, Alagoas, pertencente ao Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar - PLANALSUCAR) e da cultivar NA 56-79 (provenientes de dois lotes da Estação Experimental Frederico de Menezes Veiga,

Rio de Janeiro, pertencente ao PLANALSUCAR).

As cariopses sofreram pré-limpeza, de acordo com o processo preconizado por SILVA (1974). Posteriormente, foram submetidas à ventilação, com uma força de $9,6 \text{ mg/cm}^2$ (abertura do tubo 13), durante dois minutos, no assoprador marca Equilabor (BLEICHER, 1978 e BLEICHER e TOKESHI, 1980a). Em seguida, foram passadas em peneira 20 (20 malhas/polegada quadrada), com a finalidade de separar-se, o máximo possível, os pedúnculos das cariopses.

As cariopses beneficiadas foram armazenadas na câmara seca do Laboratório de Análise de Sementes da ESALQ. A câmara seca teve umidade relativa controlada para 35% aproximadamente e temperatura média de 23°C .

3.2.2 - Teste de germinação

As cariopses foram desinfetadas com hipoclorito de cálcio (hth), com 65% de cloro ativo, na dosagem de 1 g/100 ml de água destilada, durante cinco minutos. Em seguida, foram semeadas 50 cariopses por placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido. Foram utilizadas luz contínua (semelhante à de 3.1.2), temperatura de $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um total de quatro placas por cultivar.

A contagem de germinação foi realizada aos sete dias após a instalação do teste, e a avaliação das plântulas efetuada de acordo com as prescrições indicadas pelas Regras para Análise de Se.

mentes (BRASIL. Ministério da Agricultura, 1976).

O poder germinativo das cariopses foi: 'IAC 48/65' = 49%; 'CO 419' = 36%; 'NA 56-79' (lote 1) = 88% e 'NA 56-79' (lote 2) = 56%.

3.2.3 - Determinação quantitativa dos fungos contaminantes

Para determinação dos fungos contaminantes das cariopses foi utilizado o teste com papel de filtro. A desinfecção das cariopses foi semelhante à descrita em 3.2.2. Para manter-se a umidade, foi colocada, na placa de Petri, uma camada de algodão umedecida, abaixo dos papéis de filtro. A amostra consistiu de 400 cariopses, sendo semeadas 50 por placa. Posteriormente, as mesmas foram incubadas sob condições de luz contínua (semelhante à de 3.1.2) e temperatura de 29°C, durante seis dias.

Após o período de incubação, os fungos presentes nas cariopses foram identificados de acordo com BARNETT e HUNTER(1972).

3.2.3.1 - Testes de patogenicidade com *Colletotrichum falcatum*

O fungo *C. falcatum* foi isolado de cariopses de cana-de-açúcar, cultivar CO 419, durante o teste de germinação, e para testar-se a sua patogenicidade, o inóculo foi produzido em meio de aveia-ágar (100 g de aveia e 18 g de ágar por litro de água) sob condições de luz contínua (semelhante à de 3.1.2) e temperatura de 29

°C, durante vinte dias. A concentração do inóculo utilizada foi de 4×10^6 conídios/ml (KIMATI, 1975).

Os testes de patogenicidade foram realizados em plântulas e em folhas de cana-de-açúcar.

As cariopses, da cultivar CO 419, foram desinfetadas como descrito em 3.2.2 e colocadas para germinar em placas de Petri contendo ágar-água. Após a germinação, as plântulas foram examinadas ao microscópio estereoscópico e somente as aparentemente livres de fungos foram transplantadas para placas de Petri contendo ágar-água. Duas gotas da suspensão de esporos foram colocadas por plântula (SANGUINO, 1976).

Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo que cada repetição foi constituída por uma placa com dez plântulas.

A inoculação nas folhas foi realizada quando as plantas (cultivar CB 41-76) estavam com dois meses de idade e consistiu em colocar-se uma gota da suspensão de esporos no terço inferior da nervura central das quatro primeiras folhas abertas, e provocar-se um ferimento com uma agulha lanceolada (ABBOTT, 1938).

Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo que cada repetição foi constituída por um vaso com uma planta. O teste foi conduzido em condições de casa de vegetação.

Nos dois métodos de inoculação utilizados, os tratamentos considerados foram: inoculada e não inoculada (testemunha).

As testemunhas foram tratadas com água destilada esterilizada, e a avaliação feita dez dias após a inoculação.

3.3 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses

As cariopses, da cultivar IAC 48/65, foram desinfetadas com 1-óxido de zinco-2-piridinetiol (Zinco Omadine) com 48% de princípio ativo, na dosagem de 3 ml do produto comercial por litro de água, durante duas horas e, depois, lavadas com água destilada (BLEICHER, 1978).

Posteriormente, as cariopses foram colocadas em frascos de Kitassato, contendo 200 ml de água destilada esterilizada, e submetidas à vácuo de 0, 50, 100, 150 e 200 mm de Hg, durante dois minutos. Em seguida, foram semeadas 100 cariopses por bandeja de alumínio (4 x 19 x 28 cm), contendo 400 ml de substrato esterilizado ágar-água (15 gramas de ágar por litro de água destilada). Após a semeadura, as bandejas foram cobertas com vidro transparente e mantidas sob condições de luz contínua (semelhante à de 3.1.2) e temperatura de $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante sete dias (BLEICHER, 1978). Decorrido esse período, as cariopses germinadas foram contadas e a avaliação das plântulas procedida como em 3.2.2.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento (níveis de vácuo), sendo que cada parcela foi constituída por uma bandeja com cem

cariopses.

3.4 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

As cariopses, da cultivar IAC 48/65, tendo sido desinfetadas como descrito em 3.3, foram imersas numa suspensão de esporos de *U. scitaminea* na concentração de 6×10^6 esporos/ml e submetidas à vácuo de 0, 50, 150 e 250 mm de Hg, durante dois minutos. No preparo da suspensão de esporos foram adicionadas duas gotas de Tween 20 a 20%.

A semeadura (200 cariopses por bandeja) e incubação foram realizadas como descritas em 3.3.

As reinoculações, no segundo e sexto dia após a semeadura, foram feitas por pulverização, com uma suspensão de esporos de *U. scitaminea* na concentração de 6×10^6 esporos/ml (BLEICHER, 1978).

Doze dias após a semeadura das cariopses, sessenta plântulas por repetição, de cada tratamento, foram coletadas ao acaso e transferidas para tubos de cultura, procedendo-se à coloração dos tecidos pelo método de POPP (1958), com eliminação das lavagens por não interferirem nos resultados,

Concluído o processo de coloração, trinta plântulas por repetição de cada tratamento, foram examinadas ao microscópio, para determinar-se a presença ou ausência de micélio interno de *U. scitaminea*. As plântulas que apresentavam micélio interno, na raiz

primária, no mesocótilo ou nas folhas, foram consideradas colonizadas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento (níveis de vácuo), sendo que cada parcela foi constituída por trinta plântulas.

3.5 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

As cariopses, das cultivares NA 56-79 (lote 2) e CO 419, foram desinfetadas como descrito em 3.3. Três métodos de inoculação foram utilizados: a) as cariopses foram imersas numa suspensão de esporos de *U. scitaminea*, na concentração de 6×10^6 esporos/ml, e agitadas durante dois minutos; b) semelhante ao método a, porém submetidas à vácuo de 250 mm de Hg, durante dois minutos; c) as cariopses foram inoculadas, no dia da semeadura, por pulverização de esporos, na concentração já citada. No preparo da suspensão de esporos foram adicionadas duas gotas de Tween 20.

A semeadura de 150 e 250 cariopses por bandeja para as cultivares NA 56-79 (lote 2) e CO 419, respectivamente, e a incubação foram efetuadas como descritas em 3.3. As reinoculações no segundo e sexto dia após a semeadura, coleta das plântulas, coloração dos tecidos e avaliação foram efetuadas como em 3.4.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 3, sendo o primeiro fa-

tor as cultivares e o segundo os métodos de inoculação. Foram utilizadas quatro repetições, sendo que cada parcela foi constituída por trinta plântulas.

3.6 - Influência da Cultivar e Inoculação com *U. scitaminea* na Mortalidade de Plântulas

As cariopses, das cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), foram desinfetadas como descrito em 3.3. As cariopses não inoculadas (testemunha) foram imersas em água destilada esterilizada, durante dois minutos; e as cariopses inoculadas foram imersas na suspensão de esporos de *U. scitaminea* e submetidas à vácuo de 50 mm de Hg, durante dois minutos.

Das cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), foram semeadas, respectivamente, 250 e 100 cariopses por bandeja de alumínio contendo o substrato esterilizado vermiculita (700 cc de vermiculita, de origem Minebra e tipo nº 2, mais 400 cc de água destilada), coberto com papel higiênico de folha dupla, marca Delsey.

A incubação e as reinoculações, no segundo e sexto dia após a semeadura, foram efetuadas como descritas em 3.3 e 3.4, respectivamente.

Oito dias após a semeadura, cinquenta plântulas normais, de cada bandeja, foram transplantadas para caixa de madeira (9 x 31 x 41 cm) contendo uma mistura de solo esterilizado e vermiculita na proporção de 1:1 e mantidas em condições de casa de vege-

tação. As caixas foram colocadas em câmara úmida, sendo esta retirada, paulatinamente, do segundo ao quarto dia após o transplante.

No terceiro dia após o transplante, e a partir daí, semanalmente, por três semanas consecutivas foram feitas pulverizações com dissulfeto de tetrametil thiuram (Auram 700) com 70% do princípio ativo, na dosagem de um grama do produto comercial por litro de água. Também foram feitas adubações semanais com Greenzit A (Ciba Geigy), constituído por NPK (9:18:6) e micronutrientes, na dosagem de 3 ml por litro de água.

A contagem das plântulas sobreviventes foi efetuada trinta dias após o transplante.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 2, sendo o primeiro fator as cultivares e o segundo a inoculação. Foram utilizadas oito repetições, sendo que cada parcela foi constituída por uma caixa com cinquenta plântulas.

3.7 - Relação entre a Presença de Micélio de *U. scitaminea* nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes

As plantas utilizadas neste ensaio, provenientes do ensaio descrito em 3.6, são referentes às cariopses inoculadas das duas cultivares. Foram utilizadas cem plantas por cultivar, retiradas ao acaso, das oito repetições, aos quarenta dias após o transplante. As plantas foram transferidas, individualmente, para sacos de polietileno contendo solo esterilizado e, em seguida, numeradas.

Vinte dias depois, uma parte das três folhas expandidas mais próximas do ápice, de cada planta, foi destacada e dividida em porções de aproximadamente 3 cm de comprimento. Quatro dessas porções, de cada planta, foram retiradas ao acaso e submetidas ao processo de coloração descrito em 3.4.

A avaliação foi expressa em presença ou ausência de micélio interno nas amostras dos tecidos foliares examinadas ao microscópio.

As plantas permaneceram 90 dias nos sacos de polietileno, anotando-se o número da planta que apresentava chicote, a qual era eliminada em seguida. Após esse período, as plantas restantes foram podadas e transferidas para o campo do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, onde se continuou, até 14 meses após a semeadura, a anotar o aparecimento de chicote e a eliminação da planta correspondente.

3.8 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea* e na Mortalidade de Plântulas

Este ensaio consistiu na comparação dos fotoperíodos de 12 e 24 horas de luz, quanto à colonização de plântulas por *U. scitaminea* e à mortalidade de plântulas após o transplante.

As cariopses, da cultivar NA 56-79 (lote 2), foram desinfetadas como descrito em 3.3. Posteriormente, foram imersas numa suspensão, na concentração de 6×10^6 esporos/ml, e agitadas du-

rante dois minutos. A semeadura (300 cariopses por bandeja) e as reinoculações no segundo e sexto dia após a semeadura foram efetuadas como descritas em 3.6 e 3.4, respectivamente.

A incubação foi feita no germinador de sementes, FANEM Ltda. - Modelo 348, à temperatura constante de 30°C com luz contínua (fornecida por oito lâmpadas fluorescentes, de 40 watts, luz do dia). As bandejas, correspondentes ao fotoperíodo de doze horas de luz, foram cobertas, individualmente, com plástico preto.

A coleta das plântulas, coloração dos tecidos e avaliação das plântulas colonizadas foram efetuadas como em 3.4.

Para determinar-se a influência do fotoperíodo na mortalidade de plântulas, cinquenta plântulas, de cada bandeja, foram transplantadas para caixa de madeira, adotando-se o mesmo procedimento de 3.6. As adubações e pulverizações após o transplante e a contagem das plântulas sobreviventes seguiram também os procedimentos de 3.6.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento (fotoperíodos). A parcela foi constituída por: trinta plântulas (colonização) e uma caixa com cinquenta plântulas (mortalidade).

3.9 - Influência do Substrato e Inoculação com *U. scitaminea* na Germinação de Cariopses, Colonização e Mortalidade de Plântulas

As cariopses, da cultivar NA 56-79 (lote 2), foram desinfetadas como em 3.3. Os substratos utilizados foram ágar-água e vermiculita cujas composições foram discriminadas, respectivamente, em 3.3 e 3.6.

3.9.1 - Influência do substrato e inoculação na germinação

Os tratamentos considerados foram: a) cariopses inoculadas e semeadas em ágar-água; b) cariopses inoculadas e semeadas em vermiculita; c) cariopses não inoculadas (testemunha) e semeadas em ágar-água e d) cariopses não inoculadas (testemunha) e semeadas em vermiculita.

Foram semeadas 400 cariopses por bandeja. A inoculação antes da semeadura, as reinoculações no segundo e sexto dia após a semeadura e a incubação foram efetuadas como descritas em 3.8, 3.4 e 3.3, respectivamente.

A contagem de germinação foi realizada aos doze dias e a avaliação das plântulas procedida como em 3.2.2.

3.9.2 - Influência do substrato na colonização

Doze dias após a semeadura, sessenta plântulas por bandeja, dos tratamentos a e b (3.9.1), foram coletadas ao acaso e

transferidas para tubo de cultura. A coloração dos tecidos e a avaliação das plântulas colonizadas foram efetuadas como em 3.4.

3.9.3 - Influência do substrato e inoculação na mortalidade

Cinquenta plântulas por bandeja, de cada tratamento (3.9.1), foram transplantadas para caixa de madeira, adotando-se o mesmo procedimento de 3.6. As adubações e pulverizações após o transplante e a contagem das plântulas sobreviventes seguiram também os procedimentos de 3.6.

3.9.4 - Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. Na germinação e mortalidade de plântulas, o mesmo foi utilizado em esquema fatorial 2 x 2, sendo o primeiro fator os substratos e o segundo a inoculação. A parcela foi constituída por: uma bandeja com quatrocentas cariopses (germinação), trinta plântulas (colonização) e uma caixa com cinquenta plântulas (mortalidade).

3.10 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas

Nos ensaios descritos em 3.6, 3.8 e 3.9.3, após o transplante para as caixas de madeira até o dia da contagem das plântulas sobreviventes, as plântulas que iam morrendo, de cada tratamento, eram colocadas num mesmo vidro contendo Hyamine a 0,1% (TUI-

TE, 1969) e armazenadas, em geladeira, a 5°C.

Terminada a coleta, as plântulas foram transferidas para tubos de cultura, procedendo-se a coloração dos tecidos de maneira semelhante à de 3.4.

Concluído o processo de coloração, mais de 50% das plântulas mortas, de cada tratamento e de cada ensaio, foram examinadas ao microscópio para determinar-se a presença de fungos internos na raiz, no mesocótilo ou nas folhas. Os fungos foram identificados pela chave de classificação de BARNETT e HUNTER (1972) e pelas características morfológicas, de alguns fungos, descritas por DUARTE (1976) e DUARTE e TOKESHI (1978).

3.11 - Análise Estatística dos Dados

Inicialmente, todos os dados expressos em percentagens foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$, onde p significa a percentagem considerada. Antes porém, os valores de p iguais a zero foram substituídos por $100/4n$, onde n significa o denominador usado no cálculo das percentagens (BARTLETT, 1947).

Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se os esquemas da análise de variância adotados para os ensaios sem e com esquema fatorial, respectivamente.

Tabela 1 - Esquema da análise de variância adotado para os ensaios sem esquema fatorial.

Causa de Variação	G.L.
Tratamentos	$t-1$
Resíduo	$m-t$
Total	$m-1$

onde:

t = número de tratamentos;

m = número total de parcelas existentes.

Tabela 2 - Esquema da análise de variância adotado para os ensaios com esquema fatorial.

Causa de Variação	G.L.
Primeiro fator (A)	$s-1$
Segundo fator (B)	$v-1$
Interação A x B	$(s-1)(v-1)$
(Tratamentos)	$(sv-1)$
Resíduo	$sv(r-1)$
Total	$svr-1$

onde:

s = número de níveis do primeiro fator;

v = número de níveis do segundo fator;

r = número de repetições.

Para os casos em que o teste F foi significativo, e tendo-se mais de dois tratamentos, as comparações entre as médias dos tratamentos foram feitas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para indicar-se que dois ou mais tratamentos não diferiram estatisticamente, acrescentou-se, após as suas médias (dados transformados), letras minúsculas iguais.

A relação entre a presença de micélio de *U. scitami-nea* nas folhas e o aparecimento de chicotes foi analisada estatisticamente pelo teste qui-quadrado (χ^2). Para verificar-se se as plantas com micélio diferiam estatisticamente das plantas sem micélio, quanto ao período de produção de chicotes, utilizou-se também o teste qui-quadrado (χ^2).

Neste trabalho, o termo plantas sem micélio nas folhas é equivalente a plantas nas quais não foi detectado micélio nas folhas.

4. RESULTADOS

4.1 - Determinação Quantitativa dos Fungos Contaminantes de Cariopses

Os fungos encontrados nas cariopses, das cultivares IAC 48/65, CO 419 e NA 56-79 (lote 2), são apresentados na Tabela 3.

4.1.1 - Testes de patogenicidade com *C. falcatum*

Foi observada mortalidade de plântulas ('CO 419') em 80,00%, e nas plantas ('CB 41-76') verificou-se a formação de lesões e frutificação do fungo na nervura central das folhas.

Tabela 3 - Fungos encontrados nas cariopses de três cultivares de cana-de-açúcar.

FUNGOS CONTAMINANTES	% de Cariopses ^{a/} Contaminadas das Cultivares		
	IAC 48/65	CO 419	NA 56-79 (lote 2)
<i>Alternaria</i> spp	0,25	0,00	0,50
<i>Chaetomium</i> sp	5,00	0,00	0,75
<i>Colletotrichum falcatum</i>	0,00	10,50	0,00
<i>Curvularia</i> spp	5,25	0,00	0,50
<i>Epicocum</i> sp	0,00	8,00	3,00
<i>Helminthosporium</i> spp	0,00	0,50	1,25
<i>Nigrospora</i> spp	1,00	0,00	2,50
<i>Penicillium</i> sp	0,50	3,50	0,50
<i>Pestalotia</i> sp	0,25	0,00	0,00
<i>Phoma</i> sp	1,00	5,00	13,25
<i>Rhizoctonia</i> sp	0,00	0,00	0,25
<i>Septoria</i> sp	0,00	0,50	0,00
<i>Indeterminados</i>	1,25	0,00	0,75
Total	14,50	28,00	23,25

^{a/} A amostra consistiu de 400 cariopses por cultivar.

4.2 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses

A análise de variância revelou valor de F significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para os vários níveis de vácuo utilizados.

As médias dos dados em percentagem de germinação, e transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$, acham-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Influência do vácuo na germinação de cariopses da cultivar IAC 48/65.

VÁCUO (mm de Hg)	MÉDIA ^{a/}	
	(%)	(arc sen $\sqrt{p/100}$)
0	39,40	38,85 a
50	37,40	37,70 ab
100	32,00	34,44 b
150	32,25	34,56 b
200	31,60	34,18 b

C.V.(%) = 5,73

D.M.S.(5%): $\left\{ \begin{array}{l} (5 \text{ repetições} \times 5 \text{ repetições}) = 3,92 \\ (5 \text{ repetições} \times 4 \text{ repetições}) = 4,16 \end{array} \right.$

a/ Proveniente de 5 repetições, exceto para 150 mm de Hg com 4; cada repetição foi constituída por 100 cariopses.

4.3 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

Para os dados de percentagem de plântulas colonizadas por *U. scitaminea*, a análise de variância revelou que não houve

diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, para os vários níveis de vácuo utilizados.

As médias dos dados em percentagem de plântulas colonizadas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Influência do vácuo na colonização de plântulas por *U. scitaminea*. Cultivar IAC 48/65.

V Á C U O (mm de Hg)	M É D I A ^{a/} (%)
0	45,56
50	49,44
150	48,89
250	48,03

C.V.(%) = 12,75

a/ Proveniente de 6 repetições, cada uma constituída por 30 plântulas.

4.4 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

A análise de variância não acusou diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, para métodos de inoculação, cultivares e interação métodos de inoculação x cultivares.

As médias dos dados em percentagem de plântulas colonizadas, referentes aos métodos de inoculação e cultivares, são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação de métodos de inoculação na colonização de plântulas, por *U. scitaminea*, de duas cultivares de cana-de-açúcar.

CULTIVAR	Média ^{a/} em % para os Métodos de Inoculação			Média
	Sem vácuo	Com vácuo ^{b/}	Pulverização	
CO 419	19,17	24,17	22,50	21,95
NA 56-79 (lote 2)	18,33	18,34	8,34	15,00
Média	18,75	21,26	15,42	

C.V.(%) = 28,65

a/ Proveniente de 4 repetições, cada uma constituída por 30 plântulas.

b/ De 250 mm de Hg.

4.5 - Influência da Cultivar e Inoculação com *U. scitaminea* na Mortalidade de Plântulas

Na análise de variância foram encontrados valores de F significativos, ao nível de 1% de probabilidade, para os fatores cultivares e inoculação. Entretanto, a interação desses fatores não foi significativa, ao nível de 5% de probabilidade.

As médias dos dados em percentagem de plântulas mortas, e transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$, referentes aos fatores cultivares e inoculação, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Influência da inoculação com *U. scitaminea* na mortalidade de plântulas de duas cultivares de cana-de-açúcar.

CULTIVAR	M É D I A ^{a/} (%)		Média	M É D I A ^{a/} (arc sen $\sqrt{p/100}$)		Média
	Test.	Inoc.		Test.	Inoc.	
CO 419	13,50	23,29	18,40	20,85	27,80	24,33 a
NA 56-79 (lote 1)	4,00	16,50	10,25	10,62	23,52	17,07 b
Média	8,75	19,90		15,74 b	25,66 a	

C.V.(%) = 34,29

a/ Proveniente de 8 repetições, cada uma constituída por 50 plântulas.

Obs.: Test. = Testemunha; Inoc. = Inoculada.

4.6 - Relação entre a Presença de Micélio de *U. scitaminea* nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes

Nas Tabelas 8 e 9 encontram-se os resultados, referentes ao estudo da relação entre a presença de micélio nas folhas e o aparecimento de chicotes, para as cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), respectivamente. Por outro lado, nas Tabelas 10 e 11 são apresentados os resultados, referentes às comparações das plantas com micélio e sem micélio nas folhas quanto ao período de produção de chicotes, para as cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), respectivamente.

Tabela 8 - Relação entre a presença de micélio de *U. scitaminea* nas folhas e o aparecimento de chicotes. Cultivar CO 419.

MICÉLIO NAS FOLHAS	CHICOTE		Total
	Com	Sem	
Presente	31 (20,16)	1 (11,84)	32
Ausente	32 (42,84)	36 (25,16)	68
Total	63	37	100

$\chi^2_c = 23,17$ (teste qui-quadrado significativo ao nível de 0,1% de probabilidade)

Obs.: Os valores entre parênteses correspondem às frequências esperadas.

Tabela 9 - Relação entre a presença de micélio de *U. scitaminea* nas folhas e o aparecimento de chicotes. Cultivar NA 56-79 (lote 1).

MICÉLIO NAS FOLHAS	CHICOTE		Total
	Com	Sem	
Presente	34 (23,56)	4 (14,44)	38
Ausente	28 (38,44)	34 (23,56)	62
Total	62	38	100

$\chi^2_c = 19,64$ (teste qui-quadrado significativo ao nível de 0,1% de probabilidade)

Obs.: Os valores entre parênteses correspondem às frequências esperadas.

Tabela 10 - Comparação das plantas com micélio e sem micélio de *U. scitaminea* nas folhas, quanto ao período de produção de chicotes. Cultivar CO 419.

MICÉLIO NAS FOLHAS	PERÍODO DE PRODUÇÃO		Total
	até 4 meses	5-14 meses	
Presente	30 (15,75)	1 (15,25)	31
Ausente	2 (16,25)	30 (15,75)	32
Total	32	31	63

$\chi^2_c = 51,63$ (teste qui-quadrado significativo ao nível de 0,1% de probabilidade)

Obs.: Os valores entre parênteses correspondem às frequências esperadas.

Tabela 11 - Comparação das plantas com micélio e sem micélio de *U. scitaminea* nas folhas, quanto ao período de produção de chicotes. Cultivar NA 56-79 (lote 1).

MICÉLIO NAS FOLHAS	PERÍODO DE PRODUÇÃO		Total
	até 4 meses	5-14 meses	
Presente	29 (16,45)	5 (17,55)	34
Ausente	1 (13,55)	27 (14,45)	28
Total	30	32	62

$\chi^2_c = 41,06$ (teste qui-quadrado significativo ao nível de 0,1% de probabilidade)

Obs.: Os valores entre parênteses correspondem às frequências esperadas.

Na Figura 1 encontra-se a representação gráfica das percentagens mensais de produção de chicotes de *U. scitaminea*, pelas cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1).

Figura 1 - Representação gráfica das percentagens mensais de produção de chicotes de *Ustilago scitaminea*, pelas cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1).

4.7 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea* e na Mortalidade de Plântulas

A análise de variância revelou que os fotoperíodos de 12 e 24 horas de luz não diferiram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, em relação à colonização de plântulas por *U. scitaminea* e a mortalidade de plântulas após o transplante.

As médias dos dados em percentagens de plântulas colonizadas e mortas são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Influência do fotoperíodo na colonização de plântulas por *U. scitaminea* e na mortalidade de plântulas da cultivar NA 56-79 (lote 2).

FOTOPERÍODO (horas de luz)	M É D I A ^{a/} (%)	
	Colonização	Mortalidade
12	32,20	58,50
24	32,92	52,75
C.V.(%)	14,30	11,31

a/ Proveniente de 8 repetições, cada uma constituída por 30 plântulas (colonização) e 50 (mortalidade).

4.8 - Influência do Substrato e Inoculação com *U. scitaminea* na Germinação de Cariopses, Colonização e Mortalidade de Plântulas

4.8.1 - Influência do substrato e inoculação na germinação

Na análise de variância foram encontrados valores de F significativos, ao nível de 1% de probabilidade, para os fatores substratos e inoculação. Porém, a interação desses fatores não foi significativa, ao nível de 5% de probabilidade.

As médias dos dados em percentagem de germinação, e transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$, referentes aos fatores substratos e inoculação, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Influência do substrato e inoculação na germinação de cariopses da cultivar NA 56-79 (lote 2).

SUBSTRATO	M É D I A ^{a/} (%)		Média	M É D I A ^{a/} (arc sen $\sqrt{p/100}$)		Média
	Test.	Inoc.		Test.	Inoc.	
Ágar-água	41,17	33,42	37,30	39,91	35,30	37,61 b
Vermiculita	49,91	46,16	48,04	44,95	42,79	43,87a
Média	45,54	39,79		42,43a	39,05 b	

C.V.(%) = 4,77

^{a/} Proveniente de 8 repetições, cada uma constituída por 400 cariopses.

Obs.: Test. = Testemunha; Inoc. = Inoculada.

4.8.2 - Influência do substrato na colonização

A análise de variância acusou que os substratos ágar-
-água e vermiculita diferiram significativamente, ao nível de 1% de
probabilidade, em relação à colonização de plântulas por *U. scitami*
nea.

As médias dos dados em percentagem de plântulas colo-
nizadas, e transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$, são apresentadas na Ta-
bela 14.

Tabela 14 - Influência do substrato na colonização de plântulas por
U. scitaminea. Cultivar NA 56-79 (lote 2).

SUBSTRATO	M É D I A ^{a/}	
	(%)	(arc sen $\sqrt{p/100}$)
Ágar-água	24,37	29,52 b
Vermiculita	45,00	42,11 a

C.V.(%) = 8,05

a/ Proveniente de 8 repetições, cada uma constituída por 30 plântu-
las.

4.8.3 - Influência do substrato e inoculação na mortalidade

A análise de variância não acusou diferença signifi-
cativa, ao nível de 5% de probabilidade, para substratos, inoculação

e interação desses fatores.

As médias dos dados em percentagem de plântulas mortas, referentes aos fatores substratos e inoculação, encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Influência do substrato e inoculação com *U. scitaminea* na mortalidade de plântulas da cultivar NA 56-79 (lote 2).

SUBSTRATO	M É D I A ^a (%)		Média
	Testemunha	Inoculada	
Ágar-água	68,25	68,50	68,38
Vermiculita	69,25	73,00	71,13
Média	68,75	70,75	

C.V.(%) = 9,33

^a/ Proveniente de 8 repetições, cada uma constituída por 50 plântulas.

4.9 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas

As percentagens de fungos encontrados nas plântulas mortas, após o transplante, referentes aos ensaios descritos em 3.6, 3.8 e 3.9.3, encontram-se na Tabela 16. Para as cariopses inoculadas desses ensaios, na Tabela 17 apresenta-se a percentagem de *U. scitaminea* em relação à dos outros fungos nas plântulas mortas.

Tabela 16 - Percentagens de fungos encontrados nas plântulas mortas, em três ensaios (A, descrito em 3.6; B, em 3.8 e C, em 3.9.3).

FUNGO	ENSAIO A				ENSAIO B				ENSAIO C			
	Cultivar				Fotoperíodo				Substrato			
	NA 56-79				(horas de luz)				Vermiculita			
	(lote 1)											
	Test.	Inoc.	Test.	Inoc.	Test.	Inoc.	Test.	Inoc.	Test.	Inoc.	Test.	Inoc.
<i>Alternaria</i> spp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,71	1,33	0,71	0,71	0,00	0,00
<i>Chaetomium</i> sp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	2,14	3,16	0,00
<i>C. falcatum</i>	15,15	1,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Curvularia</i> spp	0,00	9,62	0,00	8,00	10,14	4,86	5,71	6,67	9,29	6,33	0,00	0,00
<i>Epicoccum</i> sp	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,67	1,43	0,00	0,00	0,00
<i>Helminthosporium</i> spp	3,03	0,00	33,33	0,00	0,68	2,08	6,43	6,00	5,00	6,33	0,00	0,00
<i>Nigrospora</i> spp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Phoma</i> sp	9,09	1,92	8,33	20,00	27,70	18,75	42,86	28,67	52,14	37,97	0,00	0,00
<i>Pyrenochaeta</i> sp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,63	0,00	0,00
<i>Pithomices</i> sp	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp	3,03	1,92	0,00	0,00	0,00	0,69	0,71	0,67	2,14	8,23	0,00	0,00
<i>U. scitaminea</i>	0,00	86,56	0,00	82,00	20,27	20,13	0,00	8,00	0,00	33,55	0,00	0,00
Indeterminados	9,09	3,85	16,67	2,00	16,89	11,81	19,29	30,67	15,71	17,72	0,00	0,00
Sem fungo	60,61	0,00	41,67	2,00	33,78	43,05	28,57	22,00	20,71	11,38	0,00	0,00
TOTAL	100,00	105,79	100,00	118,00	110,14	104,14	104,28	105,35	109,27	125,30	0,00	0,00

Obs.: Test. = Testemunha; Inoc. = Inoculada.

Nos ensaios B e C foram utilizadas cariopses da cultivar NA 56-79 (lote 2).

As somas das percentagens superiores a 100% devem-se ao fato de que, às vezes, uma plântula estava colonizada por dois ou mais fungos.

Tabela 17 - Percentagem de *U. scitaminea* em relação à dos outros fungos, nas plântulas mortas, em 3 ensaios (A, descrito em 3.6; B, em 3.8 e C, em 3.9.3).

FUNGO	ENSAIO A		ENSAIO B		ENSAIO C	
	Cultivar		Fotoperíodo (horas de luz)		Substrato	
	CO 419	NA 56-79 (lote 1)	12	24	Ágar-água	Vermiculita
<i>U. scitaminea</i>	19,26 (82,70)	10,89 (66,00)	7,51 (12,84)	9,89 (18,75)	4,11 (6,00)	11,55 (15,82)
<i>U. scitaminea</i> e outros fungos	0,90 (3,86)	2,64 (16,00)	4,35 (7,43)	0,73 (1,38)	1,37 (2,00)	12,94 (17,73)
Outros fungos	3,13 (13,44)	2,64 (16,00)	26,88 (45,95)	19,42 (36,82)	47,95 (70,00)	40,20 (55,07)
Sem fungo	0,00 (0,00)	0,33 (2,00)	19,76 (33,78)	22,71 (43,05)	15,07 (22,00)	8,31 (11,38)
Total	23,29(100,00)	16,50(100,00)	58,50(100,00)	52,75(100,00)	68,50(100,00)	73,00(100,00)

Obs.: Nos ensaios B e C foram utilizadas cariopses da cultivar NA 56-79 (lote 2).
As percentagens entre parênteses foram calculadas sobre cada total.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Determinação Quantitativa dos Fungos Contaminantes de Cariopses

De uma maneira geral, os gêneros de fungos patogênicos encontrados por SANGUINO (1976), SILVA (1978) e SANGUINO e TOKESHI (1980), em cariopses de cana-de-açúcar, também foram observados no presente trabalho.

Entre os fungos contaminantes encontrados, destaca-se, em cariopses da cultivar CO 419, a presença do *C. falcatum*. Espécies de *Colletotrichum* de outras gramíneas são normalmente transmitidos pelas sementes (MINUSSI, 1977). Neste trabalho ficou demonstrado que *C. falcatum* não foge a essa regra.

Os gêneros encontrados em percentagens mais altas fo

ram: *Curvularia* (5,25%), *Colletotrichum* (10,50%) e *Phoma* (13,25%), para as cultivares IAC 48/65, CO 419 e NA 56-79 (lote 2), respectivamente. De um modo geral, os gêneros de fungos patogênicos que ocorreram nas cariopses, de uma cultivar, também foram encontrados em plântulas mortas (Tabela 16), evidenciando, assim, que os mesmos são responsáveis pela morte, de grande parte, de plântulas após o transplante.

5.1.1 - Testes de patogenicidade com *C. falcatum*

Demonstrada a patogenicidade de *C. falcatum*, obtido de cariopses da 'CO 419', fica evidente que este fungo se comporta como o *Colletotrichum* do sorgo, reforçando a teoria de que pertence a "formae speciales" de *C. graminicola* proposta por KIMATI (1975).

Na literatura não foi encontrada nenhuma referência sobre este fungo, causando morte de plântulas e sendo transmitido por cariopses de cana-de-açúcar. Logo, acredita-se ser este o primeiro relato de tais ocorrências.

5.2 - Influência do Vácuo na Germinação de Cariopses

Com relação à germinação de cariopses (cultivar IAC 48/65), as que não foram submetidas à vácuo não diferiram estatisticamente das submetidas à vácuo de 50 mm de Hg, durante dois minutos. No entanto, a germinação foi afetada pelos níveis de vácuo de 100, 150 e 200 mm de Hg (Tabela 4). Provavelmente, a queda do poder ger-

minativo das cariopses, submetidas à vácuo, foi devida às danificações mecânicas nos embriões. Resultados semelhantes foram obtidos por BLEICHER (1978) e BLEICHER e TOKESHI (1980), que utilizaram quatro níveis de vácuo, na faixa de 250 a 550 mm de Hg. Danificações resultantes do uso do vácuo foram mencionadas por SANGUINO e TOKESHI (1976), na brotação de gemas de cana-de-açúcar, e por ROSS *et alii* (1948), nos colmos de cevada.

5.3 - Influência do Vácuo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

O uso do vácuo de 50, 150 e 250 mm de Hg não interferiu significativamente na colonização de plântulas por *U. scitaminea*, para a cultivar IAC 48/65. Entretanto, observou-se uma tendência de aumentar a colonização de plântulas, por *U. scitaminea*, com o uso do vácuo (Tabela 5). BLEICHER (1978) e BLEICHER e TOKESHI (1980) obtiveram aumento significativo na percentagem de plântulas colonizadas, oriundas de cariopses da cultivar CO 62-175 e inoculadas com vácuo de 250 mm de Hg. Infelizmente, não foi possível utilizar-se, neste ensaio, esta cultivar.

5.4 - Comparação de Métodos de Inoculação na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea*

As cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 2) não diferiram estatisticamente quanto à colonização de plântulas por *U. scita*

minea. O mesmo ocorreu para os métodos de inoculação sem vácuo, com vácuo de 250 mm de Hg e por pulverização (Tabela 6). A inoculação com vácuo apresentou uma tendência de maior percentagem de plântulas colonizadas em relação à inoculação sem vácuo, somente para a cultivar CO 419, o que também foi verificado (Tabela 5) no ensaio descrito em 3.4, para a cultivar IAC 48/65. Entretanto, a inoculação com vácuo apresentou essa mesma tendência em relação à inoculação por pulverização, para as duas cultivares.

5.5 - Influência da Cultivar e Inoculação com *U. scitaminea* na Mortalidade de Plântulas

Quanto à mortalidade de plântulas após o transplante, as cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1) diferiram estatisticamente (Tabela 7). A cultivar NA 56-79 (lote 1) apresentou menor percentagem de plântulas mortas, o que, em parte, era esperado pela melhor qualidade das cariopses, evidenciada no teste de germinação (88%). Estes resultados indicam a necessidade de utilizarem-se cariopses de melhor qualidade, visando-se obter melhor eficiência no método de inoculação em cariopses com *U. scitaminea*.

O efeito da inoculação em cariopses com *U. scitaminea* sobre a mortalidade de plântulas após o transplante foi significativo, sendo que as cariopses inoculadas apresentaram maior percentagem de plântulas mortas (Tabela 7). Este evento pode ser atribuído ao maior vigor das cariopses neste ensaio (1 mês de armazenamento),

que provavelmente fez com que a mortalidade de plântulas por *U. scitaminea* fosse mais evidenciada após o transplante. Observa-se na Tabela 17 que, entre as plântulas mortas, as colonizadas somente por *U. scitaminea* constituem as maiores percentagens, ou sejam, 82,70 e 66,00%, para as cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), respectivamente.

A hipótese da influência do vigor das cariopses sobre a mortalidade de plântulas inoculadas com *U. scitaminea* poderia ser avaliada pela germinação das cariopses inoculadas e não inoculadas, porém, infelizmente, neste ensaio, não foi efetuada. Entretanto, nos ensaios descritos em 3.9.1 e 3.9.3, nos quais foi utilizada a cultivar NA 56-79 (lote 2), com nove meses de armazenamento, esta hipótese parece mais provável. Isto porque, as cariopses inoculadas e não inoculadas diferiram significativamente quanto à germinação (Tabela 13), e não diferiram significativamente quanto à mortalidade de plântulas após o transplante (Tabela 15). Supõe-se, portanto, que o vigor das cariopses pode ter influência na mortalidade de plântulas, causada por *U. scitaminea*, antecipando-a ou retardando-a.

5.6 - Relação entre a Presença de Micélio de *U. scitaminea* nas Folhas e o Aparecimento de Chicotes

Para as cultivares CO 419 e NA 56-79 (lote 1), o teste χ^2 (Tabelas 8 e 9) foi significativo, ao nível de 0,1% de probabilidade, evidenciando, assim, uma estreita relação entre a presença de micélio de *U. scitaminea* nas folhas e o aparecimento de chicotes. Es

tes resultados confirmam as observações de DUARTE (1976) e DUARTE e TOKESHI (1978), para a cultivar PR 980. Em termos médios, aproximadamente 93% das plantas com micélio nas folhas produziram chicotes.

Para as duas cultivares, o teste χ^2 (Tabelas 10 e 11) foi significativo, ao nível de 0,1% de probabilidade, indicando, assim, que as plantas com micélio e sem micélio nas folhas diferiram estatisticamente quanto ao período de produção de chicotes. Em termos médios, aproximadamente 91% das plantas com micélio emitiram chicotes precocemente (até 4 meses após a semeadura), ao passo que aproximadamente 95% das plantas sem micélio emitiram chicotes tardiamente (5-14 meses após a semeadura).

Embora a percentagem de plantas sem micélio nas folhas observada neste ensaio seja, em termos médios, quase a mesma encontrada por DUARTE (1976) e DUARTE e TOKESHI (1978), a percentagem de plantas sem micélio que produziram chicotes foi bem maior neste ensaio. Entretanto, ressalte-se que esses autores observaram o aparecimento de chicotes somente até 100 dias após a semeadura.

O fato de não se ter detectado micélio, nas amostras dos tecidos foliares das plantas que produziram chicotes tardiamente, pode ter sido em decorrência da pequena quantidade de micélio presente nas folhas e, principalmente, à fisiologia de resistência dessas plantas retardando a colonização e esporulação.

Verifica-se na Figura 1, que as duas cultivares apre

sentaram praticamente a mesma distribuição quanto à produção de chicotes. Este fato pode ser um indício da herdabilidade de resistência a *U. scitaminea*, de origem materna, pois a cultivar CO 419 é o progenitor feminino da NA 56-79. SILVA (1978) concluiu que há indicações de que o progenitor feminino tem influência na reação da progênie a *U. scitaminea*. Os primeiros chicotes apareceram de 1-2 meses e as incidências máximas de 2-3 meses após a semeadura. Observações semelhantes foram feitas por DURAIRAJ *et alii* (1972).

Aproximadamente 50% da produção de chicotes ocorreu até o quarto mês após a semeadura. No período de 4-5 meses, as plantas não produziram chicotes, provavelmente em decorrência da poda e posterior transplante para o campo. Embora na Figura 1 não conste, salienta-se que no período de 13-14 meses após a semeadura houve a produção de um chicote na cultivar NA 56-79 (lote 1).

Como a percentagem de produção de chicotes decresceu consideravelmente a partir do oitavo mês após a semeadura, sugere-se que, para essas cultivares, as observações sejam efetuadas até esse período.

5.7 - Influência do Fotoperíodo na Colonização de Plântulas por *U. scitaminea* e na Mortalidade de Plântulas

Não foram observadas diferenças significativas entre os fotoperíodos de 12 e 24 horas de luz, quanto à colonização de plântulas por *U. scitaminea* e à mortalidade de plântulas após o

transplante, para a cultivar NA 56-79 (lote 2) (Tabela 12). Observa-se que as percentagens de plântulas colonizadas por *U. scitaminea* foram praticamente iguais para os dois fotoperíodos. Estes resultados foram, em parte, confirmados pela mortalidade de plântulas após o transplante deste ensaio, pois, entre elas, as percentagens de colonizadas por *U. scitaminea* foram também praticamente iguais para os dois fotoperíodos (Tabela 16).

Na literatura consultada não foi encontrada nenhuma referência sobre o assunto, relacionada ao gênero *Ustilago*. Porém, segundo AGRIOS (1969), o fotoperíodo pode também ter efeito sobre o desenvolvimento de uma doença, primeiramente sobre a planta hospedeira. Assim, supõe-se que os fotoperíodos não exerceram influência significativa, provavelmente porque foram utilizados nos primeiros dias de vida da hospedeira (8 e 12 dias para a mortalidade e colonização de plântulas), época em que as plântulas ainda dependem das reservas das cariopses.

Os resultados obtidos demonstraram que câmaras com luz contínua podem ser usadas para as inoculações em cariopses com *U. scitaminea*, sem perda da eficiência do método.

5.8 - Influência do Substrato e Inoculação com *U. scitaminea* na Germinação de Cariopses, Colonização e Mortalidade de Plântulas

5.8.1 - Influência do substrato e inoculação na germinação

Com relação à germinação de cariopses (cultivar NA 56-79, lote 2), o substrato vermiculita foi estatisticamente superior ao substrato ágar-água (Tabela 13). Observou-se que as plântulas originadas das cariopses semeadas em vermiculita apresentavam maior desenvolvimento da raiz primária do que as originadas das cariopses semeadas em ágar-água, provavelmente devido às melhores condições de aeração e troca iônica no substrato vermiculita.

Observa-se, na Tabela 13, que a germinação das cariopses inoculadas com *U. scitaminea* foi estatisticamente inferior à das cariopses não inoculadas. SANGUINO e TOKESHI (1976), utilizando a mesma concentração de esporos de *U. scitaminea* e a mesma cultivar, observaram que a inoculação reduziu a brotação de gemas. Resultados semelhantes foram obtidos por Thren (1938), citado por LIVINGSTON (1942), LIVINGSTON (1942) e WELLS e PLATT (1949), para sementes de cevada inoculadas com *Ustilago nuda*. SILVA (1978) verificou que o efeito da inoculação com *U. scitaminea* sobre a germinação de cariopses de cana-de-açúcar dependeu da concentração de inóculo e da cultivar.

O poder germinativo das cariopses inoculadas foi aproximadamente 13% menor do que o das cariopses não inoculadas (Tabela

13). Esta redução significativa pode ser, em parte, atribuída à reação de hipersensibilidade, ocasionando a morte do embrião ou maior número de plântulas anormais. Verificou-se que as plântulas anormais apresentavam-se bem colonizadas por *U. scitaminea*. Anomalias de plântulas, originadas de cariópses inoculadas com este fungo, foram relatadas por TALBALLA (1969).

A resistência do tipo hipersensibilidade, na maioria das plantas, é controlada por um número restrito de genes e pode ser classificada como resistência vertical nos conceitos de VAN DER PLANK (1968, 1975). Como a resistência vertical tende a facilitar o aparecimento de novas raças patogênicas, a eliminação de plantas com esse tipo de resistência, através do método de inoculação em cariópses com *U. scitaminea*, pode ser vantajosa, pois se evita o surgimento de novas raças desse fungo. Por outro lado, a maior desvantagem deste método seria a possibilidade de reduzir o número de plantas resistentes. Entretanto, como esse número é aparentemente pouco representativo, julga-se que o erro inerente ao método é, de maneira geral, aceitável, e pode ser até vantajoso. Mesmo com estas considerações, sugere-se que estudos sejam dirigidos para a hipótese de hipersensibilidade, a fim de detectarem se, neste método, há perda de material resistente e qual a sua percentagem.

5.8.2 - Influência do substrato na colonização

A colonização de plântulas por *U. scitaminea* foi influenciada pelos substratos utilizados, obtendo-se maior percentagem de plântulas colonizadas em vermiculita (Tabela 14). Como a maior percentagem de germinação foi verificada no substrato vermiculita, acredita-se que a percentagem de colonização também tenha sido maior neste substrato, por ter maior número de plântulas no período em que são mais suscetíveis a *U. scitaminea*.

Os resultados obtidos foram, em parte, confirmados no ensaio descrito em 3.9.3, pois, entre as plântulas mortas, as percentagens de colonizadas por *U. scitaminea* foram de 33,55 e 8,00%, para os substratos vermiculita e ágar-água, respectivamente (Tabela 16). Diferença significativa entre substratos foi relatada por SILVA (1978), que obteve maior índice de doença causada por *U. scitaminea* no substrato ágar-água do que no substrato solo. Logo, pode-se inferir que o substrato vermiculita é também superior a esse substrato solo, por aumentar a eficiência de seleção.

No substrato vermiculita, a percentagem de plântulas colonizadas por *U. scitaminea* foi de 45,00% (Tabela 14) neste ensaio e de 32,92% (Tabela 12) no ensaio descrito em 3.8, para o mesmo fotoperíodo (24 horas de luz) e a mesma cultivar. Em decorrência destes resultados, foi efetuada, posteriormente, uma análise estatística para verificar se essa diferença seria devida ao vigor das cariopses, pois no ensaio descrito em 3.8 elas estavam com sete me-

ses e neste com nove meses de armazenamento. Como o resultado dessa análise foi significativo, supõe-se que a diferença nas percentagens de colonização de plântulas, desses ensaios, foi devida ao vigor das cariopses.

No substrato ágar-água, a percentagem de plântulas colonizadas foi de 24,37% (Tabela 14) neste ensaio, e de 18,33% (Tabela 6) no ensaio descrito em 3.5, para o mesmo método de inoculação (sem vácuo) e a mesma cultivar. Esta diferença pode ser atribuída, também, ao vigor das cariopses, já que no ensaio descrito em 3.5 elas estavam com seis meses, e neste com nove meses de armazenamento. É provável ainda que, no ensaio descrito em 3.5, tenha havido um efeito inibitório do Tween sobre a germinação dos esporos de *U. scitaminea*, pois o mesmo foi usado sem diluição.

Por serem as cariopses de cana-de-açúcar consideradas "de vida curta" (HARRINGTON, 1972), e com base nos resultados obtidos, recomenda-se que em trabalhos posteriores seja levado em consideração o vigor das cariopses de cana-de-açúcar.

5.8.3 - Influência do substrato e inoculação na mortalidade

Quanto à mortalidade de plântulas após o transplante, não houve efeito significativo da inoculação das cariopses com *U. scitaminea* (Tabela 15), o que concorda com SILVA (1978). Porém, enquanto não se obteve diferença significativa entre os substratos ágar-água e vermiculita, esse autor obteve entre ágar-água e solo,

com este último apresentando menor percentagem de plântulas mortas, provavelmente devido ao efeito fungistático do solo que interferiu na germinação dos esporos de *U. scitaminea* e dos fungos patogênicos.

Comparando-se a percentagem de plântulas mortas do ensaio descrito em 3.8 para o mesmo fotoperíodo, 24 horas de luz (Tabela 12) com a deste ensaio, para o substrato vermiculita e cariopses inoculadas (Tabela 15), verifica-se que ela foi maior neste ensaio. Este fato pode ser explicado pelo menor vigor das plântulas, ocasionado pelo maior tempo de armazenamento das cariopses. BYTHER e STEINER (1972) observaram maior mortalidade de plântulas de cana-de-açúcar, originadas de cariopses com um ano de idade, possivelmente devida a perda de vigor.

Além das considerações efetuadas sobre os substratos vermiculita e ágar-água, apresentadas neste item e em 5.8.1 e 5.8.2, destaca-se, ainda, que o substrato vermiculita apresentou maior facilidade na retirada das plântulas por ocasião do transplante, e é de menor custo do que o substrato ágar-água.

5.9 - Fungos Encontrados nas Plântulas Mortas

Os contaminantes mais freqüentes das plântulas mortas foram *Phoma* sp, *Curvularia* spp e *Helminthosporium* spp (Tabela 16). Resultados semelhantes foram obtidos por LOVELESS e SMITH (1956), BYTHER e STEINER (1969), BYTHER *et alii* (1971), BYTHER e STEINER (1972), KHURANA e SINGH (1972), YANG (1973), RAMALLO (1975), DUARTE (1976), SANGUINO (1976), BLEICHER (1978), DUARTE e TOKESHI

(1978), SILVA (1978) e SANGUINO e TOKESHI (1980).

Entre as plântulas mortas da cultivar CO 419 foi encontrado *C. falcatum*, sendo que este fungo foi também encontrado em cariopses desta cultivar. Assim, o ciclo vital deste patógeno é semelhante ao de outros *Colletotrichum* de gramíneas.

Nos três ensaios de mortalidade de plântulas, a percentagem de plântulas colonizadas por fungos do gênero *Phoma* foi, praticamente, igual à de plântulas colonizadas por *U. scitaminea*, sendo que essas percentagens foram maiores do que as demais (Tabela 16). Nesses ensaios (Tabela 17), observa-se que o *U. scitaminea* ocorreu colonizando plântulas juntamente com outros patógenos, porém em percentagem menor do que a de plântulas colonizadas somente por ele.

Considerando-se esses ensaios em conjunto, pode-se verificar que a maior percentagem de plântulas mortas após o transplante foi devida aos fungos contaminantes. Sendo assim, o método de inoculação em cariopses é prejudicado pela má qualidade das mesmas, em decorrência das condições de produção e contaminação com microrganismos. Logo, para obterem-se cariopses de melhor qualidade, deve-se tentar o controle desses patógenos no campo, escolher a época de colheita, e dar melhores condições de secagem e armazenamento.

6. CONCLUSÕES

- a) O substrato vermiculita é melhor do que o ágar-água para germinação de cariopses e colonização de plântulas por *U. scitaminea*.
- b) O vácuo causa decréscimo de germinação de cariopses e tendência de acréscimo na colonização de plântulas por *U. scitaminea*.
- c) Câmaras com luz contínua podem ser usadas para inoculações com *U. scitaminea*, sem prejuízo para a eficiência do método.
- d) A seleção de plantas resistentes a *U. scitaminea*, pelo método em estudo, tem início na fase de germinação, com eliminação das plantas extremamente suscetíveis, pouco vigorosas e, possivelmente, algumas hipersensíveis.

- e) Plantas nas quais é detectado micélio de *U. scitaminea* nas folhas tendem a produzir chicotes precocemente e são mais suscetíveis do que aquelas nas quais isto não ocorre.
- f) A mortalidade de plântulas, após o transplante, tem como causa principal a presença de microrganismos patogênicos nas cariopses.
- g) A espécie *C. falcatum* pode atacar cariopses de cana-de-açúcar e apresenta ciclo vital semelhante aos *Colletotrichum* de gramíneas graníferas.

7. LITERATURA CITADA

- ABBOTT, E.V., 1938. Red Rot of Sugarcane. Technical Bulletin. United States Department of Agriculture, Washington, (641). 96 p.
- AGRIOS, G.N., 1969. Plant Pathology. New York, Academic Press . 629 p.
- ANTOINE, R., 1961. Smut. In: MARTIN, J.P.; E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES. Sugar-Cane Diseases of the World. Amsterdam, Elsevier Publishing Company. v. 1, p. 327-354.
- BARNETT, H.L. e B.B. HUNTER, 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3a. ed. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 241 p.
- BARTLETT, M.S., 1947. The use of transformations. Biometrics, Raleigh, 3: 39-52.
- BLEICHER, J., 1978. Efeito da Ventilação na Germinação de Cariopses e do Vácuo na Inoculação de *Ustilago scitaminea*, em Cana-de-Açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 64 p. (Dissertação de Mestrado).

- BLEICHER, J. e H. TOKESHI, 1980. Effect of vacuum inoculation method on sugarcane caryopses colonization by *Ustilago scitaminea*. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].
- BLEICHER, J. e H. TOKESHI, 1980a. Effect of sugarcane caryopses ventilation on germination and vigor. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].
- BRASIL. Ministério da Agricultura, 1976. Divisão de Sementes e Mudanças. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 188 p.
- BRIEGER, F.O., 1965. Carvão de cana-de-açúcar: mal epidêmico. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 65(2): 78-80.
- BYTHER, R.S. e G.W. STEINER, 1969. Seedling diseases and their control. Annual Report. Hawaiian Sugar Planters' Association. Experiment Station, Honolulu, p. 58-59.
- BYTHER, R.S. e G.W. STEINER, 1972. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. Phytopathology, Lancaster, 62(1): 120-124.
- BYTHER, R.S.; G.W. STEINER e C.A. WISMER, 1971. New sugarcane diseases reported in Hawaii. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Queensland, (7): 18-21.
- CARVALHO, R. de S., 1949. Carvão de cana. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 6: 1-12.

- DONELAN, A.F., 1980. Improved growth of sugar cane seedlings in soil mixtures containing coconut fibre waste. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].
- DUARTE, M. de L.R., 1976. Padronização Metodológica da Inoculação de Plântulas de Cana-de-Açúcar para Seleção de Resistência a *Ustilago scitaminea*. Piracicaba, ESALQ/USP, 76 P. (Dissertação de Mestrado).
- DUARTE, M. de L.R. e H. TOKESHI, 1978. Inoculation of sugarcane seedlings for selection of resistance to *Ustilago scitaminea*. In: Proceedings XVI Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, São Paulo, p. 383-393.
- DUARTE, M. de L.R. e H. TOKESHI, 1978a. Efeito de fungicidas sobre a germinação de esporos de *Ustilago scitaminea* Syd. "in vitro". Summa Phytopathologica, Piracicaba, 4: 93-100.
- DURAIRAJ, V.; S. NATARAJAN e D. PADMANABHAN, 1972. Reaction of some sugarcane varieties to smut (*Ustilago scitaminea* Syd.). Pest Articles News Summaries, London, 18(2): 171-172.
- FERREIRA, S.A.; J.C. COMSTOCK e K.K. WU, 1980. Evaluating sugarcane smut resistance. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].
- GIBE, J.N. e F.Y. PANOL, 1969. Sugarcane breeding in Victorias. Sugar News, Manila, 45(12): 714-718.
- HARRINGTON, J.F., 1972. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed Biology. New York, Academic Press. v. 3, p. 145-245.

- HIRSCHHORN, E., 1949. Un nuevo metodo de infección artificial con el carbón de la caña de azúcar. Revista de Investigaciones Agrícolas, Buenos Aires, 3(4): 335-344.
- KHURANA, S.M.P. e S. SINGH, 1972. Interrelationship of a fungus, *Curvularia lunata* with root-knot, nematode, *Meloidogyne javanica* in sugarcane seedling blight. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Queensland, (8): 33.
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, Esporulação e Patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. [sensu ARX, 1957]. Piracicaba, ESALQ/USP, 103 p. (Tese de Livre-Docência).
- LEE-LOVICK, G., 1978. Smut of sugarcane - *Ustilago scitaminea*. Review of Plant Pathology, London, 57(5): 181-188.
- LIVINGSTON, J.E., 1942. The inheritance of resistance to *Ustilago nuda*. Phytopathology, Lancaster, 32(6): 451-466.
- LOVELESS, A.R. e C.E.M. SMITH, 1956. Seedling blight of sugarcane - a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. Annals of Applied Biology, Cambridge, 44(3): 419-424.
- MANGELSDORF, A.J., 1966. Um Programa de Melhoramento da Cana-de-Açúcar para a Agroindústria Canavieira do Brasil. Rio de Janeiro, Instituto do Açúcar e do Alcool. 63 p.
- MATA, J.F. da, 1975. Preservação e Determinação de Viabilidade de Clamidosporos de *Ustilago scitaminea*. Piracicaba, ESALQ/USP, 66 p. (Dissertação de Mestrado).
- MATA, J.F. da e H. TOKESHI, 1976. Comparação entre três métodos de preservação de *Ustilago scitaminea*. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2(3): 187-193.

- MINUSSI, E., 1977. Taxonomia e Esporulação de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu ARX, 1957) e Patogenicidade em Sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Piracicaba, ESALQ/USP, 78 p. (Tese de Doutorado).
- PLOPER, D. e N.E.V. de RAMALLO, (1979). Actividad antibiótica de extractos de *Ustilago scitaminea* Sydow. 4 p. [Comunicação feita a Las Jornadas Fitosanitarias Argentinas].
- POPP, W., 1958. An improved method of detecting loose-smut mycelium in whole embryos of wheat and barley. Phytopathology, Lancaster, 48(12): 641-643.
- RAMALLO, N.E.V. de, 1975. Tizón en plantines de caña de azúcar. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán, San Miguel, 52(2): 77-81.
- ROSS, J.G.; W.M. SEMENIUK; D.K. TAYLOR e B.C. JENKINS, 1948. Factors affecting the degree of infection of barley by loose smut (*Ustilago nuda* (Jens) Rostr.). Scientific Agriculture, Ottawa, 28(11): 481-492.
- SANGUINO, A., 1976. Patologia e Controle dos Fungos de Sementes de Cana-de-Açúcar e Resistência de Progenies à *Helminthosporium sacchari*. Piracicaba, ESALQ/USP, 77 p. (Dissertação de Mestrado).
- SANGUINO, A. e H. TOKESHI, 1976. Vácuo e *Ustilago scitaminea* alterando a brotação de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, (6): 30-35.
- SANGUINO, A. e H. TOKESHI, 1980. Fungus pathology in sugarcane caryopses. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].

- SILVA, W.M. da, 1974. Produção de "Seedlings" de Cana-de-Açúcar pelo Beneficiamento do "Fuzz" e Transplante Precoce. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 35 p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVA, W.M. da, 1978. Pré-seleção de "Seedlings" de Cana-de-Açúcar Resistentes a *Ustilago scitaminea*, pela Inoculação das "Sementes". Piracicaba, ESALQ/USP, 65 p. (Tese de Doutorado).
- SILVA, W.M. da e H. TOKESHI, 1980. Pre-selection of *Ustilago scitaminea* resistant sugarcane seedlings by true seed inoculation. In: Proceedings XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila. [No prelo].
- TALBALLA, H.A., 1969. Smut on true seedlings of sugarcane. Plant Disease Reporter, Washington, 53(12): 992-993.
- TALBALLA, H.A. e I.A. NASR, 1974. Screening for smut resistance by true seedlings inoculation in sugarcane. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 34: 27-29.
- TOFFANO, W.B., 1965. Resistência de variedades ao "carvão" da cana-de-açúcar ao inóculo de C.B. 45-3. O Biológico, São Paulo, 31(3): 65-66.
- TOFFANO, W.B., 1966. Susceptibilidade de variedades de cana-de-açúcar ao fungo causador do carvão (*Ustilago scitaminea*, Sydow). Ciência e Cultura, São Paulo, 18(2): 126-127.
- TOFFANO, W.B., 1966a. Novas observações sobre o carvão da cana-de-açúcar. O Biológico, São Paulo, 32(8): 171-178.

- TOFFANO, W.B., 1976. Estudos comparativos dos métodos de inoculação do fungo *Ustilago scitaminea* Syd. para fins de seleção de variedades de cana-de-açúcar. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, 43(1/2): 33-41.
- TOKESHI, H., 1979. Problemas de produção de variedades de cana-de-açúcar resistentes a *Ustilago scitaminea* encontrados pelo PLANALSUCAR. 13 p. Apresentado ao XII Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Itabuna.
- TOKESHI, H., 1980. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas. 2a. ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. v. 2, p. 141-206.
- TOLEDO, F.F. de e J. MARCOS FILHO, 1977. Manual das Sementes: Tecnologia da Produção. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. 224 p.
- TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 239 p.
- VAN DER PLANK, J.E., 1968. Disease Resistance in Plants. New York, Academic Press. 206 p.
- VAN DER PLANK, J.E., 1975. Principles of Plant Infection. New York, Academic Press. 216 p.
- WALLER, J.M., 1970. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. II. Infection and resistance. Transactions British Mycological Society, London, 54(3): 405-414.
- WELLS, S.A. e A.W. PLATT, 1949. The effect of loose smut on the viability of artificially inoculated barley seeds. Scientific Agriculture, Ottawa, 29(1): 45-52.

YANG, S-M., 1973. Isolation and effect of temperature on spore germination, radial growth, and pathogenicity of *Curvularia senegalensis*. Phytopathology, Lancaster, 63(12): 1541-1542.