

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA INOCULAÇÃO DE
***Sporisorium scitamineum* EM TESTES DE RESISTÊNCIA**
AO CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Juliana Moraes Boldini

Engenheira Agrônoma

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA INOCULAÇÃO DE
***Sporisorium scitamineum* EM TESTES DE RESISTÊNCIA**
AO CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Juliana Moraes Boldini

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Coorientador: Dr. Mauro Alexandre Xavier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2016

B687p Boldini, Juliana Moraes
Padronização de métodos para inoculação de *Sporisorium scitamineum* em testes de resistência ao carvão da cana-de-açúcar / Juliana Moraes Boldini. – – Jaboticabal, 2016
xii, 60 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Antonio de Goes
Coorientador: Mauro Alexandre Xavier
Banca examinadora: Edson Luiz Furtado, Luciana Rossini Pinto
Marcos Guimarães de Andrade Landell, Rita de Cássia Panizzi
Bibliografia

1. Resistência varietal. 2. *Saccharum* spp.. 3. Temperatura pós-inoculação I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA INOCULAÇÃO DE *Sporisorium scitamineum* EM TESTES DE RESISTÊNCIA AO CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

AUTORA: JULIANA MORAES BOLDINI

ORIENTADOR: ANTONIO DE GÓES

CO-ORIENTADOR: MAURO ALEXANDRE XAVIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA PANIZZI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO
Departamento de Proteção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu, SP

Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC / Instituto Agrônômico de Campinas - Ribeirão Preto, SP

Prof. Dr. MARCOS GUIMARÃES DE ANDRADE LANDELL
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 30 de maio de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA MORAES BOLDINI – nascida em Ribeirão Preto - SP, dia 4 de junho de 1974 é formada em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Lavras – MG no ano de 1999. Na graduação foi bolsista do CNPq durante quatro anos (1994 a 1998) na área de Fitopatologia, desenvolvendo pesquisa em doenças da alfafa. Cursou mestrado em agronomia na mesma Universidade e área durante os anos de 1999 a 2001 com pesquisa em doenças do cafeeiro, com dissertação intitulada: "Epidemiologia da ferrugem e cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado". Especializou-se em Pós-colheita de Frutos e Hortalças no mesmo ano e Universidade. Trabalhou na Coopercitrus (Cooperativa dos Cafeicultores e Citricultores do Estado de São Paulo) em Ribeirão Preto-SP, nos anos de 2002 a 2003. Nesse mesmo período trabalhou como Coordenadora de Certificação Fitossanitária de Origem e também ministrou cursos para treinamento técnico de aplicadores de Agrotóxicos aos Empregados Rurais no setor canavieiro pela FERCANA (Federação dos Empregados Rurais no Setor Canavieiro do Estado de São Paulo). Nos anos de 2004 a 2005 foi assessora da Revista Brasileira de Fruticultura. Nos anos de 2008 a 2011 trabalhou em treinamento Técnico em Cana-de-açúcar quanto à Ferrugem Alaranjada aos Produtores Rurais associados à CATI. Foi uma das participantes em relatar a entrada da Ferrugem Alaranjada (*Puccinia kuehnii*) no Brasil. Também nesse período trabalhou na CanaVialis (Monsanto) em Campinas-SP, como pesquisadora na área de Fitopatologia com doenças em cana-de-açúcar. Durante o doutorado (2012 a 2016) desenvolveu pesquisa junto ao Instituto Agrônômico (IAC) no Centro de Cana em Ribeirão Preto-SP, para contribuição na seleção de genótipos de cana-de-açúcar nos programas de melhoramento genético.

Dedico a Jeová,

“ Pois assim diz Jeová,
O Criador do céus, o verdadeiro Deus,
Aquele que formou a terra e que a fez, aquele que a estabeleceu firmemente,
Que não a criou simplesmente para nada, mas a formou para ser habitada:
Eu sou Jeová e não há outro”.
(Isaías 45:18)

“Agradecei a Jeová, porque ele é bom,
Pois sua benevolência é por tempo indefinido”.
(1 Crônicas 16:34)

AGRADECIMENTOS

A **Jeová Deus**, pelo seu imenso amor, instrução e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Maria Rita Castellano Moraes Boldini** e **José Bernardes Boldini** pelo seu amor, por tudo que me ensinaram durante minha vida.

Aos meus irmãos **Ramiro Chagas Moraes Boldini** e **Silvana Carla Moraes Boldini** com seus respectivos cônjuges, pela força, amizade, a quem me deram lindos sobrinhos que me proporcionam grandes momentos de alegria, felicidade e descontração: **Lara, Alice, Ana Beatriz e Giovana**.

À tia **Ângela Tereza Castellano Moraes** por seu zelo e preocupação de que as coisas sempre saíssem bem.

Ao vô **Luis Lopez Moraes** e tio **Savério Tadeu Castellano Moraes** (*in memorian*) que tenho certeza que estariam muito felizes e orgulhosos por mais esta conquista.

Ao **Arturo Samuel Gómez Insuasti**, por ser muito especial para mim, e por toda sua dedicação ao meu lado, pelo seu amor e apoio.

Ao primo **Prof. Dr. Paulo Donato Castellane** (*in memorian*) por toda sua dedicação e empenho à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, e à pesquisa científica.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Universidade Estadual Paulista)**, Câmpus de Jaboticabal-SP, pela oportunidade concedida para a realização do curso de pós-graduação.

À **CAPES** pelo apoio financeiro pela concessão da bolsa.

Ao **Prof. Dr. Antonio de Goes** por todo o convívio, por ser um grande exemplo na minha vida, pelo seu dinamismo, dedicação, orientação e incentivo.

Ao **Dr. Mauro Alexandre Xavier** pela coorientação e auxílio nas programações de ensaios.

Ao **Dr. Marcos de Andrade Guimarães Landell** pela estimada atenção e pela grande oportunidade de possibilitar o desenvolvimento deste trabalho para que pudesse contribuir com a pesquisa.

Ao **Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) - Centro de Cana** pelo espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa e aprendizagem.

Ao **Dr. Álvaro Sanguino** por compartilhar todo seu conhecimento e pela valiosa contribuição nos trabalhos de pesquisa.

Às pesquisadoras do Centro de Cana (IAC): **Dr^a. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza** e **Prof^a Dr^a. Luciana Rossini Pinto** e suas equipes de trabalho dos laboratórios de Biotecnologia e Fitopatologia, por toda a atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao **Prof. Dr. Dilermando Perecin** pela grande contribuição, paciência e disposição em ajudar nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Centro de Cana (IAC): **Roberto** e equipe de trabalho; ao **Tiago, Rômulo e José Roberto** pela valiosa ajuda no campo.

À **Maria Augusta, Jurema e Sueli** do Centro de Cana, pelo convívio, pois estiveram sempre presentes no meu dia a dia.

Aos funcionários da UNESP (Jaboticabal) **Wanderley, Luís, Rosângela e Vera Lúcia** a quem pude contar com apoio, experiência e dedicação.

A todos os professores do Departamento de Fitossanidade, em especial à **Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Panizzi** e da área de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos, convívio e experiência.

A todos os membros da banca de qualificação e de defesa de Tese pela grande contribuição com suas valiosas experiências para enriquecimento desse trabalho.

Aos amigos de Faculdade **Dora, Flávia, Willame e Marcel**, pela acolhida, convívio durante todo esse percurso e a todos os alunos que frequentaram o IAC pela amizade.

Ao **Dr. Sizuo Matsuoka** a quem tenho grande admiração, um grande exemplo na minha vida profissional, minha grande gratidão por tudo o que aprendi durante os anos de trabalho juntos.

A todos que de certa forma contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO**Página**

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A cana-de-açúcar e sua importância.....	3
2.2 Carvão da cana-de-açúcar	4
2.2.1 Histórico do carvão.....	4
2.2.2 Etiologia.....	5
2.2.3 Sintomatologia.....	6
2.2.4 Infecção do patógeno – Ciclo do Carvão.....	7
2.2.5 Métodos de inoculação e condições pós-inoculação	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Locais	10
3.2 Material vegetal	10
3.3 Obtenção do inóculo.....	11
3.4 Testes de viabilidade	12
3.5 Formação do viveiro e material biológico.....	13
3.6 Instalação dos experimentos.....	14
3.6.1 Coleta dos genótipos e seleção das gemas viáveis	14
3.6.2 Experimento 1 – Métodos de inoculação e determinação das condições adequadas pós-inoculação	15

3.6.3 Experimento 2- Avaliação dos métodos de inoculação e caracterização dos genótipos quanto à resistência ao carvão	18
3.6.4 Experimento 3 – Determinação dos padrões de suscetibilidade/resistência ao carvão.....	20
3.7 Registro de dados climáticos	21
3.8 Avaliação da brotação das gemas dos genótipos	22
3.9 Caracterização dos genótipos quanto à resistência à <i>S. scitamineum</i>	22
3.10 Delineamento experimental e análise estatística	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Experimento 1 – Influência de temperatura pós-inoculação e métodos de inoculação na brotação das gemas e na incidência de <i>Sporisorium scitamineum</i> em genótipos de cana-de-açúcar.....	23
4.2 Experimentos 2 e 3 – Efeito dos métodos de inoculação na brotação das gemas na incidência de <i>Sporisorium scitamineum</i> em genótipos de cana-de-açúcar.....	26
4.3 Caracterização de genótipos de cana-de-açúcar quanto à suscetibilidade/resistência à <i>S. scitamineum</i> pelos métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura	32
4.4 Curvas de progresso da doença nos experimentos em cana-de-açúcar em cana-planta e cana-soca em casa de vegetação e a campo	39
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES.....	55
7 REFERÊNCIAS.....	56

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA INOCULAÇÃO DE *Sporisorium scitamineum* EM TESTES DE RESISTÊNCIA AO CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - O carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) é uma das principais doenças que causam perda na produtividade e redução do estande da cultura. Não há até o momento, metodologias adequadas e genótipos que possam contribuir à discriminação dos materiais genéticos quanto aos níveis de resistência de forma convincente e segura. Com isso, os objetivos do presente trabalho foram: (i) determinar metodologias mais adequadas de inoculação e de pós-inoculação; (ii) avaliar o comportamento diferencial de genótipos de cana-de-açúcar quando submetidos a diferentes métodos de inoculação; (iii) padronizar metodologias de avaliação do carvão empregando-se métodos de inoculação, temperatura pós-inoculação, e padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência para programas de melhoramento. Foram realizados três experimentos, em diferentes épocas, conduzidos em cana-planta e cana-soca, em casa de vegetação e a campo. No primeiro experimento, foram avaliadas as condições ideais prévias de inoculação e de pós-inoculação, empregando os genótipos RB925345 e IACSP03-4080. Os minitoletes de gema individualizada foram inoculados por aspersão, imersão e punctura das gemas com suspensão de 10^6 teliósporos/mL e posteriormente submetidos a temperaturas de 26, 28 e 30°C por 72 horas. Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições em cana-planta por 180 dias, e em cana-soca por 180 dias em casa de vegetação. A avaliação consistiu na determinação semanal da incidência de plantas com chicote. Posteriormente, os genótipos Co419, NA56-79, RB925345, SP80-3280, IACSP93-3046, IACSP95-5000, IACSP95-5094, IACSP96-2042, IACSP96-3060, IACSP96-7569, IACSP96-3076, IACSP97-4039, IACSP98-2053, IACSP03-4080, foram submetidos aos métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura em suspensão de mesma concentração de teliósporos já descrita. O delineamento foi inteiramente casualizado em cana-planta conduzido em casa de vegetação e em blocos casualizados em cana-soca conduzida à campo. As avaliações da incidência de plantas com chicotes foram realizadas semanalmente, em casa de vegetação, durante 180 dias em cana-planta, e por mais 180 dias em cana-soca em campo. Um terceiro experimento foi realizado, utilizando os genótipos Co419, NA56-79, SP80-3280, IACSP93-3046, IACSP95-5094 e IACSP03-4080, com a intenção de validação dos resultados obtidos para padronização da metodologia de inoculação e pós-inoculação e genótipos. O experimento foi conduzido a campo por 180 dias, sendo avaliado quanto a incidência de carvão. Os resultados revelam que a temperatura ideal pós-inoculação foi de 28°C por demonstrar melhor resposta quanto à porcentagem de brotação das gemas e incidência de plantas com chicotes. O melhor método indicado para as fases de seleções de genótipos resistentes foi inoculação por imersão, por ser mais próximo das condições naturais. Já o método por punctura pode ser indicado para identificar genitores resistentes a serem utilizados em cruzamentos genéticos, por ser um método mais agressivo, possibilitando a obtenção de genótipos resistentes geneticamente. O método de aspersão mostrou-se pouco viável devido às possíveis falhas de inoculação. Experimentos conduzidos a campo revelaram resultados mais rápidos e seguros, em relação aos conduzidos em casa de vegetação. A nova escala

de avaliação proposta neste trabalho permitiu melhores condições para caracterização dos genótipos quanto à resistência ao carvão e respostas em menor tempo de avaliação. Os genótipos Co419, IACSP03-4080 e IACSP93-3046 mostraram-se adequados como padrões de suscetibilidade; NA56-79 intermediário e SP80-3280 de resistência.

Palavras-chave: Resistência varietal, *Saccharum* spp., temperatura pós-inoculação

STANDARDIZATION OF METHODS FOR *Sporisorium scitamineum* INOCULATION IN RESISTANCE TESTS FOR SMUT OF SUGARCANE

SUMMARY - Smut of sugarcane (*Sporisorium scitamineum*) is one of the main diseases that cause loss of productivity and crop stand reduction. There are still no appropriate methodologies and genotypes that could contribute to the discrimination of genetic material and the resistance levels in a convincing and safe way. Thus, this study aimed: (i) determine the most appropriate methods of inoculation and pos inoculation; (ii) evaluate the behavior of sugarcane genotypes when submitted to different methods of inoculation; (iii) standardize assessment methodologies for smut, employing methods of inoculation, pos inoculation temperature, and susceptibility patterns, intermediate and resistance to breeding programs. Three experiments were carried out at different times, using cane plant and ratoon cane in greenhouse and field. In the first experiment, the ideal preconditions for inoculation and pos inoculation were evaluated using the RB925345 and IACSP03-4080 genotypes. The individualized bud setts were inoculated by spraying, immersion and puncture (wounding) of the buds with teliospore suspension of 10^6 /mL and then subjected to temperatures of 26, 28 and 30°C for 72 hours. It was used a completely randomized design with four replications in cane plant for 180 days, and in ratoon cane /for 180 days in a greenhouse. The evaluation consisted of weekly determination of the incidence of plants with whip. Subsequently, Co419, NA56-79, RB925345, SP80-3280, IACSP93-3046, IACSP95-5000, IACSP95-5094, IACSP96-2042, IACSP96-3060, IACSP96-7569, IACSP96-3076, IACSP97-4039, IACSP98-2053, IACSP03-4080 genotypes underwent methods of inoculation by spraying, immersion and puncture suspension of same concentration of teliospores already described. The design was completely randomized in cane plant carried out in a greenhouse and a randomized block of ratoon under field conditions. Evaluations of whips incidence in plants were done weekly, in a greenhouse, 180 days in cane plant, and for another 180 days in ratoon at field. A third experiment was carried out using the Co419, NA56-79, SP80-3280, IACSP93-3046, IACSP95-5094 and IACSP03-4080 genotypes with the intention to validate the results obtained to standardize the methodology of inoculation and pos inoculation and genotypes. The experiment was carried out under field conditions for 180 days and the whip incidence was evaluated. The results show that pos inoculation optimal temperature was 28°C due to demonstrate better response as the buds sprouted percentage and incidence of plants with whips. The best method suitable for screening for smut resistance resistant genotypes phase selections was the inoculation by immersion, closer to the natural conditions. The puncture method can be indicated to identify parents resistant in genetic crosses, due to be a more aggressive method, enabling the production of genotypes genetically resistant. The spray method was impractical because of the possible inoculation failures. The experiments carried out under field conditions revealed faster and safe results related

to the ones conducted in the greenhouse. This work new scale proposed evaluation enabled better conditions to characterize genotypes for smut resistance as well as faster evaluation answers. The IACSP03-4080, Co419 and IACSP93-3046 genotypes proved to be suitable as susceptibility patterns; NA56-79 intermediate and SP80-3280 resistance.

Keywords: Varietal resistance, *Saccharum* spp, Pos inoculation temperature

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como maior produtor e exportador de produtos da cana-de-açúcar do mundo (AGRIANUAL, 2016; IBGE, 2016). Por isso, grandes investimentos têm sido realizados em programas de melhoramento genético com a intenção de obter novas cultivares mais produtivas, mais adaptadas a diferentes regiões e sistemas de cultivo e resistentes a pragas e doenças.

O carvão, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, tem-se destacado como uma das principais doenças da cana-de-açúcar, devido causar grandes perdas de produtividade, as quais podem atingir até 100%, dependendo da suscetibilidade da cultivar plantada (COMSTOCK, 2000; TOKESHI; RAGO, 2005).

Entre os métodos de controle da doença, a utilização de genótipos resistentes é um dos mais eficazes, agregando praticidade e economicidade para o produtor (BEDENDO, 1999; COMSTOCK, 2000).

Nos programas de melhoramento genético em cana-de-açúcar utilizam-se inoculações artificiais que simulam as infecções naturais do patógeno, a fim de possibilitar a avaliação do genótipo quanto à resistência ao respectivo agente causal. Tais métodos, entretanto, nem sempre, mostram-se plenamente práticos. Além disso, carece-se ainda de materiais genéticos apropriados, de tal forma que possam ser utilizados como diferenciadores de suscetibilidade e resistência e, dessa forma, tornarem-se mais confiáveis.

Há na literatura citações de vários métodos de inoculação de *S. scitamineum*. Entretanto, há controvérsias quanto à eficiência dos mesmos, com resultados muitas vezes conflitantes e que não espelham a realidade biológica do comportamento dos genótipos quanto à resistência ao patógeno (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2005; OLWENY et al., 2008). De forma semelhante, também não há genótipos padrões quanto à suscetibilidade, intermediários e resistentes ao carvão. Obviamente, quando se leva em conta os binômios ambientes e/ou métodos de inoculação e genótipos diferenciais, os conflitos mostram-se ainda mais proeminentes. Quanto às condições de pós-inoculação, essenciais para a infecção do patógeno, também carecem de informações imprescindíveis para que, de forma segura, haja expressão do quadro sintomatológico em toda a sua plenitude e, assim, os resultados possam oferecer o

nível de confiabilidade necessário.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos:

- Determinar metodologias mais adequadas de inoculação e pós-inoculação
- Avaliar o comportamento diferencial de genótipos de cana-de-açúcar quanto à resistência ao carvão, submetidos a diferentes métodos de inoculação
- Padronizar metodologias de inoculação do carvão empregando-se método de inoculação, temperatura pós-inoculação e padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência para testes de resistência ao carvão a serem utilizadas no melhoramento da cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar e sua importância

A domesticação da cana-de-açúcar ocorreu em Papua Nova Guiné provavelmente antes de 2500 a.C. onde foi encontrado grande diversidade morfológica de espécies *Saccharum officinarum*, sendo posteriormente plantada nas Ilhas do Pacífico Sul, Índia e China por volta de 1500 a 1000 a.C. A primeira evidência de produção de açúcar foi no ano 500 na Pérsia (MOZAMBANI et al., 2006).

Após ser propagada para os continentes africano, asiático e europeu, a cultura chegou nas Américas com Cristovão Colombo, chegando no Brasil no final do século XV (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar, vem expandindo em importância econômica nos países onde é possível seu cultivo, devido ser uma das culturas mais rentáveis do agronegócio.

Atualmente, a produção mundial de cana-de-açúcar é assegurada por quatro países, tais como o Brasil, Índia, China e Tailândia (AGRIANUAL, 2016). Cerca de 1.912 bilhões de toneladas de cana foram produzidos em todo o mundo.

A cana-de-açúcar, híbrido interespecífico de *Saccharum* spp., é de grande importância para a economia brasileira. O Brasil, com produção estimada em 730 milhões de toneladas esse ano, é o maior produtor e exportador mundial, com cerca de 72% das exportações de derivados da cana-de-açúcar (IBGE, 2016).

A área plantada com cana-de-açúcar no Brasil é de cerca de 9.744.361 hectares (IBGE, 2016), sendo de fundamental importância à agroindústria de açúcar e álcool, biocombustíveis, e biomassa como fonte alternativa energética.

O país é responsável por mais da metade de açúcar comercializado no mundo. A cultura é produzida em quase todo o país, com a maior produção concentrada na região Sudeste, sendo que o estado de São Paulo participa com 51% de toda a área e produção nacional (AGRIANUAL, 2016).

Em função disso, grandes investimentos têm sido aplicados em programas de melhoramento genético visando obter genótipos mais produtivos, mais adaptados a diferentes regiões, sistemas de cultivo e resistentes a pragas e doenças.

2.2 Carvão da cana-de-açúcar

2.2.1 Histórico do Carvão

O carvão foi primeiramente relatado em 1877 em Natal, na África do Sul e desde então foi relatado em outros países, como Java (1881), Mauritius (1982), Filipinas (1908) e União de Mianmar (1925) (ANTONIE, 1961; BERGAMIN et al., 1987; RABOIN et al., 2007), chegando nas Ilhas de Reunião e Madagascar, Paquistão, Afeganistão, China, Formosa, Sri Lanka e Quênia. O primeiro registro na América do Sul foi na Argentina em 1940 na província de Tucumán (HIRSCHHORN, 1949), disseminando-se para o Uruguai, Paraguai e Brasil (Figura 1).

No Brasil, o carvão teve seu primeiro relato em 1946, no engenho de Tarumã, município de Assis, Estado de São Paulo (TOFFANO, 1953). Foi primeiramente identificado nas cultivares POJ36 e POJ213. Mesmo sob programas de erradicação do patógeno, se disseminou para estados do Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Na década de 80, houve grandes perdas de produtividade na cultivar NA56-79, que era plantada em cerca de quase 80% de toda a área cultivada (BERGAMIN et al., 1987).

Nas décadas de 1970 e 1980, se espalhou velozmente ao norte da América do Sul (1974), América Central (1975) atingindo os Estados Unidos (1978) (ORDOSGOITTI; GONZÁLEZ; APONTE, 1982) e posteriormente foi descrito em Marrocos (AKALACH, 1994).

Acredita-se que o carvão já estava presente na China muito mais tempo de quando foi relatado.

Na Austrália, foi relatada pela primeira vez em área de irrigação do Rio Ord (ORIA) em 1998. No entanto, partes da Austrália, Fiji e Papua Nova Guiné permaneceram livres da doença (BRAITHWAITE et al., 2004).

Com a crescente importância do patógeno, incentivou-se estudos em pesquisa durante as últimas décadas com o intuito de controle da doença (ANTONY, 2008). Desde então essa doença tem sido estudada em todo o mundo onde tem sido relatada sua importância na cultura.

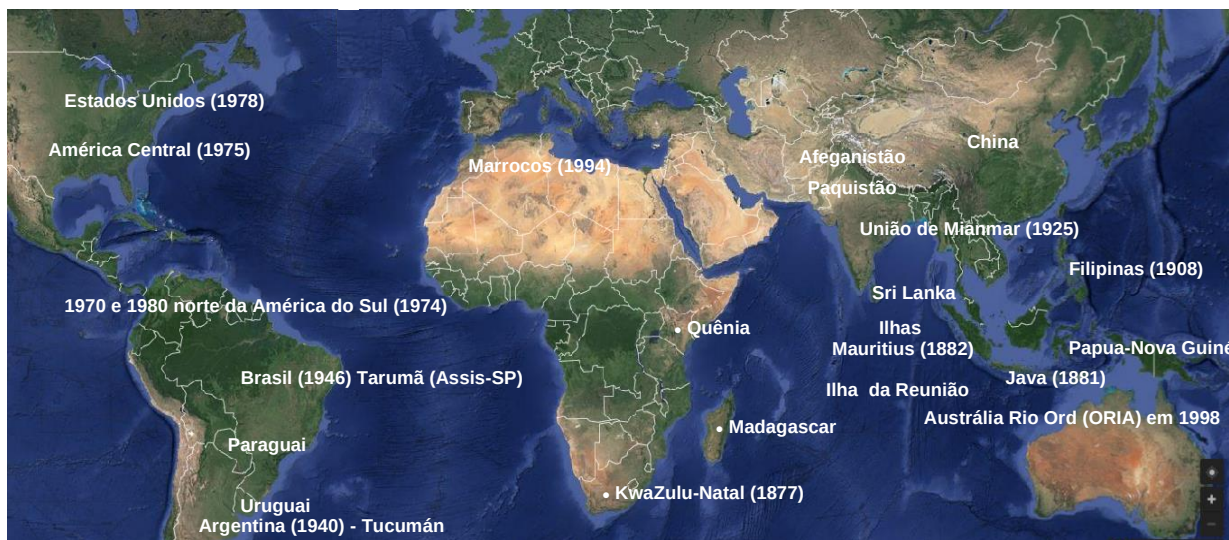


Figura 1. Relato histórico do carvão (*Sporisorium scitamineum*) da cana-de-açúcar no mundo. (<https://www.google.com.br/maps/@12.1360452,26.0011086,13643957m/data=!3m1!1e3>)

2.2.2 Etiologia

O carvão da cana-de-açúcar, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw., anteriormente chamado *Ustilago scitaminea*, (STOLL et al., 2003), pertence à divisão Basidiomycota, sub-divisão Basidiomycotina, ordem Ustilaginales, família Ustilaginaceae (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002; TOKESHI; RAGO, 2005).

Sporisorium scitamineum produz dois tipos de esporos: os teliósporos, também conhecidos como teleutosporos, ou clamidósporos, apresentam coloração escura e pulverulenta. São unicelulares, esféricos, binucleados, originados da diferenciação das células das hifas do micélio dicariótico dos tecidos meristemáticos infectados, formando uma estrutura modificada denominada “chicote”. Os teliósporos funcionam como estruturas de sobrevivência do patógeno, podendo permanecer viáveis no solo por período de até um ano dependendo das condições do solo e condições de baixa umidade (BEDENDO, 1999) (Figuras 2A e 2B).

Os basidiósporos, também conhecidos como esporídios, são ovalados, unicelulares, uninucleados, hialinos, provenientes da basídia formada pela geminação dos teliósporos (Figura 2C). São capazes de causar infecção da doença quando ocorre a fusão entre hifas de basidiósporos diferentes.

Os esporos são facilmente disseminados a longas distâncias pelo vento, podendo atingir hospedeiros próximos ou a grandes distâncias da fonte de inóculo (BEDENDO, 1999; COMSTOCK, 2000).

O patógeno apresenta especificidade em relação ao hospedeiro e pode ser considerado parasita obrigatório e evoluído, necessita de hospedeiro vivo para seu ciclo de vida e convive por longo período no hospedeiro, por cerca de 2 a 7 meses antes de apresentar o sinal/sintoma nas plantas infectadas (TOKESHI; RAGO, 2005). É infectivo em gemas da cana-de-açúcar ou em tecidos meristemáticos quando sob condições de temperatura e umidade relativa favoráveis ao patógeno (BUENO, 2010).

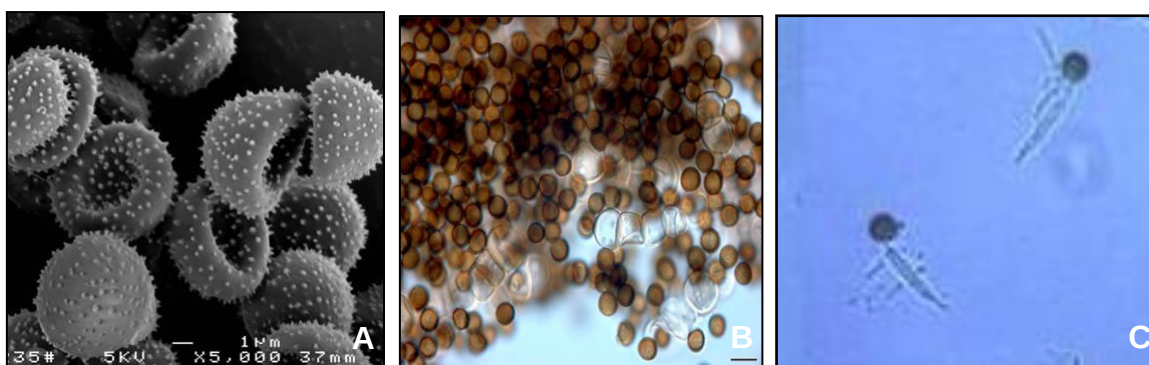


Figura 2. Teliósporos observados em microscópio de varredura (A). Teliósporos observados em microscópio óptico (B) (Fonte: Fotos obtidas em <http://collections.daff.qld.gov.au/web/key/smutfungi/Media/Html/ustilagoscitaminea.html>). Basídias e basidiósporos formados a partir da germinação de teliósporos, observados em microscópio óptico (C) Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.3 Sintomatologia

Canas infectadas por *S. scitamineum* têm o meristema apical modificado, sendo designado “chicote”. Esse é recoberto por uma película prateada que contém uma massa escura de teliósporos pretos e pulverulentos que são facilmente destacados pelo vento (COMSTOCK, 2000).

Os chicotes, sintomas e sinais do patógeno, podem apresentar comprimentos variados, de alguns centímetros até mais de um metro de comprimento, com forma de trançados ou de chicotes múltiplos. Esses podem ser formados apicalmente, se atingirem o meristema apical de plantas recém-emergidas do solo, ou lateralmente, quando resultante de infecções das gemas laterais de colmos de plantas adultas

(BEDENDO, 1999) (Figura 3A). Ocasionalmente, alguns genótipos podem produzir sinal atípico como galhas, proliferação de gemas e vassoura-de-bruxa (TOKESHI; RAGO, 2005).

Plantas doentes, mesmo antes de emitirem o chicote, apresentam ângulo de inserção das folhas mais agudo, limbo foliar estreito e curto, colmos mais finos que o normal e touceiras com superbrotamento (Figuras 3B, 3C e 3D).

A doença pode causar perdas significativas em toneladas de cana e qualidade do caldo, e seu desenvolvimento e severidade dependem das condições ambientais e da suscetibilidade da variedade de cana (COMSTOCK; LENTINI, 2005). Um dos meios eficazes de controle do carvão da cana se baseia no emprego de variedades resistentes (BLACKBURN, 1984).



Figura 3. Sintomas de carvão nas plantas de cana-de-açúcar. (A) Planta com chicote formado em gema lateral. (B) Planta exibindo folhas com ângulo de inserção agudo, limbo estreito e presença de chicote. (C) Planta apresentando colmo fino e presença de chicote. (D) Perfilhamento de plantas doentes. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.4 Infecção do patógeno – Ciclo do Carvão

Plantas de cana-de-açúcar com sinal/sintoma de carvão, apresentam chicotes, cobertos por uma massa pulverulenta de teliósporos, envolvidos por uma película prateada que os protege. Quando essa película se rompe, com o amadurecimento dos teliósporos, esses são liberados para o meio, podendo cair na superfície do solo, ou serem disseminados pelo vento a curtas ou longas distâncias. Ao entrar em contato

com gemas e tecidos meristemáticos da cana-de-açúcar, e sob condições ideais de temperatura e umidade relativa (25 a 30°C), iniciam o processo infectivo (BEDENDO, 1999) (Figura 4).

Teliósporos viáveis, sob condições de temperatura e umidade adequadas, iniciam a germinação. São capazes de infectar as gemas e tecidos meristemáticos após oito horas sob ambiente favorável (TOKESHI; RAGO, 2005).

Os teliósporos germinam e formam o pro-micélio, donde originam as basídias e, conseqüentemente, os basidiósporos. Esses irão germinar e formar o micélio primário, unicariótico e não infectivo para as plantas, e ao unir-se a outro micélio primário de outro basidiósporo, irão formar o micélio secundário, dicariótico e infectivo (TOKESHI; RAGO, 2005).

Para que ocorra a infecção do patógeno nas plantas de cana-de-açúcar, serão necessários de 7 a 32 horas de condições climáticas de temperatura e umidade ideais para que ocorra todo esse processo de germinação dos teliósporos até ao micélio secundário infectivo (ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1980)

As hifas dicarióticas, ao entrar em contato com os tecidos meristemáticos do hospedeiro suscetível, irão penetrar, colonizar e infectar a planta, causando a doença. Após período de cerca de 54 a 124 dias, irão iniciar os sintomas, principalmente na forma de chicotes (YANG et al., 2015). Estes, apresentarão os teliósporos envolvidos por uma película prateada, que irão amadurecer e serem liberados ao meio ambiente.

Também vale ressaltar que, por ser um patógeno que se desenvolve sistematicamente nos tecidos meristemáticos das plantas de cana-de-açúcar doentes, quando estas são utilizadas para a propagação vegetativa visando novos plantios, esses irão apresentar sintomas da doença durante o cultivo.

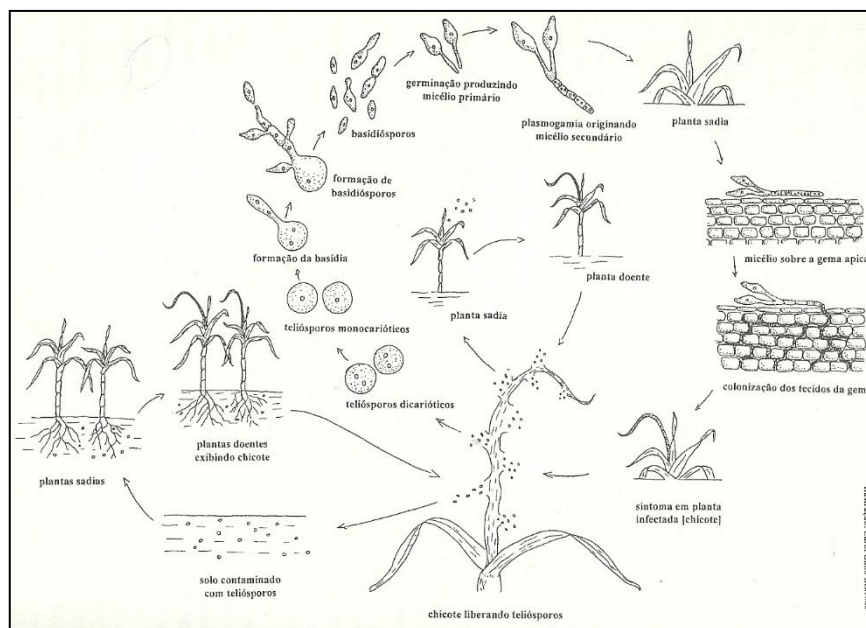


Figura 4. Ciclo da doença carvão da cana-de-açúcar, causada por *Sporisorium scitamineum*. Fonte: BEDENDO (1999).

2.2.5 Métodos de inoculação e condições pós-inoculação

Os programas de melhoramento genético em cana-de-açúcar utilizam inoculações artificiais para selecionar e caracterizar cultivares quanto à resistência às doenças.

Há na literatura citações de vários métodos de inoculação, incluindo-se dentre eles a metodologia via aspersão de teliosporos (RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA, 2009), inoculação por imersão de toletes em suspensão de teliosporos (HIRSCHHORN, 1949; CASAGRANDE, 1998), imersão de toletes à vácuo (HIRSCHHORN, 1949; TOFFANO, 1977; DEAN, 1982), injeção de teliosporos nas gemas (WHITENEAAD, 1967; PEROS; BAUDIN, 1983) e pincelamento de pasta de teliosporos sobre as gemas, com e sem fermentos (SRINIVASAN, 1969; LEU et al., 1970; MATSUOKA et al., 1986; OLWENY et al., 2008), sendo utilizados de acordo com a finalidade do programa.

As condições de pós-inoculação são essenciais para a infecção do hospedeiro. E, nesse contexto, a literatura mostra-se escassa, e, quando existente com resultados conflitantes. Alguns trabalhos relatam que as temperaturas ideais para incubação

variam de 25 a 32°C, de acordo com cada autor (WALLER, 1970; LLOYD; PILLAY, 1980; DEAN, 1982; BUENO, 2010; MAGAREY et al., 2012).

Também, não há ainda na literatura padrões diferenciadores adequados, incluindo a sua combinação com os métodos de inoculação empregados. Tais aspectos apresentam relevante importância para o melhoramento genético, visto necessitar-se de padrões confiáveis quanto ao grau de resistência ao carvão nos programas de seleção, assim como quanto à caracterização de genótipos promissores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais

Os experimentos foram realizados em condições de laboratório, casa de vegetação e em área de campo experimental do Departamento de Fitossanidade da Universidade Estadual Paulista, (UNESP), Jaboticabal/SP, situados a 21°15'17" de latitude Sul e 48°19'20" de longitude Oeste, a 605 metros de altitude e em área de campo experimental e laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana do Instituto Agrônomo - IAC em Ribeirão Preto-SP, situado a 21°10'39" de latitude sul e 47°48'37" de longitude Oeste, a 546 metros de altitude.

3.2 Material vegetal

Os genótipos empregados nos experimentos estão relacionados na Tabela 1. Esses foram selecionados mediante histórico de avaliações a campo no Instituto Agrônomo (IAC) - Centro de Cana, segundo resultados de suscetibilidade, intermediário e resistência ao carvão (LANDELL, 2012)¹.

Para cada experimento, serão mencionados os genótipos utilizados.

¹ LANDELL, M.G.A. (Instituto Agrônomo - Centro de Cana - APTA/IAC, Ribeirão Preto-SP). Comunicação Pessoal, 2012.

Tabela 1. Descrição dos genótipos de cana-de-açúcar, genitores e origem, utilizados nos experimentos.

Genótipos	Parentais	Origem	País
Co419	♀ POJ2878 x ♂ Co290	Coimbatore	Índia
NA56-79	♀ Co419 x ♂ Co419	Norte Argentina	Argentina
RB925345	♀ H591966 x ♂ desconhecido	Ridesa	Brasil
SP80-3280	♀ SP71-1088 x ♂ H575028	Copersucar	Brasil
IACSP93-3046	♀ SP791011 x ♂ desconhecido	Instituto Agrônômico de Campinas (IAC)	Brasil
IACSP95-5000	♀ SP842066 x ♂ SP80185	IAC	Brasil
IACSP95-5094	♀ SP80-3280 x ♂ desconhecido	IAC	Brasil
IACSP96-2042	♀ SP815193 x ♂ SP775181	IAC	Brasil
IACSP96-3060	♀ SP826108 x ♂ desconhecido	IAC	Brasil
IACSP96-7569	♀ SP841192 x ♂ SP80-3280	IAC	Brasil
IACSP96-3076	♀ SP84-7017 x ♂ desconhecido	IAC	Brasil
IACSP97-4039	♀ RB835486 x ♂ RB855453	IAC	Brasil
IACSP98-2053	♀ SP84-7017 x ♂ SP80-1842	IAC	Brasil
IACSP03-4080	♀ IACSP95-2288 x ♂ IAC86-3154	IAC	Brasil

3.3 Obtenção do inóculo

Os teliósporos de *S. scitamineum* foram obtidos a partir de chicotes coletados em canaviais de diferentes genótipos de cana-de-açúcar, localizados em várias regiões do estado de São Paulo. Foram realizadas três coletas que antecederam cada experimento, com cerca de três meses de antecedência.

Os chicotes coletados, foram acondicionados em sacos de papel e levados para o Departamento de Fitossanidade. Logo após a coleta, teve-se o cuidado de eliminar quaisquer tecidos vegetais, tais como folhas, bainhas, colmo, para evitar que a umidade formada pela transpiração dos tecidos pudesse comprometer a viabilidade dos teliósporos.

Os chicotes foram distribuídos em folhas de papel permeável para facilitar a

secagem dos teliósporos, sendo mantidos sob condições ambiente, de temperatura média de 26°C e Umidade Relativa de 30% (Figura 5A). Quando houve o desprendimento desses, procedeu-se a sua limpeza, pela remoção da película prateada que envolve o chicote, seguido de acondicionamento em saco de papel permeável, e armazenados em vidros com sílica gel (MATA, 1975) (Figura 5B).

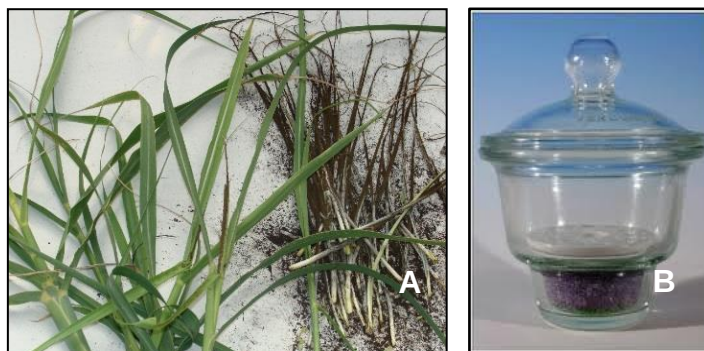


Figura 5. (A) Plantas de cana-de-açúcar coletadas com chicotes de carvão (à esquerda); chicotes livres de folhas, bainhas e colmo das plantas de cana-de-açúcar para obtenção dos teliósporos (à direita). (B) Dessecador à vácuo para armazenamento dos teliósporos com sílica gel. (Fonte: <http://quimicoisas.blogspot.com.br/2012/07/vidrarias-de-laboratorio-dessecador.html>)

3.4 Testes de viabilidade

Os teliósporos foram avaliados quanto à sua viabilidade biológica mediante testes de germinação em meio de cultivo ágar-água a 2% (p/v), aceitando-se viabilidade mínima de 80%. Para tal, o método consistiu em distribuir por meio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo o meio, cerca de 50 μL de suspensão de *S. scitamineum*, diluídos à concentração de 10^{-4} . Essa suspensão foi obtida a partir de uma amostra com cerca de $10^6/\text{mL}$ teliósporos, por meio de câmara de Neubauer.

A seguir, as culturas foram incubadas em estufas para B.O.D., à temperatura de 28°C, durante sete horas. Foram considerados germinados, os teliósporos que apresentaram tubo germinativo de comprimento médio superior ou igual ao seu diâmetro mediano. Foram realizadas cinco avaliações, tomando-se como referência 100 teliósporos para cada uma das lamínulas justapostas sobre o meio de cultivo (Figura 6). A partir de tais dados, foi determinada a porcentagem de germinação,

determinados em termos de porcentagem de viabilidade (V%), conforme a equação:

$$V (\%) = \frac{NTG * 100}{NTT}$$

V (%): Viabilidade

NTG: Número de Teliósporos Germinados

NTT: Número Total de Teliósporos

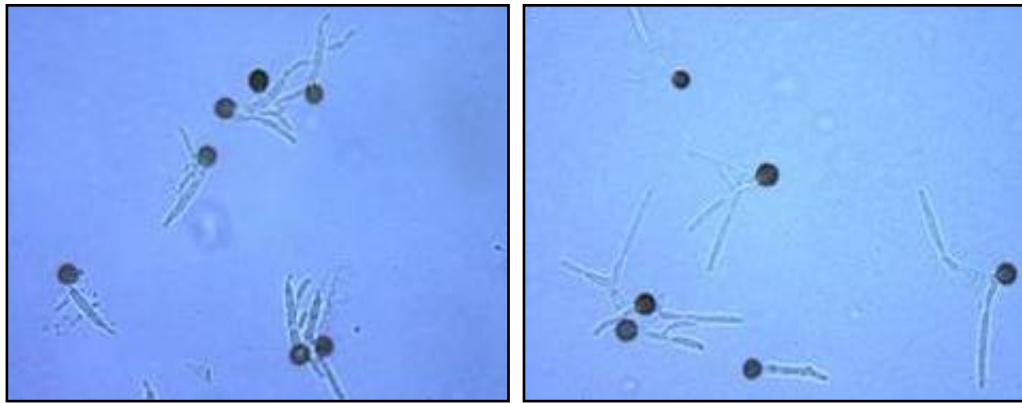


Figura 6. Vista parcial de teliósporos de *Sporisorium scitamineum* germinados em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar-água a 2% (p/v) após sete horas de incubação sob temperatura de 28°C em microscópio óptico (objetiva de 100x). Fonte: Arquivo pessoal.

3.5 Formação do viveiro e material biológico

A instalação dos experimentos requer muda sadia e de mesma idade fisiológica para padronização dos efeitos. Para isso, foi instalado um viveiro em área de campo do Centro de Cana - APTA/IAC, Ribeirão Preto-SP, por meio do sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas sugeridas por Landell et al. (2013). Os genótipos utilizados foram descritos na Tabela 1.

A identificação e certificação genética desses materiais foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana (IAC), por meio de marcadores microssatélites conforme descrito por Pinto et al. (2006).

Para a formação do viveiro, colmos de cada material genético foram coletados, selecionados e fragmentados em comprimento de cerca de 5 cm, com gema

individualizada (minitoletes). Posteriormente, os minitoletes foram submetidos ao tratamento térmico, a 52°C, por 30 minutos (COMSTOCK, 2000) para eliminação de *Sporisorium scitamineum* que poderia estar latente nos tecidos vegetais.

Os minitoletes, com boa uniformidade e sem danos físicos aparentes, foram posteriormente plantados em caixas de germinação de 47,0 cm de comprimento x 30,5 cm de largura x 12,0 cm de altura, contendo substrato da marca Tropstrato HT®. Foram mantidos em ambiente fechado, em casa de vegetação, por período de 30 dias sob irrigação com lâmina de 10 mm/dia.

As mudas formadas foram transferidas para tubetes de 0,280 L contendo o mesmo substrato, sendo mantidas em bancadas a céu aberto por período de 30 dias para aclimação, e posteriormente transplantadas em linhas de 10 metros, no espaçamento de 0,5 m entre plantas x 1,40 m entre linhas. O viveiro permaneceu instalado por período de três anos. A cada 10 meses e sempre que necessário, foi realizado o corte dos colmos dos genótipos para a obtenção dos minitoletes de gema individualizada para a instalação dos experimentos.

3.6 Instalação dos experimentos

3.6.1 Coleta dos genótipos e seleção de gemas viáveis

Para colmos de cada genótipo foram aproveitadas apenas as 10 primeiras gemas, a contar do ápice para a base (Figura 7A). Esses, quando atingiam a idade de 10 meses, foram cortados em minitoletes com gemas individualizadas de cerca de 5 cm, mediante sua pré-seleção, visando uniformidade e qualidade para assegurar a viabilidade da brotação (Figura 7B). Posteriormente, os minitoletes foram acondicionados em sacos de rede em malha (Raschel), previamente identificados e armazenados por 24 horas em sala aclimatada sob temperatura de 26°C do Departamento de Fitossanidade, UNESP, Jaboticabal-SP (Figuras 7C e 7D).

Foram utilizados entre 100, 112 ou 140 minitoletes para cada tratamento, para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Para cada unidade experimental foram utilizados 25, 28 ou 35 minitoletes, com o intuito de obter no mínimo 15 plantas (Figura 7E).



Figura 7. (A) Colmos coletados de genótipos de cana-de-açúcar. (B) Secção dos colmos em minitoletes de gema individualizada. (C) Minitoletes de gemas ensacados e identificados. (D) Minitoletes de gemas individualizadas sendo selecionados. (E) Distribuição dos minitoletes de gemas individualizadas em diferentes tratamentos (métodos de inoculação x temperatura pós-inoculação). Fonte: Arquivo pessoal.

3.6.2 Experimento 1 – Métodos de inoculação e determinação das condições adequadas pós-inoculação.

Foram empregados os genótipos pressupostamente suscetíveis, RB925345 (segundo relatos observados de produtores, observados em cultivo da cana-de-açúcar, sem controle experimental) e IACSP03-4080 (clone), realizado no período de 02/08/2012 a 05/08/2013, em casa de vegetação, sendo 180 dias para cana-planta e 180 dias para cana-soca.

Os métodos de inoculação avaliados em gemas individualizadas em minitoletes foram: (i) inoculação por aspersão, (ii) inoculação por imersão, (iii) inoculação por punctura, (iv) aspersão, sem inóculo, (v) imersão, sem inóculo e; (vi) punctura, sem inóculo (Testemunhas). Na inoculação dos minitoletes com o patógeno, foi empregada uma suspensão contendo 10^6 teliósporos/mL, água destilada e espalhante adesivo

(Tween 80) a 0,01% (BUENO, 2010). A suspensão do inóculo foi preparada em uma única vez, na quantidade necessária para os três métodos de inoculação (Figura 8A).

Para os tratamentos testemunhas, empregou-se o mesmo procedimento, porém utilizando apenas água.

Após a inoculação, as gemas foram justapostas em bandejas de alumínio descartáveis de 32,5 cm de comprimento x 26,5 de largura x 6,5 cm de altura, forradas com duas folhas de papel toalha (40 x 30 cm) umedecidas com água destilada, até seu escoamento. Gemas individualizadas, voltadas para cima, foram distribuídas em fileiras nas bandejas até completarem a primeira camada, seguido de inoculação.

A inoculação por aspersão consistiu em aspergir sobre os minitoletes com suspensão de teliósporos, empregando-se atomizador do tipo De Vilbs, direcionando-se o jato para atingir uniformemente cada uma das gemas. Os minitoletes foram dispostos em várias camadas, sendo realizada a inoculação em cada uma delas, até completar o número de minitoletes de cada tratamento. Em seguida, esses foram cobertos com duas folhas de papel toalha umedecidas, para manter a umidade durante o período de incubação (Figura 8B).

Para o método de inoculação por imersão, os minitoletes já separados, identificados e mantidos em sacos-redes, foram completamente imersos em suspensão de teliósporos em um recipiente com capacidade para 150 litros. O tempo de imersão foi de 10 minutos (Figura 8C).

O método de punctura deu-se mediante a deposição de uma alíquota de 30 μ L de suspensão sobre cada gema dos minitoletes. Posteriormente à deposição das gotas, cada gema foi levemente perfurada mediante alfinete entomológico nº2 (Figura 8D).

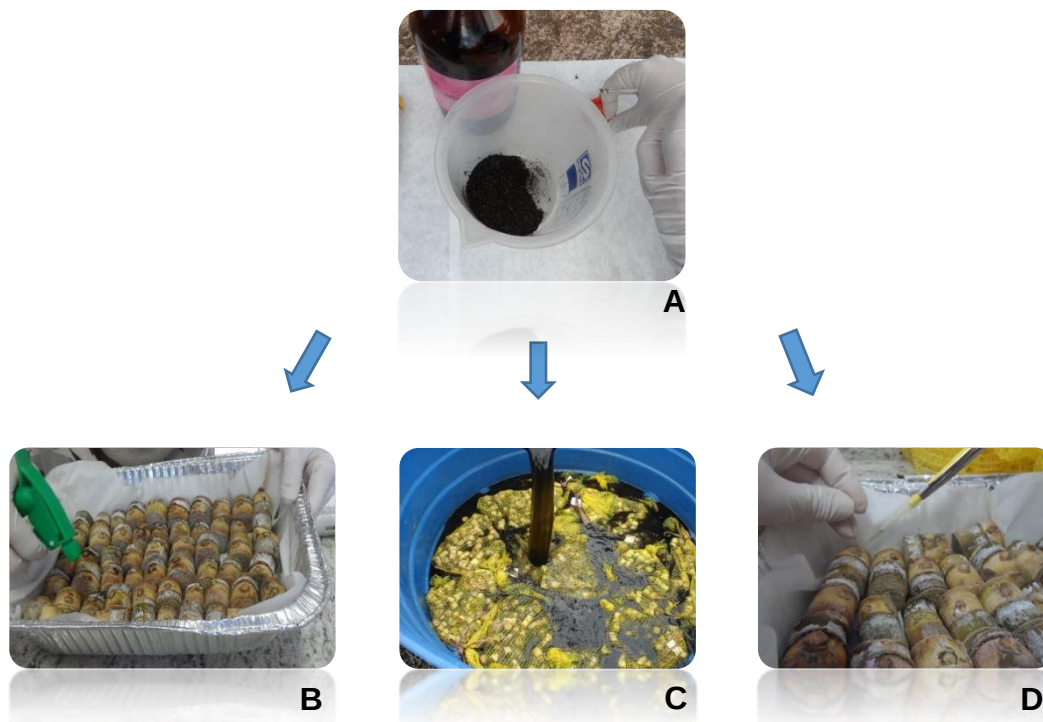


Figura 8. (A) Preparo da suspensão de teliósporos de *Sporisorium scitamineum* mediante emprego de água e Tween 80 a 0,01%. (B) Método de inoculação por aspersão dos minitoletes de gemas individualizadas em suspensão de *S. scitamineum* a 10^6 teliósporos/mL. (C) Método de inoculação por imersão dos minitoletes de gemas individualizadas em suspensão contendo 10^6 teliósporos/mL, por 10 minutos. (D) Método de inoculação por punctura das gemas individualizadas em suspensão a 10^6 teliósporos/mL. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a inoculação, as bandejas contendo os minitoletes inoculados foram armazenadas em câmaras para B.O.D., a 26, 28 e $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, onde permaneceram por período de 72 horas. Durante esse período, a umidade relativa do ar no ambiente foi mantida em torno de 80%. As bandejas foram trocadas de lugar dentro de cada B.O.D. pelo menos uma vez ao dia, para evitar erros experimentais. Após período de armazenamento, as bandejas foram removidas e os minitoletes transplantados em copos descartáveis de 0,250 L contendo substrato Tropstrato HT®, sendo mantidos em casa de vegetação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade amostral foi constituída de 25 minitoletes de uma gema, com um total de 100 minitoletes por tratamento (método de inoculação x repetições).

A partir da primeira semana pós-plantio, as brotações das gemas foram

avaliadas semanalmente até completarem 30 dias. Obteve-se a porcentagem semanal das gemas brotadas, seguido da padronização do número de plantas para todos os tratamentos. Foram adotadas 15 plantas para cada unidade experimental.

A incidência da doença foi determinada mediante o estabelecimento da porcentagem de plantas com chicotes de carvão, em relação ao número total de plantas inoculadas. Após o aparecimento da primeira planta com sintoma/sinal (chicote), as avaliações foram realizadas semanalmente até 180 dias do plantio. A cada avaliação, as plantas sintomáticas foram removidas e eliminadas. Depois desse período, todas as plantas foram cortadas na altura de 1 cm do colo das plantas e avaliadas em cana-soca por mais 180 dias em casa de vegetação, da mesma maneira como foi descrito para cana-planta.

Durante o período do experimento foram realizados tratos culturais sempre que necessários, incluindo irrigação via aspersão (10 a 15 mm/dia); adubação com sulfato de amônio distribuído sobre a superfície do substrato com 3g/vaso e adubação foliar com 10 g/L de Mono Amônio Fosfato (MAP: constituído de 9% de N e 44% de P_2O_5), 15g/L de nitrato de cálcio (14% de N) (LANDELL et al., 2013).

Foram obtidas as médias de temperatura máxima e mínima durante o período de condução do experimento em cana-planta de 36,0 e 20,2°C e em cana-soca de 30,1 e 16,9°C, respectivamente; e dados de umidade relativa máxima e mínima em cana-planta de 91,0 e 35,0% e cana-soca de 90,2 e 37%, respectivamente.

3.6.3 Experimento 2 – Avaliação dos métodos de inoculação e caracterização dos genótipos quanto a resistência ao carvão

Esse experimento foi realizado durante o período de 02/09/2013 a 03/03/2014 em cana-planta em casa de vegetação e de 16/06/2014 a 30/12/2014 em cana-soca conduzida a campo, sendo aproximadamente 180 dias para cana-planta e 180 dias para cana-soca.

O experimento em cana-planta foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, instalado em casa de vegetação.

Foram empregados os genótipos Co419, NA56-79, SP80-3280, RB925345, IACSP93-3046, IACSP95-5000, IACSP95-5094, IACSP96-2042, IACSP96-3060,

IACSP96-7569, IACSP96-3076, IACSP97-4039, IACSP98-2053, IACSP03-4080. A inoculação foi realizada por aspersão, imersão e punctura das gemas dos minitoletes, utilizando suspensão na concentração de 10^6 teliósporos/mL com espalhante adesivo a 0,01% como descrito anteriormente. Para os tratamentos testemunhas foram empregados os mesmos métodos de inoculação, porém sem inóculo.

Após a inoculação, os minitoletes foram mantidos em câmara para B.O.D., por 72 horas, à temperatura que apresentou melhor resultado de pós-inoculação, 28°C. Em seguida, foram transplantados em copos plásticos descartáveis de 0,250 L contendo substrato Tropstrato HT®, e mantidos em casa de vegetação por 180 dias. Cada unidade amostral constou de 28 minitoletes de uma gema cada, totalizando plantio de 112 minitoletes por tratamento (genótipo x método x repetições).

As avaliações de brotação das gemas foram realizadas semanalmente em casa de vegetação até completarem 30 dias do plantio dos minitoletes. Após esse período, para melhor uniformidade entre os tratamentos, foi padronizado manter 15 plantas em cada unidade experimental, descartando as mudas que sobraram.

A avaliação da incidência da doença, por meio da porcentagem de plantas com chicotes de carvão, foi realizada semanalmente após o surgimento do primeiro chicote, estendendo por aproximadamente 180 dias do plantio.

Durante o período do experimento em cana-planta, foram realizados tratamentos culturais de irrigação via aspersão (10 a 15 mm/dia), adubação sobre a superfície do substrato com sulfato de amônio distribuído com 3g/vaso e adubação foliar com 10 g/L de Mono Amônio Fosfato (MAP: constituído de 9% de N e 44% de P_2O_5), 15g/L de nitrato de cálcio (14% de N) (LANDELL et al., 2013).

Foram obtidas as médias de temperatura máxima e mínima durante o período de condução do experimento de 34,1 e 15,9°C, respectivamente; e dados de umidade relativa máxima e mínima de 81,3 e 27,0%, respectivamente.

Após período de avaliação da cana-planta, as plantas foram cortadas na altura de 1 cm do colo, e mantidas em casa de vegetação para brotação, sendo posteriormente transplantadas a campo em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições para avaliação da cana-soca.

O solo onde foi instalado o experimento possuía as seguintes características químicas: pH de 5,4 (em $CaCl_2$); 26 g.dm⁻³ de matéria orgânica (MO); 45,0 mg.dm⁻³

de P (resina); 6,88 mmolc.dm⁻³ de K⁺; 28,20 mg.dm⁻³ de Ca²⁺ e 19,06 mg.dm⁻³ de Mg²⁺; 13,0 mg.dm⁻³ de S; 84,14 mg.dm⁻³ de capacidade de troca catiônica (CTC); V de 64,35%; e composição granulométrica com 225, 163 e 612 g.kg⁻¹ de areia, silte e argila, respectivamente, caracterizada como textura muito argilosa.

Foi realizada a adubação de cobertura em cana-soca por meio de distribuição de 5 g/cova do adubo formulado 20-00-20 cerca de 20 dias após transplante das mudas, equivalente a 60Kg.ha⁻¹ de N e K₂O, conforme análise de solo e recomendações de Raiji et al. (1997). O volume total de precipitação e irrigação durante a condução do experimento foi de 1523 (373,0 e 1150 mm de chuva e irrigação, respectivamente).

As médias de temperaturas máximas e mínimas durante o período foram de 30,6°C e 16,4°C, respectivamente. Os dados de umidade relativa máxima e mínima foram de 87,4% e 34,7%, respectivamente.

A avaliação da incidência do carvão foi realizada da mesma maneira como descrito anteriormente, sendo eliminadas as plantas/touceiras doentes a cada avaliação.

3.6.4 Experimento 3 - Determinação dos padrões de suscetibilidade e resistência ao carvão

Nesse experimento, foram utilizados seis genótipos anteriormente classificados com relação ao comportamento frente ao carvão, sendo: Co419, IACSP93-3046, IACSP03-4080 (suscetíveis), NA56-79 (intermediário), SP80-3280 e IACSP95-5094 (resistentes). O trabalho foi realizado no período de 16/09/2014 a 19/03/2015, em área de campo, em cana-planta, avaliado por aproximadamente 180 dias.

Os métodos de inoculação (aspersão, imersão e punctura) e a temperatura pós-inoculação (28°C) foram realizados conforme descrito anteriormente. Os minitoletes plantados em copos de 0,250 L, foram mantidos em casa de vegetação por 60 dias para a formação das mudas. As avaliações de brotação das gemas foram realizadas semanalmente até completarem 30 dias do plantio dos minitoletes em copos descartáveis. Após esse período, para melhor uniformidade entre os tratamentos, foi padronizado manter 15 plantas em cada unidade experimental, descartando-se as

mudas que sobraram.

Posteriormente, essas foram transferidas para o campo em área experimental do Departamento de Fitossanidade da UNESP, Jaboticabal-SP, em espaçamento de 0,3 m entre plantas x 0,5 m entre linhas. O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições. A avaliação da incidência de plantas sintomáticas (carvão) foi realizada durante 180 dias após plantio dos minitoletes, sendo eliminada a touceira doente de cada avaliação. Não houve avaliação em cana-soca, dado ao elevado número de plantas sintomáticas (chicote) eliminadas no transcorrer das avaliações em cana-planta.

O solo onde foi instalado o experimento a as seguintes características químicas: pH de 5,4 (em CaCl_2); 27 g.dm^{-3} de matéria orgânica (MO); 40,0 mg.dm^{-3} de P (resina); 6,44 mmolc.dm^{-3} de K^+ ; 42,10 mg.dm^{-3} de Ca^{2+} e 17,29 mg.dm^{-3} de Mg^{2+} ; 13,0 mg.dm^{-3} de S; 89,83 mg.dm^{-3} de capacidade de troca catiônica (CTC); V de 73,28%.

A adubação de plantio foi realizada por meio de distribuição de 5 g/cova do adubo formulado 20-00-20 cerca de 20 dias após transplantio das mudas, equivalente a 60Kg.ha⁻¹ de N e K₂O, conforme análise de solo e recomendações de Raiji et al. (1997).

Durante todo o período do experimento, o volume total de precipitação e irrigação foi de 1150 mm (520 e 630 mm de chuva e irrigação, respectivamente). As médias de temperaturas máximas e mínimas foram de 33,9°C e 19,6°C, respectivamente. Dados de umidade relativa máxima e mínima foram de 80,0% e 35,0%, respectivamente.

3.7 Registro de dados climáticos

Levando em consideração os três experimentos, aqueles realizados em casa de vegetação, no transcorrer da experimentação, foram registrados os dados diários de temperatura (máxima e mínima) e umidade relativa do ar (máxima e mínima) por meio de um termohigrômetro instalado no local dos experimentos.

Nos experimentos realizados em campo, os dados meteorológicos foram obtidos por meio de uma estação meteorológica automatizada (marca Davis

Instruments), localizada a 50 metros das áreas experimentais.

3.8 Avaliação da brotação das gemas dos genótipos

Avaliou-se a brotação das gemas em todos os três experimentos realizados por meio das porcentagens de gemas brotadas de cada tratamento com o objetivo de obter a influência dos tratamentos de inoculação e temperatura pós-inoculação na brotação das gemas.

3.9 Caracterização dos genótipos quanto à resistência à *S. scitamineum*

A influência dos tratamentos e do comportamento dos genótipos foi determinada mediante a porcentagem de gemas brotadas. A classificação dos níveis de resistência foi baseada em descrições feitas por Bailey (observações feitas a campo) citado por Singh, Somai e Pillay (2005), sendo adotado exclusivamente a variável incidência a saber:

Muito Resistente (MR): incidência de plantas sintomáticas (chicote) foi inferior a 1%

Resistente (R): quando o número de plantas sintomáticas foi de 1 a 5%

Intermediário (I): quando houve de 6 a 19% de plantas sintomáticas

Suscetível (S) - quando houve de 20 a 40% de plantas sintomáticas

Muito Suscetível (MS) - acima de 40% das plantas com sintomas da doença.

Neste estudo, de forma complementar, foi proposta e utilizada uma nova escala a qual considera os quocientes de valores de resistência e suscetibilidade, dentre os extremos, para o estabelecimento do *status* quanto a: Resistente (R), intermediário e Suscetível.

3.10. Delineamento experimental e análise estatística

Em casa de vegetação, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (experimento 1: cana-planta e cana-soca; experimento 2: cana-planta), em campo, o de blocos ao acaso (experimento 2: cana-soca e experimento 3: cana-planta).

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS, versão 9.2, realizando análise de variância com os fatores avaliados e teste “t” (LSD = least significant difference) a 5% ($P \leq 0,05$). Foram realizadas transformações de alguns dados em Ln (logarítmo neperiano) na contagem $Ln = \log(x+5)$ para incidência de plantas com sintomas (chicote), em todas as unidades experimentais dos experimentos realizados.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1 - Influência de temperaturas pós-inoculação e métodos de inoculação na brotação das gemas e na incidência de *Sporisorium scitamineum* em genótipos de cana-de-açúcar

Houve diferença significativa entre os genótipos estudados no primeiro experimento (2012-2013) tanto na porcentagem de brotação das gemas ($p < 0,0001$) como na incidência da doença ($p < 0,0001$). O maior índice de brotação das gemas e de incidência da doença foi verificado no genótipo IACSP03-4080 (Figuras 9A e 9B; Figura 10).

Foi observado maior índice de brotação das gemas sem inóculo (sadias) quando essas foram submetidas à imersão, e contrariamente, menor brotação quando se utilizou o método de aspersão. No entanto, quando os minitoletes foram inoculados com o patógeno *S. scitamineum*, a maior brotação ocorreu sob método de punctura (Figuras 9A e 9B).

De modo geral, não houve influência das temperaturas na brotação das gemas sadias e inoculadas com o patógeno ($p = 0,0856$). No entanto, quando se estudou a interação entre temperaturas e métodos de inoculação, as gemas sadias apresentaram maior brotação a 28°C quando submetidas aos métodos de aspersão e imersão, e a 26 e 30°C ao método por punctura (Figuras 9A e 9B). Quando as gemas foram inoculadas com o patógeno, sob o método de aspersão, não houve influência das temperaturas. No entanto, quando submetidas à inoculação por punctura, houve maior porcentagem de gemas brotadas a 26 e 30°C, e por imersão a 26 e 28°C (Figuras 9A e 9B).

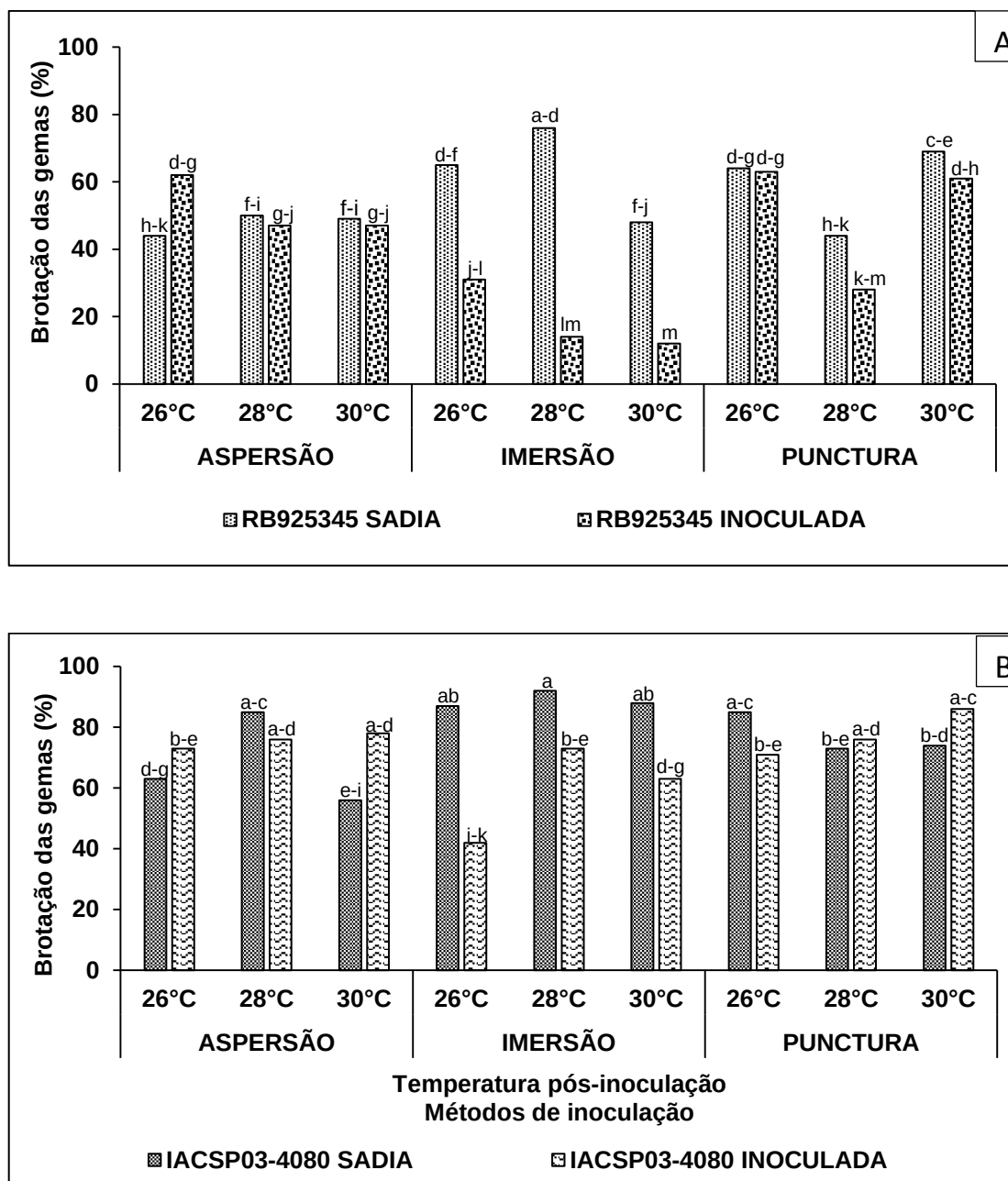


Figura 9. Brotação de gemas (%) de plantas de cana-de-açúcar RB925345 (A) e IACSP03-4080 (B) inoculadas e não inoculadas (sadias) com *Sporisorium scitamineum* mediante os métodos por aspersão, imersão e punctura em suspensão contendo 10^6 teliósporos/mL, expostas a três temperaturas pós-inoculação (26, 28 e 30°C), por 72 horas. Letras diferentes entre métodos e temperaturas, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

Nota-se que houve maior brotação das gemas sadias em relação às gemas inoculadas com o patógeno em ambos os genótipos estudados ($p=0,0392$; Figuras 9A e 9B).

Independente dos genótipos estudados, e da condição da gema sadia ou inoculada, a temperatura que mais favoreceu a brotação das gemas e incidência de carvão foi a de 28°C (Figuras 9A, 9B e 10).

Também, vale ressaltar que o método de imersão favoreceu a brotação de gemas sadias. No entanto, quando as gemas foram inoculadas com *S. scitamineum*, a maior brotação ocorreu quando inoculadas por punctura (Figuras 9A e 9B).

O genótipo IACSP03-4080 apresentou maiores índices de carvão em relação ao RB925345 independente dos métodos de inoculação e temperatura pós-inoculação estudados ($p<0,0001$; Figura 10).

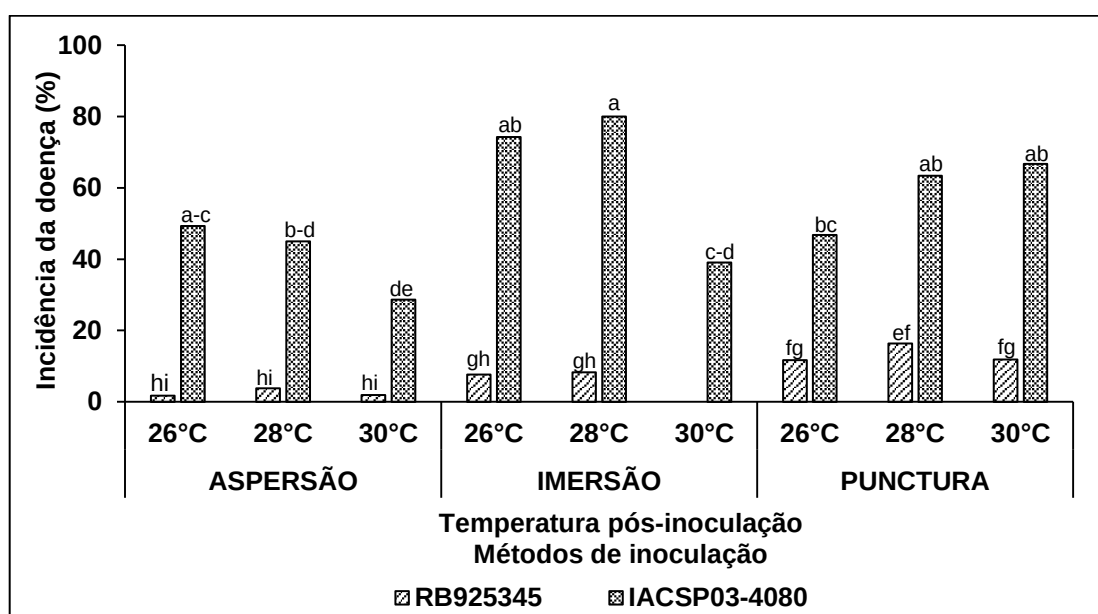


Figura 10. Incidência de plantas de cana-de-açúcar com chicotes (%) nos genótipos RB925345 e IACSP03-4080, previamente submetidas a inoculação com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliosporos/mL, por aspersão, imersão e punctura, expostas a três temperaturas pós-inoculação (26, 28 e 30°C), por 72 horas. Letras diferentes entre os métodos e temperaturas, indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

4.2 Experimentos 2 e 3 - Efeito dos métodos de inoculação na brotação de gemas e incidência de *Sporisorium scitamineum* em genótipos de cana-de-açúcar

O segundo experimento, realizado em 2013-2014, para a porcentagem de brotação de gemas, houve diferença estatisticamente significativa na interação entre os métodos de inoculação e genótipos estudados ($p < 0,0001$). Houve influência negativa do método de inoculação por punctura na brotação das gemas na maioria dos genótipos, quando comparados aos métodos de inoculação por aspersão e imersão (Figura 11).

A maior porcentagem de gemas brotadas, independentemente do método de inoculação, foi verificada para o genótipo IACSP03-4080. Já as menores porcentagens de gemas brotadas foram observadas para os genótipos IACSP96-2042 e IACSP97-4039.

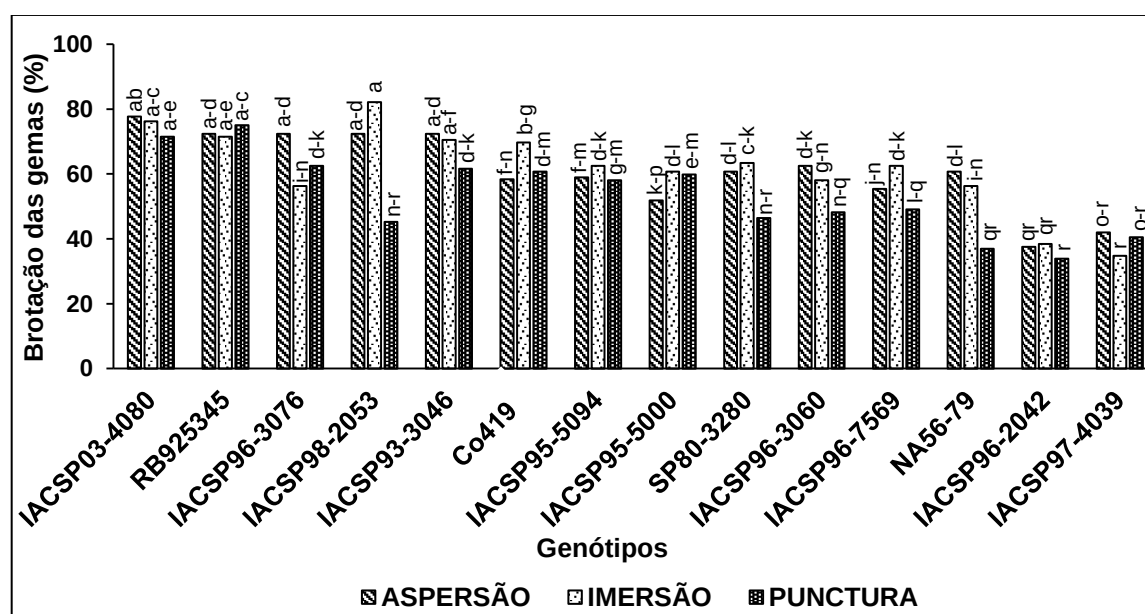


Figura 11. Brotção de gemas (%) de 14 genótipos de cana-de-açúcar, inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliosporos/mL mediante os métodos por aspersão, imersão e punctura em cana-planta, em casa de vegetação (2013-2014). Letras diferentes entre os genótipos e métodos, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

Embora tenha sido baixa a incidência geral de plantas sintomáticas em cana-planta, no ensaio em casa de vegetação, independentemente do método de inoculação utilizado (aspersão, imersão e punctura), observa-se que para o genótipo IACSP03-4080, a porcentagem de plantas doentes foi expressiva, sendo de 32%, 20% e 45% (Figura 12), respectivamente segundo escala de Bailey caracterizado como suscetível por aspersão e imersão, e muito suscetível por punctura (Tabelas 2 e 3). O genótipo RB925345 apresentou-se como intermediário no método de punctura (8%), e resistente quando submetido aos métodos por aspersão e imersão. O genótipo Co419 apresentou-se como intermediário, pelo método de inoculação por aspersão (9%), muito resistente pelo método de imersão, e resistente pelo método de punctura (Figura 12; Tabelas 2 e 3).

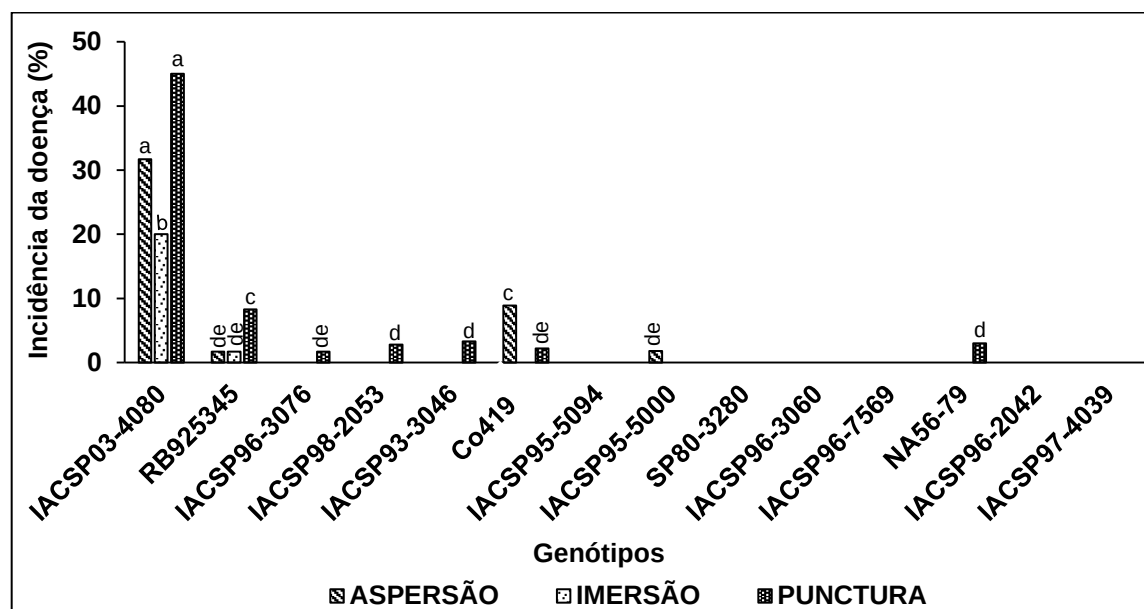


Figura 12. Incidência de canas-planta com chicote (%), correspondentes a 14 genótipos de cana-de-açúcar inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos por aspersão, imersão e punctura, cultivados em casa de vegetação (2013-2014). Letras diferentes entre os genótipos e métodos, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

Os genótipos IACSP96-3076, IACSP98-2053 e IACSP93-3046 apresentaram-se como muito resistentes pelo método de aspersão e imersão, e resistentes por

punctura. NA56-79 apresentou-se como resistente nos métodos de aspersão e punctura, e muito resistente em imersão. IACSP96-2042 e IACSP97-4039 mostraram-se resistentes mediante o método de inoculação por aspersão, e muito resistentes pelos métodos de imersão e punctura. Os demais genótipos, IACSP95-5094, IACSP95-5000, SP80-3280, IACSP96-3060, IACSP96-7569, apresentaram-se como muito resistentes em todos os métodos de inoculação (Figura 12; Tabela 3).

Quando da avaliação da cana-soca do experimento (2013-2014), houve interação significativa entre genótipos e métodos de inoculação estudados ($p < 0,0001$). Independente do genótipo, houve maior expressão dos sintomas e sinais comparado à cana-planta (Figuras 12 e 13). Exceção aplica-se apenas para o genótipo IACSP03-4080, embora o mesmo tenha se mantido suscetível.

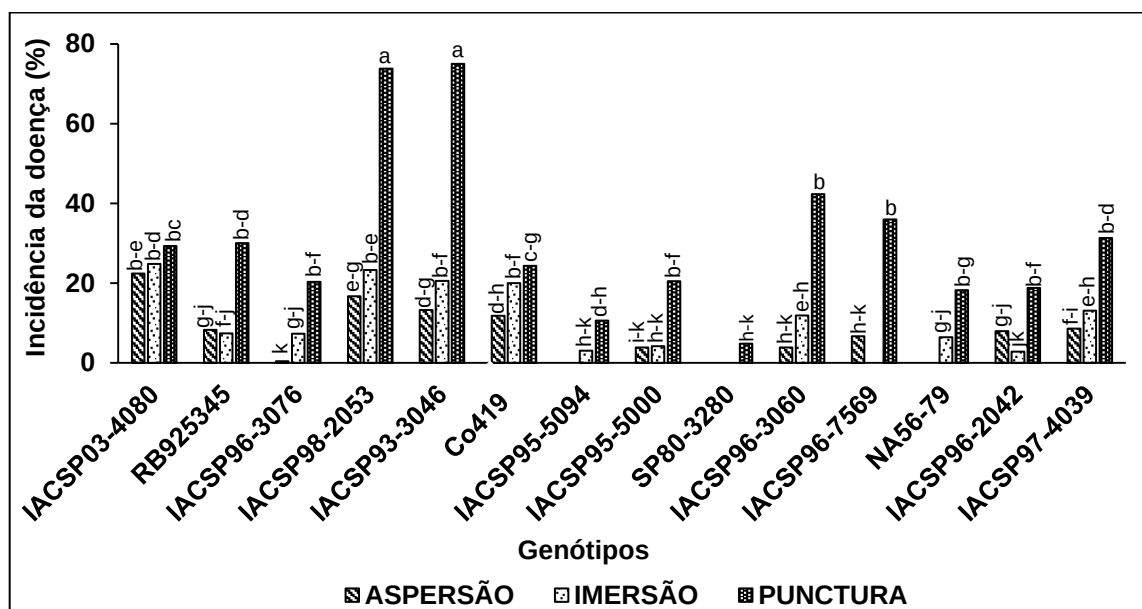


Figura 13. Incidência de canas-soca sintomáticas (%), correspondentes a 14 genótipos de cana-de-açúcar inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos por aspersão, imersão e punctura, mantidos a campo (2013-2014). Letras diferentes entre os genótipos e métodos, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

Quanto ao comportamento dos genótipos a *S. scitamineum* pelo método de inoculação por aspersão, apenas IACSP03-4080 apresentou-se suscetível, enquanto

os genótipos RB925345, IACSP98-2053, IACSP93-3046, Co419, IACSP96-7569, IACSP96-2042 e IACSP97-4039 apresentaram-se como intermediários; IACSP95-5000 e IACSP96-3060 como resistentes e os demais IACSP96-3076, IACSP95-5094, SP80-3280 e NA56-79, como muito resistentes (Tabelas 2 e 3).

Mediante o método de inoculação por imersão, os genótipos suscetíveis foram IACSP03-4080, IACSP98-2053, IACSP93-3046 e Co419. Intermediários foram RB925345, IACSP96-3076, IACSP96-3060, NA56-79 e IACSP97-4039 e, resistentes, IACSP95-5094, IACSP95-5000 e IACSP96-2042. Os genótipos muito resistentes foram SP80-3280 e IACSP96-7569.

Pelo método de inoculação por punctura, a maioria dos genótipos foi caracterizado como suscetíveis, como IACSP03-4080, RB925345, IACSP96-3076, Co419, IACSP95-5000, IACSP96-7569 e IACSP97-4039, ou muito suscetíveis, IACSP98-2053, IACSP93-3046 e IACSP96-3060, o que representou cerca de 71% dos genótipos. Os demais genótipos, como IACSP95-5094, NA56-79, IACSP96-2042 comportaram-se como intermediários, e SP80-3280 como resistente.

Já para o terceiro experimento, realizado em 2014-2015, foi constatado efeito significativo na interação entre os tratamentos correspondentes aos métodos de inoculação realizados em cana-planta e os seis genótipos avaliados quanto à porcentagem de gemas brotadas ($p < 0,0001$; Figura 14A), e quanto à incidência de plantas sintomáticas ($p = 0,0070$; Figura 14B).

Para a maioria dos genótipos, exceto NA56-79, o método de inoculação por aspersão propiciou maior brotação das gemas. Porém, pelo método por punctura, houve menor porcentagem de brotação em todos os genótipos (Figura 14A).

Houve redução na brotação dos genótipos Co419, IACSP03-4080, IACSP93-3046, NA56-79, IACSP95-5094 e SP80-3280, de 24,7%, 6%, 0%, 12,6%, 8% e 0%, quando inoculados pelo método por aspersão; e de 31,3%, 0%, 11,7%, 7,2%, 34,7% e 0%, quando inoculados pelo método por imersão, e 34,1%, 30,6%, 24,3%, 11%, 41,3% e 1,2% por punctura, respectivamente quando se compara com a brotação das gemas nas testemunhas. A maior porcentagem na brotação das gemas foi verificada no genótipo IACSP03-4080, e menor no genótipo Co419, independente dos métodos de inoculação avaliados (Figura 14A).

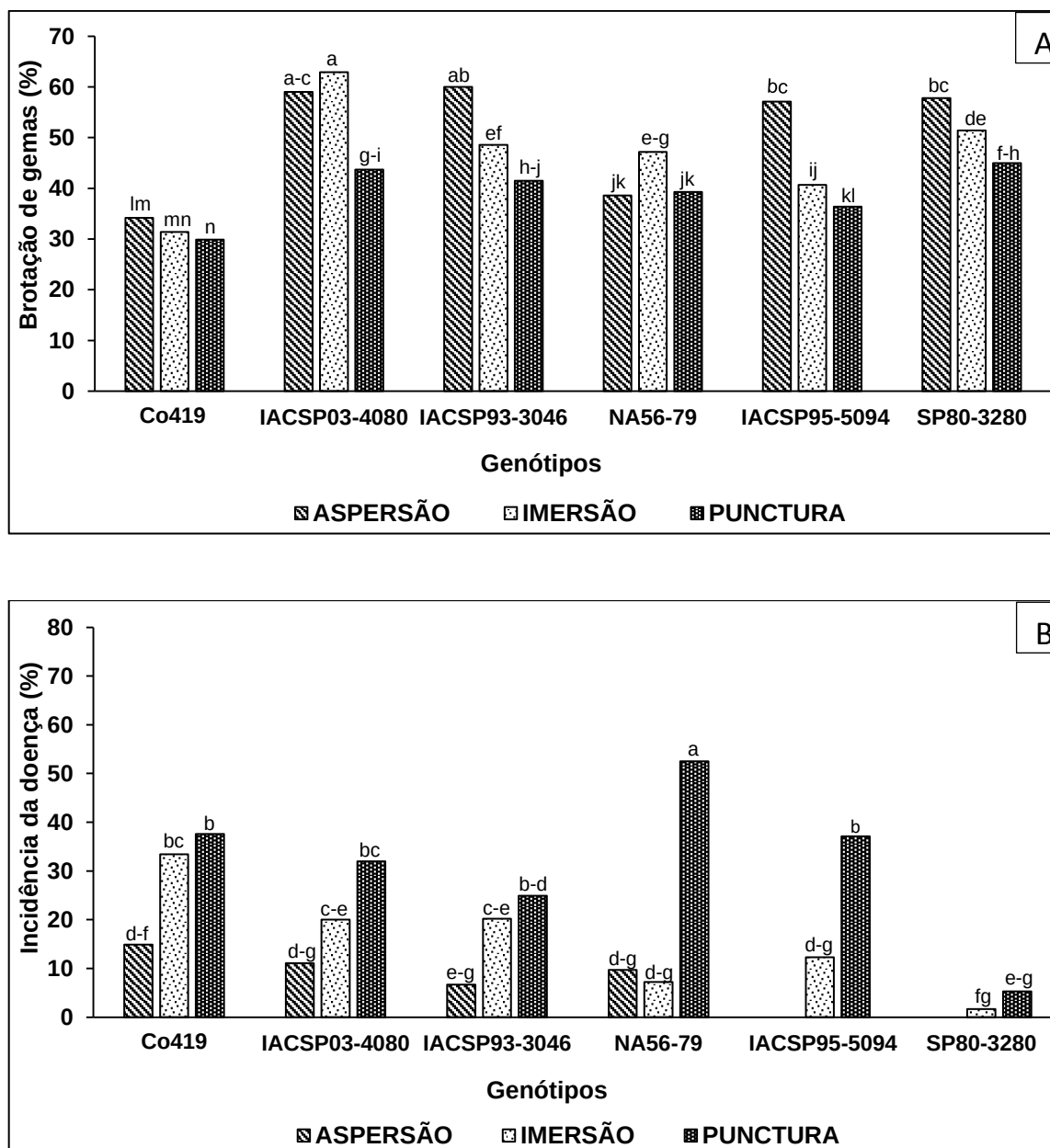


Figura 14. Porcentagem de brotação de gemas (A) e de incidência de plantas de cana-de-açúcar sintomáticas (B) de seis genótipos de canas-planta, mantidas a campo, inoculadas com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos por aspersão, imersão e punctura (2014-2015). Letras diferentes entre genótipos e métodos, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Número de letras maior que dois, apresentada por hífen, representa intervalos de letras.

Quando avaliado a campo, pelo método de inoculação por aspersão, os genótipos IACSP95-5094 e SP80-3280 comportaram-se como muito resistentes, e os demais intermediários. Sob inoculação por imersão, os genótipos IACSP03-4080,

IACSP93-3046, Co419, comportaram-se como suscetíveis, IACSP95-5094 e NA56-79, como intermediários, e SP80-3280, como resistente. Por punctura, a maioria dos materiais comportou-se como suscetíveis (IACSP03-4080, IACSP93-3046, Co419, IACSP95-5094) e muito suscetível (NA56-79). O genótipo SP80-3280 foi o único que se comportou como resistente (Tabelas 2 e 3).

O método de inoculação mediante deposição de gota de suspensão de *S. scitamineum* e punctura, com exceção para o experimento 2012-2013, foi o mais drástico, interferindo na brotação das gemas, como constatado nos experimentos 2 (2013-2014) e 3 (2014-2015), respectivamente (Figura 15).

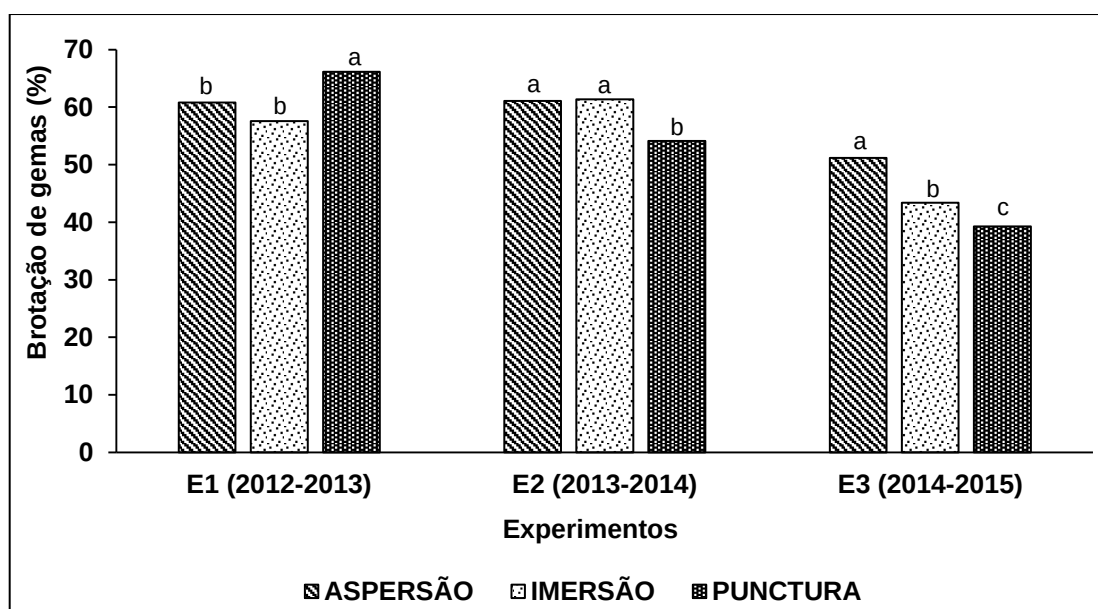


Figura 15. Porcentagem média de brotação de gemas de genótipos de cana-de-açúcar inoculadas com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos por aspersão, imersão e punctura, em três experimentos (2012-2013, 2013-2014 e 2014-2015). Letras diferentes entre os tratamentos dentro de cada experimento, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”.

A maior incidência de plantas sintomáticas, tanto em cana-planta como em cana-soca, nos três experimentos avaliados, em casa de vegetação e a campo, foi verificado quando da inoculação de *S. scitamineum* mediante o método por punctura. Também se verifica que nos métodos de inoculação por punctura e imersão, foram

observados maiores índices de doença quando comparados com o método de aspersão (Figura 16).

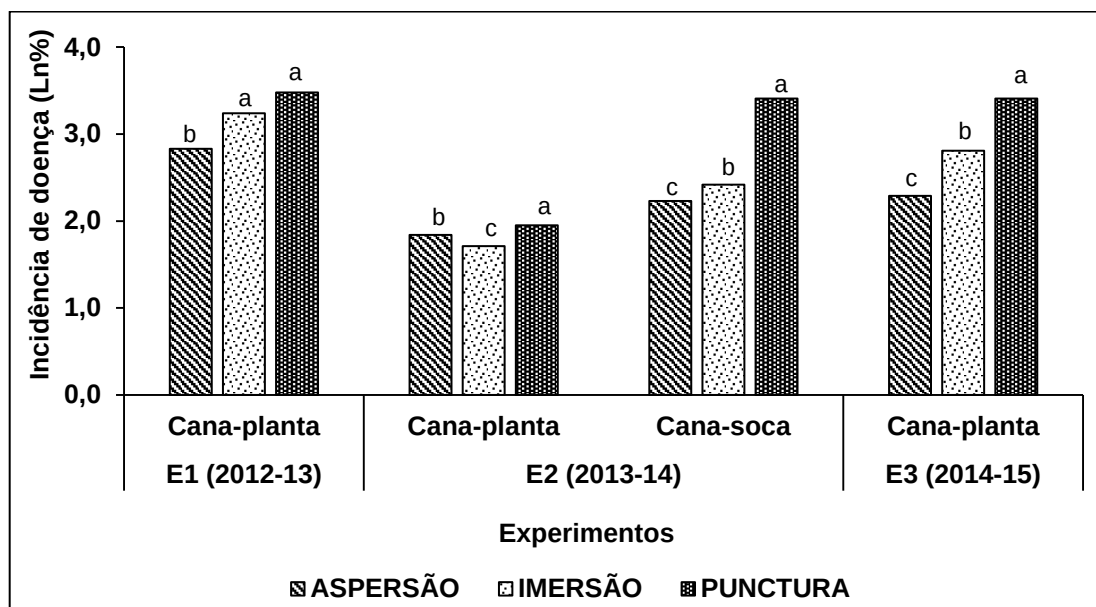


Figura 16. Incidência média (%) de cana-planta e cana-soca de genótipos de cana-de-açúcar sintomáticas, inoculadas com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos por aspersão, imersão e punctura, nos experimentos 2012-2013, 2013-2014 e 2014-2015. Letras diferentes entre os tratamentos dentro de cada experimento, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”.

4.3 Caracterização de genótipos de cana-de-açúcar quanto à suscetibilidade/resistência à *S. scitamineum* pelos métodos de aspersão, imersão e punctura

Os genótipos foram caracterizados segundo a escala de Bailey, quanto à incidência de carvão, em porcentagens de plantas doentes (Tabelas 1 e 2). Porém, devido às dificuldades encontradas em expressar os sintomas da doença (chicotes) em determinados experimentos, visando a caracterização dos genótipos, propõe-se nesse trabalho uma nova escala de avaliação quanto à incidência da doença. Tal proposta contempla em alternativa na distinção dos genótipos em resistentes, intermediários e suscetíveis. Essa escala porém, pode ainda ser utilizada mesmo quando as condições favorecem um elevado índice da doença (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Incidência de cana-planta (CP) e cana-soca (CS) com presença de chicotes (%) em 14 genótipos de cana-de-açúcar inoculadas com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL, pelos métodos por aspersão, imersão e punctura, em três anos de experimentação (2012-2013, 2013-2014, 2014-2015).

INCIDÊNCIA DE CARVÃO (%)																		
GENÓTIPOS	EXP 1 (2012-2013)						EXP 2 (2013-2014)						EXP 3 (2014-2015)					
	ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA		ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA		ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA	
	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS
IACSP03-4080	40,99 a	.	64,44 a	.	58,93 a	.	32,00 a	22,00 a	20,00 a	25,00 a	45,00 a	29,00 bc	12,09 a	.	20,46 ab	.	30,85 a	.
RB925345	2,52 b	.	5,34 b	.	13,31 b	.	2,00 c	8,00 b-d	2,00 b	7,00 bc	8,00 b	30,00 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP96-3076	.	.	.	.	.	.	0,00 c	0,00 e	0,00 b	7,00 b-d	2,00 c	20,00 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP98-2053	.	.	.	.	.	.	0,00 c	17,00 ab	0,00 b	23,00 a	3,00 bc	74,00 a	.	.	.	.	.	.
IACSP93-3046	.	.	.	.	.	.	0,00 c	13,00 ab	0,00 b	21,00 ab	3,00 bc	75,00 a	7,16 a	.	20,17 ab	.	25,87 a	.
Co419	.	.	.	.	.	.	9,00 b	12,00 a-c	0,00 b	20,00 ab	2,00 c	24,00 bc	14,85 a	.	33,83 a	.	37,60 a	.
IACSP95-5094	.	.	.	.	.	.	0,00 c	0,00 e	0,00 b	3,00 cd	0,00 c	11,00 cd	0,00 b	.	12,25 b	.	37,08 a	.
IACSP95-5000	.	.	.	.	.	.	2,00 c	4,00 de	0,00 b	4,00 cd	0,00 c	21,00 bc	.	.	.	.	.	.
SP80-3280	.	.	.	.	.	.	0,00 c	0,00 e	0,00 b	0,00 d	0,00 c	5,00 d	0,00 b	.	1,67 c	.	5,28 b	.
IACSP96-3060	.	.	.	.	.	.	0,00 c	4,00 c-e	0,00 b	12,00 a-c	0,00 c	42,00 ab	.	.	.	.	.	.
IACSP96-7569	.	.	.	.	.	.	0,00 c	7,00 b-e	0,00 b	0,00 d	0,00 c	36,00 ab	.	.	.	.	.	.
NA56-79	.	.	.	.	.	.	0,00 c	0,00 e	0,00 b	6,00 bc	3,00 bc	18,00 bc	9,67 a	.	7,37 bc	.	52,53 a	.
IACSP96-2042	.	.	.	.	.	.	0,00 c	8,00 b-d	0,00 b	3,00 cd	0,00 c	19,00 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP97-4039	.	.	.	.	.	.	0,00 c	9,00 b-d	0,00 b	13,00 a-c	0,00 c	31,00 bc	.	.	.	.	.	.

O número de genótipos variou de um experimento para o outro, sendo a ausência representado por ponto. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si pelo teste “t”. Quando o número de letras for maior que dois, essas são apresentadas por hífen, representando intervalos de letras.

Tabela 3. Caracterização dos genótipos inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelo método de aspersão (ASP), imersão (IMER) e punctura (PUNC) em três experimentos (2012-2013, 2013-2014, 2014-2015), em cana-planta e cana-soca, segundo escala de Bailey.

CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO À RESISTÊNCIA AO CARVÃO												
GENÓTIPOS	EXP 1 (2012-2013)						EXP 2 (2013-2014)					
	CANA-PLANTA ESTUFA			CANA-SOCA ESTUFA			CANA-PLANTA ESTUFA			CANA-SOCA CAMPO		
	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN
IACSP03-4080	MS	MS	MS	MR	MR	MR	S	S	MS	S	S	S
RB925345	R	R	I	MR	MR	MR	R	R	I	I	I	S
IACSP96-3076	.	.	.	.	.	.	MR	MR	R	MR	I	S
IACSP98-2053	.	.	.	.	.	.	MR	MR	R	I	S	MS
IACSP93-3046	.	.	.	.	.	.	MR	MR	R	I	S	MS
Co419	.	.	.	.	.	.	I	MR	R	I	S	S
IACSP95-5094	.	.	.	.	.	.	MR	MR	MR	MR	R	I
IACSP95-5000	.	.	.	.	.	.	MR	MR	MR	R	R	S
SP80-3280	.	.	.	.	.	.	MR	MR	MR	MR	MR	R
IACSP96-3060	.	.	.	.	.	.	MR	MR	MR	R	I	MS
IACSP96-7569	.	.	.	.	.	.	MR	MR	MR	I	MR	S
NA56-79	.	.	.	.	.	.	R	MR	R	MR	I	I
IACSP96-2042	.	.	.	.	.	.	R	MR	MR	I	R	I
IACSP97-4039	.	.	.	.	.	.	R	MR	MR	I	I	S

O número de genótipos variou de um experimento para o outro, sendo a ausência representada por ponto. MS=muito suscetível; S=suscetível; I=intermediário; R=resistente; MR=muito resistente. Os genótipos destacados na cor vermelha, representam os padrões de suscetibilidade; na cor amarela, intermediário; e na cor verde, padrão de resistência. A seleção para a padronização foi realizada com base na repetibilidade dos resultados observados nos experimentos a campo.

Tabela 4. Incidência de cana-planta (CP) e cana-soca (CS) com chicotes de carvão, transformadas em $\text{Ln}=\log(x+5)$, em genótipos de cana-de-açúcar, inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos de aspersão, imersão e punctura, em três experimentos (2012-2013, 2013-2014, 2014-2015).

INCIDÊNCIA DE CARVÃO Ln (x+5)																		
GENÓTIPOS	EXP 1 (2012-2013)						EXP 2 (2013-2014)						EXP 3 (2014-2015)					
	ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA		ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA		ASPERSÃO		IMERSÃO		PUNCTURA	
	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS
IACSP03-4080	3,78 a	.	4,16 a	.	4,13 a	.	3,59 a	3,29 a	3,15 a	3,37 a	3,89 a	3,51 bc	2,75 a	.	3,19 ab	.	3,57 a	.
RB925345	1,88 b	.	1,97 b	.	2,69 b	.	1,82 c	2,47 b-d	1,82 b	2,45 bc	2,43 b	3,43 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP96-3076	.	.	.	.	.	.	1,61 c	1,61 e	1,61 b	2,39 b-d	1,82 c	3,21 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP98-2053	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,90 ab	1,61 b	3,33 a	1,93 bc	4,34 a	.	.	.	.	.	.
IACSP93-3046	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,87 ab	1,61 b	3,17 ab	1,93 bc	4,37 a	2,45 a	.	3,21 ab	.	3,39 a	.
Co419	.	.	.	.	.	.	2,61 b	2,77 a-c	1,61 b	3,21 ab	1,89 bc	3,02 bc	2,93 a	.	3,62 a	.	3,70 a	.
IACSP95-5094	.	.	.	.	.	.	1,61 c	1,61 e	1,61 b	2,03 cd	1,61 c	2,75 cd	1,61 b	.	2,65 b	.	3,67 a	.
IACSP95-5000	.	.	.	.	.	.	1,83 c	1,96 de	1,61 b	2,10 cd	1,61 c	3,16 bc	.	.	-	.	.	.
SP80-3280	.	.	.	.	.	.	1,61 c	1,61 e	1,61 b	1,61 d	1,61 c	2,14 d	1,61 b	.	1,82 c	.	2,27 b	.
IACSP96-3060	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,05 c-e	1,61 b	2,67 a-c	1,61 c	3,75 ab	.	.	.	.	.	.
IACSP96-7569	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,22 b-e	1,61 b	1,61 d	1,61 c	3,69 ab	.	.	.	.	.	.
NA56-79	.	.	.	.	.	.	1,61 c	1,61 e	1,61 b	2,45 bc	1,95 bc	3,13 bc	2,54 a	.	2,50 bc	.	3,91 a	.
IACSP96-2042	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,40b-d	1,61 b	1,90 cd	1,61 c	3,13 bc	.	.	.	.	.	.
IACSP97-4039	.	.	.	.	.	.	1,61 c	2,49 b-d	1,61 b	2,69 a-c	1,61 c	3,50 bc	.	.	.	.	.	.

O número de genótipos variou de um experimento para o outro, sendo a ausência representado por ponto. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre si pelo teste “t”. Quando o número de letras for maior que dois, essas são apresentadas por hífen, representando intervalos de letras.

Tabela 5. Caracterização dos genótipos de cana-de-açúcar inoculados com suspensão de *Sporisorium scitamineum* na concentração de 10^6 teliósporos/mL pelos métodos de aspersão (ASP), imersão (IMER) e punctura (PUNC) em três experimentos (2012-2013, 2013-2014, 2014-2015), segundo escala sugerida pelos autores deste trabalho.

INCIDÊNCIA DE CARVÃO Ln (x+5)																		
GENÓTIPOS	EXP 1 (2012-2013)						EXP 2 (2013-2014)						EXP 3 (2014-2015)					
	CANA-PLANTA ESTUFA			CANA-SOCA ESTUFA			CANA-PLANTA ESTUFA			CANA-SOCA CAMPO			CANA-PLANTA CAMPO			CANA-SOCA -		
	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN	ASP	IMER	PUN
IACSP03-4080	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	.	.	.
RB925345	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	S	.	.	.	.	.	.
IACSP96-3076	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	I	I	.	.	.	.	.	.
IACSP98-2053	.	.	.	.	.	.	R	R	R	S	S	S	-	-	-	.	.	.
IACSP93-3046	.	.	.	.	.	.	R	R	R	S	S	S	S	S	S	.	.	.
Co419	.	.	.	.	.	.	I	R	R	S	S	I	S	S	S	.	.	.
IACSP95-5094	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	R	I	R	I	S	.	.	.
IACSP95-5000	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	R	I	.	.	.	.	.	.
SP80-3280	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	.	.	.
IACSP96-3060	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	I	S	.	.	.	.	.	.
IACSP96-7569	.	.	.	.	.	.	R	R	R	I	R	S	.	.	.	.	.	.
NA56-79	.	.	.	.	.	.	R	R	R	R	I	I	S	I	S	.	.	.
IACSP96-2042	.	.	.	.	.	.	R	R	R	I	R	I	.	.	.	.	.	.
IACSP97-4039	.	.	.	.	.	.	R	R	R	I	I	S	.	.	.	.	.	.

O número de genótipos variou de um experimento para o outro, sendo a ausência representada por ponto. R= Resistente, I= Intermediário, S= Suscetível. Os genótipos destacados na cor vermelha, representam os padrões de suscetibilidade; na cor amarela, intermediário; e na cor verde, padrão de resistência. A seleção para a padronização dos genótipos foi realizada com base na repetibilidade dos resultados observados nos experimentos a campo.

Nessa escala, a proposta alicerça-se em dados dos padrões de suscetibilidade e resistência previamente conhecidos, para ajustar aos valores encontrados dos genótipos avaliados.

Foram utilizados os genótipos IACSP03-4080 e SP80-3280 como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente, para a adequação da escala de avaliação. Primeiramente, todos os dados de incidência da doença nos genótipos avaliados foram transformados em logaritmo neperiano, $\text{Ln} = \log (x+5)$. Em seguida, o maior e o menor valor dos respectivos dados de incidência dos padrões de suscetibilidade e resistência foram utilizados para aplicação na equação abaixo:

$$I = \frac{\text{Ln IS} - \text{Ln IR}}{3}$$

3 (categorias: Resistência, Intermediário e Suscetível)

De modo que, I=intervalo das avaliações de caracterização

Ln IS= Logaritmo neperiano (x+5) da incidência de chicotes no genótipo suscetível

Ln IR=Logaritmo neperiano (x+5) da incidência de chicotes no genótipo resistente

A partir do valor obtido de “I”, esse é somado ao valor obtido do genótipo resistente, para obter o intervalo para caracterização de genótipos resistentes. A seguir, somados novamente, tem-se o intervalo para intermediários e, somados novamente, os suscetíveis.

Os dados de incidência da doença (%), baseado no aparecimento do “chicote” bem como da caracterização dos genótipos segundo Bailey, estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Já os dados de incidência da doença nos genótipos estudados nos três experimentos, transformados em $\text{Ln} (x+5)$, bem como a caracterização dos genótipos segundo a escala proposta neste estudo, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

A partir do segundo experimento, em que os genótipos padrões de suscetibilidade (IACSP03-4080) e resistência (SP80-3280) estavam presentes na condução do experimento, verificou-se que sob o método de inoculação por aspersão em cana-planta, segundo Bailey, os genótipos foram caracterizados em S (IACSP03-4080), I (Co419), R (RB925345, NA56-79, IACSP96-2042 e IACSP97-4039) e MR

(demais genótipos). Na escala proposta, a separação dos genótipos está caracterizada como S (IACSP03-4080); I (Co419) e R (demais genótipos).

No método por imersão em cana-planta, os genótipos são caracterizados pela escala de Bailey em S (IACSP03-4080), R (RB925345) e MR (demais genótipos). Na escala proposta, as respostas são: S (IACSP03-4080) e R (demais genótipos).

Método por punctura em cana-planta, na primeira escala, os genótipos são caracterizados em MS (IACSP03-4080), I (RB925345), R (IACSP96-3076, IACSP98-2053, IACSP93-3046, Co419 e NA56-79), e MR (demais genótipos). Na segunda escala, S (IACSP03-4080), I (RB925345) e R (demais genótipos).

Para cana-soca do segundo experimento, sob método de inoculação por aspersão, a caracterização pela primeira escala foi: S (IACSP03-4080), I (RB925345, IACSP98-2053, IACSP93-3046, Co419, IACSP96-7569, IACSP96-2042 e IACSP97-4039), R (IACSP95-5000 e IACSP96-3060) e MR (demais genótipos). Na segunda escala, os genótipos foram caracterizados como S (IACSP03-4080, IACSP98-2053, IACSP93-3046 e Co419), I (RB925345, IACSP96-7569, IACSP96-2042 e IACSP97-4039), e os demais como resistentes.

Para o método de imersão, segundo Bailey, a caracterização dos genótipos deu-se em S (IACSP03-4080, IACSP98-2053, IACSP93-3046, Co419), I (RB925345, IACSP96-3076, IACSP96-3060, NA56-79 e IACSP97-4039), R (IACSP95-5094, IACSP95-5000 e IACSP96-2042) e MR (SP80-3280 e IACSP96-7569). Na escala proposta, os genótipos foram caracterizados em: S (IACSP03-4080, IACSP98-2053, IACSP93-3046 e Co419), I (RB925345, IACSP96-3076, IACSP96-3060, NA56-79 e IACSP97-4039) e R (IACSP95-5094, IACSP95-5000, SP80-3280, IACSP96-7569 e IACSP96-2042).

No método de inoculação por punctura, a caracterização segundo Bailey foi MS (IACSP98-2053, IACSP93-3046 e IACSP96-3060), S (IACSP03-4080, RB925345, IACSP96-3076, Co419, IACSP95-5000, IACSP96-7569 e IACSP97-4039), I (IACSP95-5094, NA56-79 e IACSP96-2042) e R (SP80-3280). No entanto segundo a escala proposta nesse estudo, a caracterização dos genótipos foi em S (IACSP03-4080, RB925345, IACSP98-2053, IACSP93-3046, IACSP96-3060, IACSP96-7569 e IACSP97-4039), I (IACSP96-3076, Co419, IACSP95-5094, IACSP95-5000, NA56-79 e IACSP96-2042) e R (SP80-3280).

Para o terceiro experimento em cana-planta, no método de inoculação por aspersão, os genótipos foram caracterizados em I (IACSP03-4080, IACSP93-3046, Co419 e NA56-79) e MR (IACSP95-5094 e SP80-3280), pela escala de Bailey e em S (IACSP03-4080, IACSP93-3046, NA56-79 e Co419) e R (IACSP95-5094 e SP80-3280) em escala proposta.

No método de imersão, segundo Bailey, os genótipos foram caracterizados em S (IACSP03-4080, IACSP93-3046 e Co419), I (IACSP95-5094 e NA56-79) e R (SP80-3280) e no método por punctura em S (IACSP03-4080, IACSP93-3046, Co419 e IACSP95-5094), MS (NA56-79) e R (SP80-3280). Segundo a escala proposta, pelo método de imersão, a resposta foi: S (IACSP03-4080, IACSP93-3046 e Co419), I (IACSP95-5094 e NA56-79) e R (SP80-3280) e método por punctura em S (IACSP03-4080, IACSP93-3046, Co419, IACSP95-5094 e NA56-79) e R (SP80-3280).

4.4 Curvas de progresso da doença nos experimentos em cana-planta e cana-soca em casa de vegetação e a campo

Em relação à curva de progresso da doença ao longo do tempo para o primeiro experimento, observa-se que o genótipo IACSP03-4080 comparado ao RB925345, apresentou maiores índices de doença (Figura 17).

Observa-se que o genótipo IACSP03-4080 quando submetido à temperatura pós-inoculação de 26°C, sob método de inoculação por imersão e punctura, iniciou a presença de sintomas/sinais da doença aos 81 dias após o plantio (DAP), e por aspersão aos 88 (DAP). O máximo de incidência da doença foi verificada por todos os métodos quando atingiu 158 dias. No entanto, de acordo com a escala de Bailey, esse genótipo foi considerado suscetível aos 95 DAP pelos métodos de aspersão e imersão e aos 102 DAP pelo método de punctura.

Aos 28°C de temperatura pós-inoculação, o genótipo IACSP03-4080 iniciou os sintomas/sinais aos 74 DAP sob método de imersão, aos 81 DAP sob método de punctura e aos 88 DAP sob método de aspersão. A suscetibilidade do genótipo foi observada aos 95 DAP pelo método de imersão e aos 102 DAP por punctura e aos 109 DAP pelo método de aspersão.

Já sob temperatura de 30°C, o método por punctura apresentou doença mais rapidamente que os demais métodos de inoculação (74 DAP) em relação à imersão e aspersão (81 DAP). Quanto à caracterização à suscetibilidade ao carvão, o genótipo foi considerado como suscetível pelo método de punctura aos 95 DAP, e pelos métodos de imersão (102 DAP) e aspersão (109 DAP).

Para o genótipo RB925345, quando submetido a 26°C, observou-se que o início da doença ocorreu aos 81 DAP por punctura, aos 165 DAP por imersão e aos 172 DAP por aspersão. Por ser considerado como intermediário pela escala de Bailey (Tabelas 2 e 3) e pela escala proposta (Tabelas 4 e 5) apenas o método de inoculação por punctura atingiu incidência da doença esperada, aos 116 DAP.

Aos 28°C de temperatura pós-inoculação, o genótipo RB925345 também iniciou o progresso da doença por punctura (88 DAP) em relação aos métodos de imersão (123 DAP) e aspersão (151 DAP). A doença atingiu valores de incidência para caracterização do genótipo em intermediário aos 116 DAP sob método de inoculação por punctura e aos 123 DAP por imersão.

Sob temperatura de 30°C, o genótipo RB925345 iniciou a incidência da doença com 116 DAP pelo método inoculação por punctura, 123 DAP por aspersão e por imersão não houve expressão da doença. O genótipo atingiu a porcentagem de incidência da doença para a caracterização como inintermediário aos 123 DAP apenas pelo método de punctura.

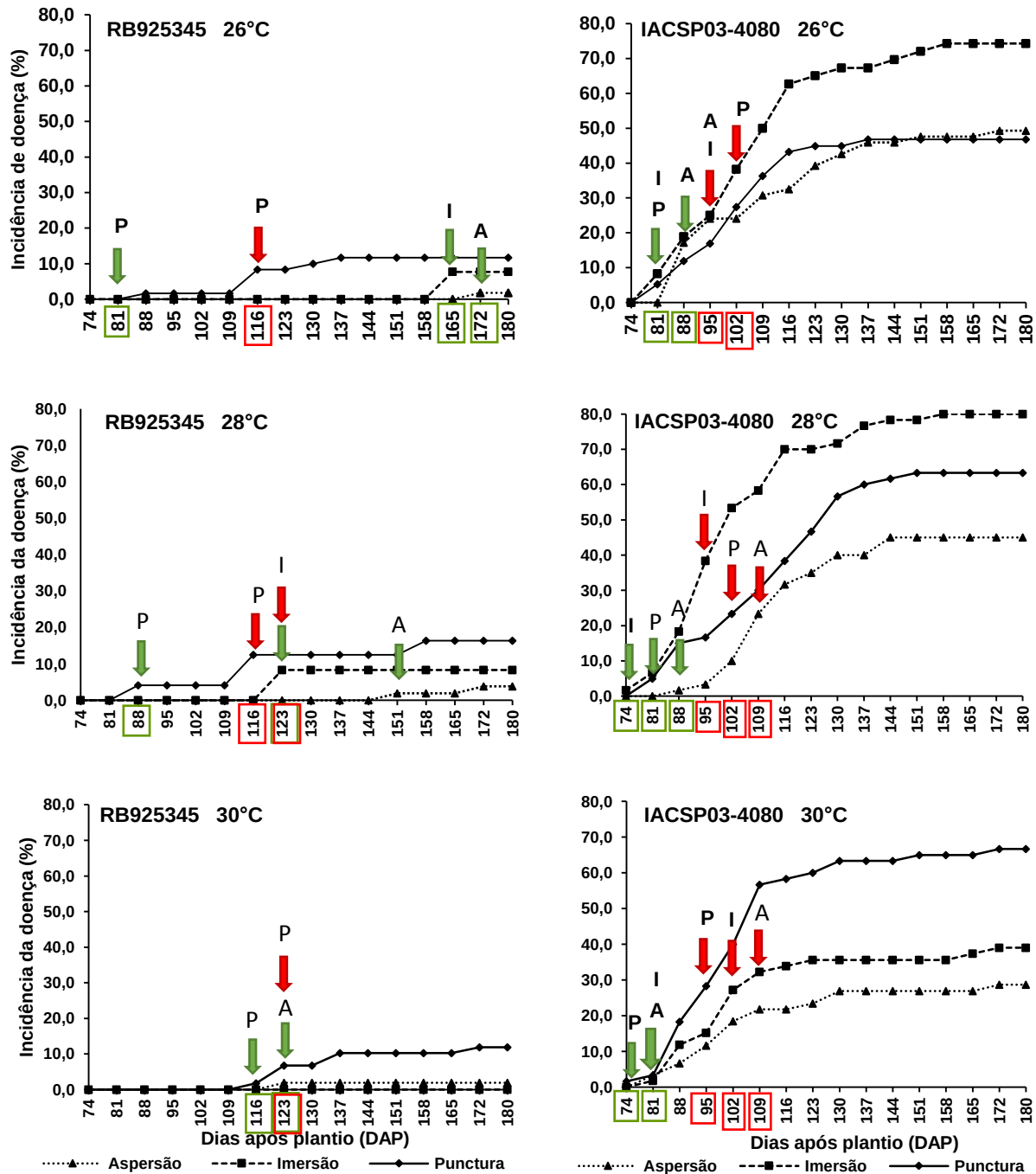


Figura 17. Curvas de progresso da doença carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) nos genótipos RB925345 e IACSP03-4080 inoculados em suspensão de 10^6 teliósporos/mL sob métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura (2012-2013) e submetidos às temperaturas de pós-inoculação de 26, 28 e 30°C.

No segundo experimento, realizado em cana-planta em casa de vegetação, verifica-se que houve baixa incidência da doença durante todo o período de avaliação (180 DAP) nos três métodos de inoculação e genótipos estudados, com exceção ao IACSP03-4080, que se manteve suscetível nos três métodos de inoculação, por aspersão, imersão e punctura (Figura 18).

Não houve expressão dos sintomas/sinais em sua plenitude nos genótipos considerados como padrões de suscetibilidade (Co419 e IACSP93-3046) e intermediário (NA56-79) nos métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura quando comparado pela escala de Bailey. Para validação dos testes visando a caracterização dos genótipos quanto à resistência ao carvão, é necessário que os padrões expressem a incidência da doença de modo que o caracterize como tal.

As transformações da incidência da doença nos diferentes genótipos, sob os métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura em $\text{Ln}(x+5)$, para obtenção da escala sugerida neste trabalho, apresentaram resultados semelhantes aos de incidência da doença.

A utilização da escala proposta, tem como objetivo adequar os padrões de suscetibilidade/resistência à resposta à interação ambiente x hospedeiro x patógeno. Porém, deve haver a expressão de sintomas dos genótipos padrões para que sejam realizados os ajustes.

A escala proposta não possui a função de corrigir erros experimentais ou condições adversas que proporcionaram a inviabilidade do experimento.

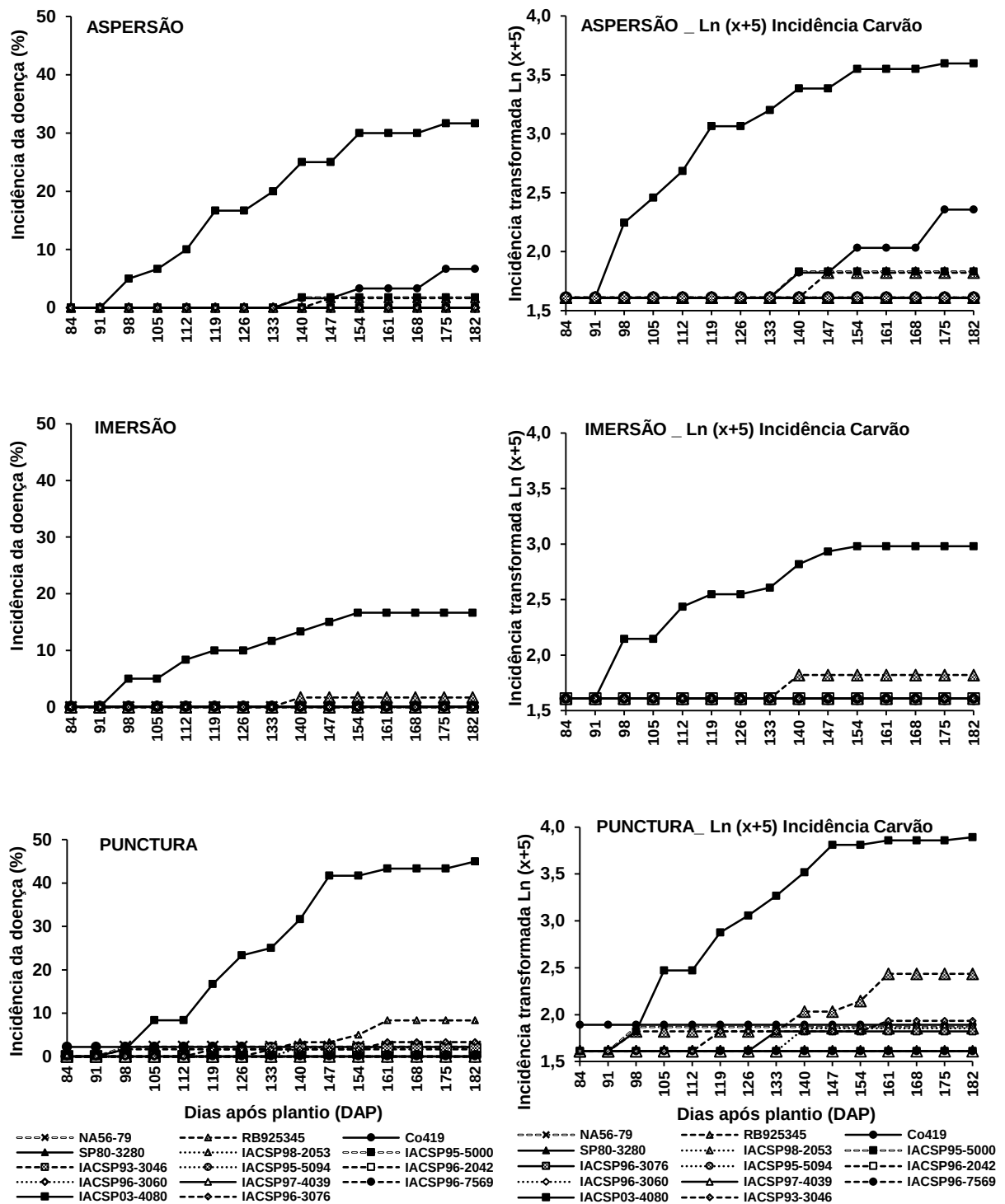


Figura 18. Curvas de progresso da doença carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) em 14 genótipos de cana-de-açúcar inoculados em suspensão de 10^6 teliósporos/mL sob métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura em experimento realizado em cana-planta em casa de vegetação (2014).

A partir da curva de progresso da doença observada no segundo experimento em cana-soca instalada em campo (2013), pode-se observar que houve caracterização de todos os genótipos considerados padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência para os métodos de inoculação por imersão e punctura (Figura 19).

Ao serem comparados os resultados da incidência da doença pela escala de Bailey com a incidência transformada em $\text{Ln}(x+5)$ pela escala proposta em todos os 14 genótipos inoculados por imersão, verifica-se que esses genótipos foram caracterizados como padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência aos 179 DAP e aos 137 DAP, respectivamente.

Sob o método por punctura, verifica-se que houve maior incidência da doença em relação aos demais métodos de inoculação, aspersão e imersão. Por ser um método mais agressivo, favorece o desenvolvimento do patógeno e expressão dos sintomas mais rapidamente ao longo do tempo. A expressão dos sintomas quanto à resistência/suscetibilidade ao carvão, ocorreu para todos os genótipos, com exceção ao RB925345 que comportou-se como suscetível, aos 137 DAP, tanto pela escala de Bailey como pela escala proposta. Os resultados de caracterização dos genótipos por punctura aos 137 DAP se assemelham aos obtidos em inoculação por imersão pela escala proposta no mesmo período.

Em método de inoculação por aspersão, não houve incidência da doença para a caracterização dos genótipos padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência segundo escala de Bailey durante todo o período de avaliação (180 DAP). No entanto, quando a incidência da doença foi transformada em $\text{Ln}(x+5)$ e caracterizada segundo a escala proposta, houve a possibilidade de caracterizá-los com 137 DAP.

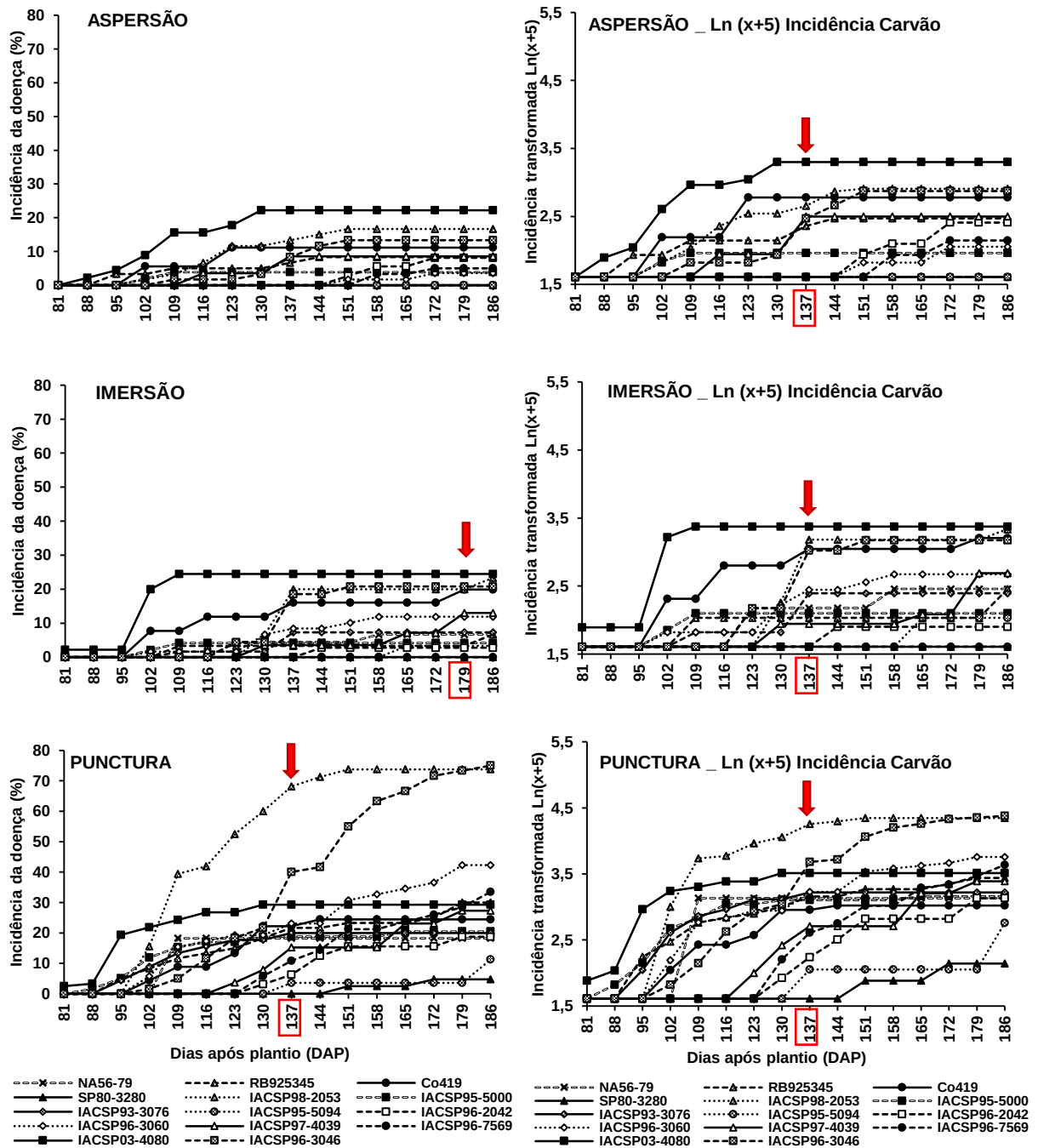


Figura 19. Curvas de progresso da doença carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) de 14 genótipos de cana-de-açúcar inoculados em suspensão de 10^6 teliósporos/mL sob métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura em experimento realizado em cana-soca em campo (2014).

Nas curvas de progresso da doença, observado no terceiro experimento em cana-planta em campo, verifica-se que houve caracterização entre os genótipos em resistente, intermediário e suscetível nos métodos de inoculação por imersão e punctura sem transformação da incidência da doença em $\text{Ln}(x+5)$ (Figura 20).

Pelo método de inoculação por aspersão, entre os padrões selecionados nesse estudo, não houve incidência da doença nos genótipos IACSP03-4080, Co419 e IACSP96-3046, que os caracterizassem como suscetíveis segundo a escala de Bailey. No entanto, quando são realizadas transformações em $\text{Ln}(x+5)$ da incidência da doença para obtenção da escala proposta, observa-se que houve caracterização de todos os genótipos padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência aos 141 DAP.

Nas curvas de progresso da doença sob método de inoculação por imersão em porcentagem da doença, segundo escala de Bailey, observa-se que houve caracterização dos genótipos com 169 DAP. Porém, quando se realiza a transformação da incidência da doença em $\text{Ln}(x+5)$, e os genótipos analisados pela escala proposta, os mesmos puderam ser caracterizados em 141 DAP.

No método de inoculação por punctura, segundo escala de Bailey, houve expressão dos sintomas mais rapidamente na maioria dos genótipos estudados, sendo caracterizados como padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência em 134 DAP.

Quando são realizadas as transformações da incidência, segundo a escala proposta, observa-se que sob o método de punctura os genótipos foram caracterizados em 127 DAP.

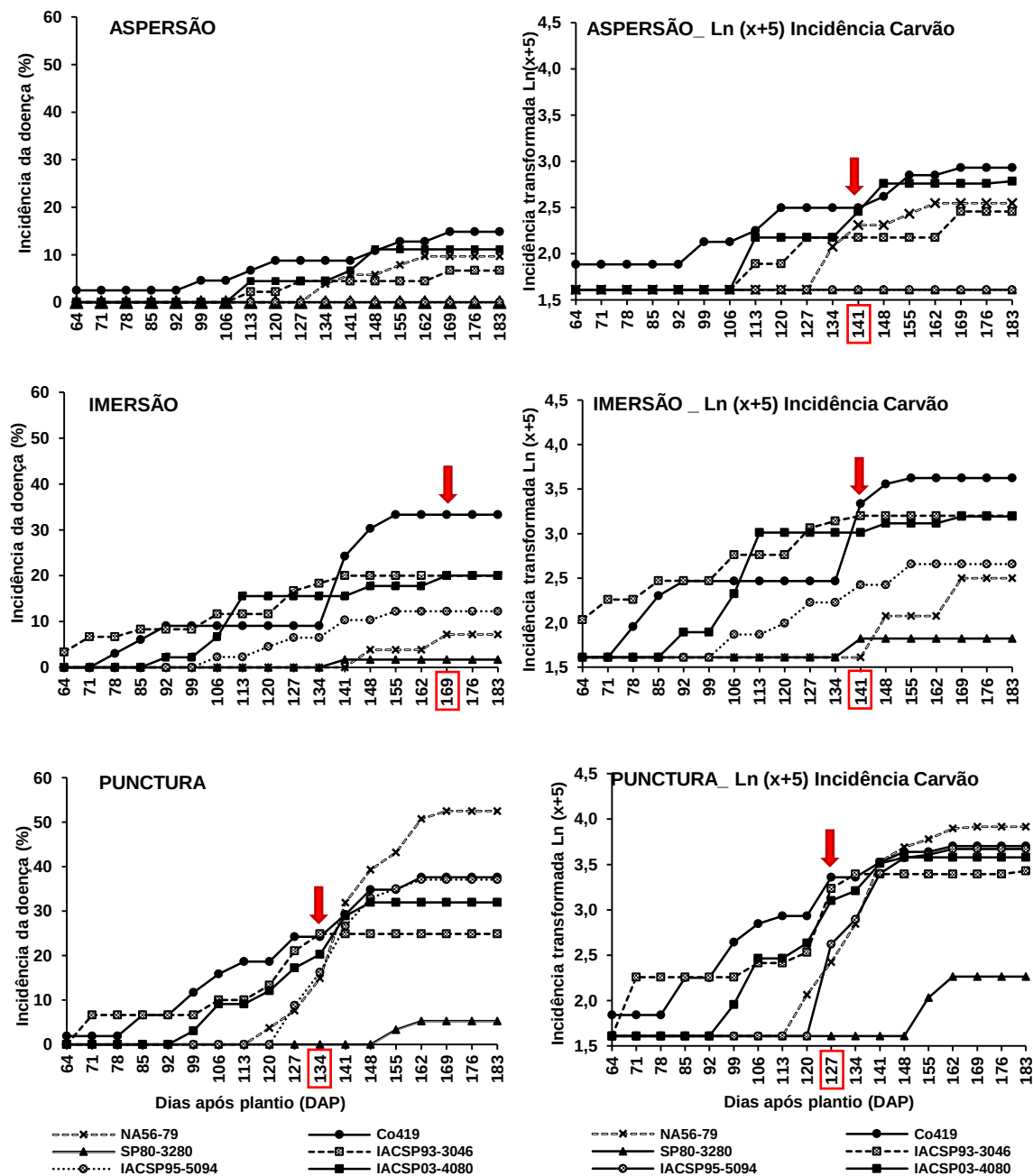


Figura 20. Curvas de progresso da doença carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) em seis genótipos de cana-de-açúcar inoculados em suspensão de 10^6 teliósporos/mL sob métodos de inoculação por aspersão, imersão e punctura em experimento realizado em cana-planta em campo (2014-2015).

5 DISCUSSÃO

A temperatura de 28°C por 72 horas de incubação, utilizada em pós-inoculação, foi a que demonstrou melhor resposta quanto à porcentagem de brotação e incidência de plantas sintomáticas. Esse resultado mostra-se convergente àqueles verificados por Bueno (2010). Segundo esse investigador, a maior incidência de plantas de cana-de-açúcar doentes foi verificada quando plantas inoculadas foram expostas a 28°C, em pós-inoculação, a 65% de umidade, por 24 horas. Porém, Lloyd e Pillay (1980), verificaram maior germinação de esporos sob condições de temperatura de 30°C em relação à 25°C.

Gemas sadias, de modo geral, quando inoculadas pelos métodos por aspersão, imersão e punctura apresentaram consideráveis perdas na brotação. Essa diferença pode estar associada à atuação do fungo, já que na diferença entre os tratamentos, a presença do patógeno inviabilizou cerca de 17% na brotação das gemas pela infecção. Resultados semelhantes foram observados por Bueno (2010), o qual verificou que em gemas sadias, quando inoculadas com *S. scitamineum*, houve redução ou até a inviabilização por completo da brotação das gemas.

No primeiro experimento, houve maior brotação de gemas que foram submetidas à inoculação por punctura. De acordo com os resultados de brotação observados nos experimentos de 2012-2013 e 2013-2014, nos mesmos genótipos estudados, não foi verificada influência dos métodos de inoculação na brotação das gemas, ou seja, a punctura não interferiu na brotação desses genótipos. Isso indica que esses materiais possuem elevada capacidade de brotação, mesmo sob condições mais agressivas de inoculação. Também, dependendo da capacidade de brotação das gemas, pode haver uma associação entre a maior capacidade de brotação, com a maior incidência da doença. Resultado semelhante foi verificado por Bueno (2010), constatando que em gemas novas, do ápice dos colmos, houve maior incidência de plantas com sintomas de carvão.

Nos três experimentos realizados, utilizando métodos de inoculação para verificar a influência desses na brotação das gemas, com exceção do primeiro experimento, verificou-se que, de modo geral, a punctura foi o método mais agressivo na inoculação das gemas, causando maiores perdas na porcentagem de brotação.

Esse método mostra-se muito drástico, afetando fisicamente as gemas, e comprometendo sua brotação. Em termos práticos, também tem a menor chance de ocorrer naturalmente no campo.

Dentre os métodos de inoculação avaliados, a menor incidência de plantas com sintomas foi verificada quando do emprego de inoculação de *S. scitamineum* via aspersão. Isso provavelmente ocorreu devido haver menor área de contato da suspensão de teliósporos, sobre as gemas, além das condições pós-inoculação não permitir a manutenção dessa suspensão sobre a gema durante o tempo necessário para o patógeno infectar internamente os tecidos da planta. Os teliósporos, para se tornarem infectivos, necessitam de temperatura e umidade que favoreçam a germinação, desenvolvimento e penetração do tubo infectivo nas 7 a 36 horas após a sua deposição sobre os tecidos do hospedeiro (ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1980; TOKESHI; RAGO, 2005). Essa resposta obtida mediante esse método de inoculação, demonstra a sua inviabilidade como alternativa para a caracterização de genótipos na fase de seleção de genitores, como quanto à validação de cultivares. Nesse método, observou-se que a expressão de sintomas da doença deu-se apenas nos materiais suscetíveis. Segundo esse método, os demais genótipos avaliados fenotipicamente se enquadrariam, erroneamente, nas categorias intermediários e resistentes.

O método de inoculação por imersão pode ser considerado o mais eficiente a ser utilizado na caracterização de genótipos promissores, visto se apresentar o mais próximo das condições naturais de campo. Além disso, mediante essa metodologia, houve a possibilidade da caracterização fenotípica dos genótipos em resistente, intermediários e suscetíveis. Todavia, Olweny et al. (2008) e Raboin (2005) verificaram menores taxas da doença em relação à punctura, e não conseguiram a distinção entre os genótipos resistentes e suscetíveis, quando do emprego desse método de inoculação. Porém, em nenhuma das situações o binômio método de inoculação-temperatura foi levado a termo.

Já o método de inoculação por punctura, apesar de ser eficiente em favorecer a ocorrência da doença, não é um método indicado para seleção de materiais promissores, visto mostrar-se um método muito drástico, subestimando a capacidade fisiológica e morfológica de defesa da planta ao patógeno. Vários trabalhos relatam

que esse tipo de inoculação pode induzir uma maior infecção da doença em relação a outros métodos de inoculação (WALLER, 1970; OLWENY et al., 2008). No presente estudo, observou-se que cerca de 71% dos genótipos avaliados comportaram-se como suscetíveis quando adotado a inoculação por punctura, não representando a realidade do que acontece em condições naturais de campo. Entretanto, esse método de inoculação, ainda que agressivo, pode ser indicado para o diagnóstico de genitores resistentes, a serem utilizados em cruzamentos genéticos nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, devido possibilitar a obtenção de genótipos resistentes geneticamente.

A temperatura a 30°C favoreceu a expressão e o progresso da doença sob método de inoculação por punctura. Isso pode ter ocorrido devido o inóculo ser introduzido no interior das gemas, necessitando de temperaturas mais elevadas no meio externo, para que a temperatura interna atinja valores que favoreçam o patógeno.

Quanto à interação altamente significativa entre métodos de inoculação e genótipos, os resultados ora obtidos, mostram-se convergentes àqueles verificados por Raboin (2005). No entanto, segundo o mesmo autor, os genótipos não puderam ser satisfatoriamente distintos quanto à resistência/suscetibilidade ao carvão pelo método de imersão. Porém, foram facilmente distintos pelo método de ferimento das gemas, resultando em elevada mortalidade das mesmas, em cerca de 70%.

Mesmo utilizando o recurso da transformação dos resultados de incidência em $\ln(x+5)$, quando não há expressão dos sintomas nos genótipos caracterizados como suscetíveis (Co419 e IACSP93-3046) e intermediário (NA56-79), o experimento torna-se inviável. Os padrões são utilizados nos experimentos para garantir que houve condições adequadas para a expressão dos sintomas em sua plenitude nos genótipos estudados, de modo que esses possam ser caracterizados de acordo com sua resistência ao carvão.

Quando se comparam os dados relativos à incidência de plantas sintomáticas observou-se que a campo esses foram mais expressivos que os observados em casa de vegetação. Sob condições de campo, as plantas exibiram sintomas mais rapidamente, e também em maior número. Aparentemente, sob condições de campo, as plantas desenvolvem-se mais adequadamente, com maior crescimento vegetativo

e perfilhamento, quando comparado às condições de casa de vegetação, onde devido ao plantio em copos de 0,250 L, restringiu grandemente o crescimento das plantas. A campo, possíveis limitações em termos de umidade podem ser compensadas pelo maior sombreamento das plantas, resultando em menor evapotranspiração. Além disso, sob condições de casa de vegetação, a temperatura oscilou entre máxima de 36°C e mínima de 15°C. De acordo com Magarey et al. (2012), os sintomas do carvão se expressam mais rapidamente e com maior frequência em ambientes secos e com temperatura em torno de 31°C. Tal fato aparentemente sustenta evidências anteriores de que essa doença tem sido mais importante em regiões cujas temperaturas sejam mais elevadas, conforme já relatado por Lloyd e Pillay (1980). Preferencialmente, pois, para avaliação de genótipos quanto ao seu comportamento a *S. scitamineum* deve-se priorizar a sua condução sob condições de campo, e em ambientes de temperaturas mais elevadas.

Comparando-se o comportamento de genótipos a *S. scitamineum*, observa-se que NA56-79, considerado intermediário sob o método de imersão, em experimento de 2014-2015, quando submetido ao método de punctura mostra-se muito suscetível. Isso pode indicar que esse genótipo, quando sob condições naturais de infecção, apresenta resistência intermediária, devido as condições morfológicas e físicas da gema, que garantem certa proteção à infecção pelo patógeno. Relatos dessa natureza foram feitos por Glória, Albernaz e Amorim (1995), que destacaram o efeito da gema, tais como espessura da epiderme e formato da gema. Também a cerosidade, presença de tricomas, funcionam como uma barreira mecânica a *S. scitamineum* (LLOYD; PILLAY, 1980). Todavia, quando ocorre a quebra dessa barreira física, esse genótipo, por não possuir em resistência genética, exibe elevada incidência de doença. Esse fato pode explicar quando houve uma epidemia no país na década de 80, quando esse genótipo registrou incidências de até 80% em áreas comerciais (BERGAMIN et al., 1987). Dessa forma, isso pode acontecer com inúmeros materiais que no campo se comportam como resistentes ou intermediários, e quando inoculados por punctura mostram-se suscetíveis, exibindo sintomas da doença. Com isso, a inoculação por punctura acaba subestimando a capacidade de defesa do genótipo ao fungo. Portanto, é de grande importância a escolha adequada do método de inoculação, e dos padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência, de acordo

com objetivo do trabalho de seleção, de modo que propiciem respostas seguras e confiáveis, uma etapa vital nas fases de seleção de materiais, nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Em vista disso, a caracterização dos genótipos, sob diferentes métodos de inoculação para padronização quanto à resistência ao carvão, atribui aos genótipos IACSP03-4080, IACSP93-3046 e Co419 a capacidade de serem padrões de suscetibilidade. Essa conclusão encontra-se alicerçada às respostas obtidas, de forma repetida, em experimentos realizados em cana-soca, no experimento 2013-2014, e em cana-planta, em 2014-2015, instalados à campo (Tabelas 2 e 4). Além disso, a cultivar Co419 é universalmente utilizada como padrão de suscetibilidade para testes de resistência ao carvão (EDGERTON, 1959; WALLER, 1970), comportamento esse também comprovado no presente trabalho. Da mesma maneira, os genótipos NA56-79 e SP80-3280 apresentaram como bons padrões, intermediário e resistente, respectivamente, quando avaliados em campo.

O genótipo IACSP03-4080 apresentou-se como um bom padrão de suscetibilidade ao *S. scitamineum*, não só por apresentar elevada incidência de doença, mas também pela elevada capacidade de brotação das gemas. Por outro lado, o genótipo SP80-3280, por apresentar resistência genética em todos os métodos de inoculação e experimentos realizados nesse trabalho, pode ser utilizado como genótipo padrão resistente para testes de resistência ao carvão em quaisquer dos métodos de inoculação estudados (Tabelas 2 e 4).

Nas condições desse trabalho, os experimentos realizados em casa de vegetação não foram adequados para a caracterização dos materiais genéticos quanto à resistência a *S. scitamineum*, devido a sobreposição ou discrepância do comportamento dos genótipos, entre resistentes e muito resistentes. Verifica-se que repetibilidade dos experimentos realizados em cana-planta e cana-soca (2012-2013), e em cana-planta (2013-2014) em casa de vegetação, não houve a expressão dos sintomas e sinais em sua plenitude. Provavelmente, as condições ambientais não favoreceram ao patógeno, à fisiologia da planta ou à interação planta-patógeno.

Quanto à caracterização dos genótipos, existem várias escalas de avaliação quanto à resistência ao carvão (HUTCHINSON, 1969; BRICEÑO; DE SOUZA VIEIRA; REA, 2005; YANG et al., 2015), variando de acordo os intervalos dos índices de

doença estabelecidos para cada categoria (muito resistente, resistente, intermediário, suscetível, muito suscetível). No entanto, os genótipos foram caracterizados segundo a escala de Bailey (observações feitas a campo) citado por Singh, Somai e Pillay (2005), devido a classificação sugerida pelo autor, se aproximar das condições observadas no presente estudo (Tabelas 2 e 3). Porém, devido as dificuldades encontradas em expressar os sintomas da doença em determinados experimentos, visando a caracterização dos genótipos, propõe-se nesse trabalho uma nova escala de avaliação quanto à incidência da doença. Tal proposta contempla em alternativa na distinção dos genótipos em resistentes, intermediários e suscetíveis. Essa escala leva em consideração a incidência máxima da doença do genótipo adotado como suscetível (ex: IACSP03-4080) e a incidência mínima da doença do genótipo adotado como resistente (SP80-3280) para caracterização dos demais genótipos. Por ser uma escala dinâmica e flexível, torna possível ajustar e e caracterizar os genótipos com base nos padrões, que irão justificar melhor a interação planta x patógeno x ambiente (Tabelas 4 e 5). Essa escala pode ser utilizada mesmo quando as condições favorecem um elevado índice da doença.

A escala proposta também propiciou uma redução no tempo de avaliação dos genótipos para a caracterização quanto à resistência ao carvão de 180 DAP para 137 DAP, em experimento realizado por imersão no ano de 2014.

Considerando que cada experimento tenha suas particularidades de condições climáticas e do desenvolvimento das plantas, podendo de um ano para o outro favorecer ou não na expressão dos sintomas. Muitas vezes, essas condições poderiam inviabilizar o experimento caso o padrão de suscetibilidade não alcance os valores fixos de incidência da escala de Bailey que o caracterize como suscetível.

Ao comparar as escalas de avaliação para caracterização dos genótipos, apresentadas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, observa-se que existe uma proximidade dos resultados. Porém, a escala de Bailey, caracteriza os genótipos em Muito resistente (MR), Resistente (R), Intermediário (I), Suscetível (S) e Muito suscetível (MS), e a proposta nesse estudo, caracteriza em apenas Resistente (R), Intermediário (I) e Suscetível (S), o que facilita a interpretação dos resultados. A escala proposta, ainda possui a vantagem que os dados de incidência dos genótipos em estudo, possam ser ajustados aos valores encontrados pelos padrões de suscetibilidade e resistência.

Para a escolha dos genótipos para obtenção dos padrões de suscetibilidade, intermediário e resistência nesse estudo, foi levado em consideração as duas escalas de avaliação discutidas.

Assim, diante dos resultados apresentados, propõe-se a nova escala de avaliação ajustada aos padrões de resistência e suscetibilidade a fim de possibilitar, facilitar e adequar melhor a caracterização dos genótipos em estudo, além de concluir em menor tempo para as avaliações dos genótipos.

6 CONCLUSÕES

- A temperatura de 28°C por 72 horas de incubação, utilizada em pós-inoculação com *Sporisorium scitamineum*, foi a que demonstrou melhor resposta quanto à porcentagem de brotação das gemas e incidência de plantas sintomáticas.
- Inoculação por imersão é o método mais indicado para caracterização de genótipos visando resistência ao carvão.
- O método de inoculação por punctura é o que apresenta maior índice de doença, sendo indicado para obtenção de genitores resistentes para serem utilizados nos cruzamentos genéticos.
- O método de aspersão não é indicado como viável para caracterização de genótipos de cana-de-açúcar promissores.
- Experimentos de cana-de-açúcar conduzidos a campo revelam resultados mais rápidos e seguros.
- Os genótipos recomendados como padrões de suscetibilidade ao *S. scitamineum*, tanto para o método de inoculação por imersão como por punctura são: Co419, IACSP03-4080, IACSP93-3046; intermediário: NA56-79 e de resistência: SP80-3280.
- O genótipo IACSP03-4080 é o melhor padrão de suscetibilidade, não só por apresentar maiores incidências de chicotes de carvão, independentemente dos métodos de inoculação e temperatura pós-inoculação avaliados, mas também pela elevada capacidade de brotação das gemas.
- Para cruzamentos genéticos, o único genótipo recomendado como padrão de resistência é SP80-3280.
- A nova escala de avaliação proposta neste trabalho permitiu melhores condições para caracterização dos genótipos quanto à resistência ao carvão, além de propiciar a obtenção de respostas em menor tempo de avaliação.

7 REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2016: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativo, 2016. 456 p.
- AKALACH, M. First report of sugarcane smut in Morocco. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 5, p. 529, 1994.
- ALEXANDER, K. C.; RAMAKRISHNAN, K. Infection of the bud, establishment in the host and production of wips in sugarcane (*Ustilago scitaminea*). **Proceedings International Society Sugarcane Technologists**, Quatre-Bornes, v. 17, p. 1453-1455, 1980.
- ANTONIE, 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.
- ANTONY, G. **Sugarcane smut**: the political economy of biosecurity. In: AUSTRALIAN AGRICULTURAL AND RESOURCE ECONOMICS SOCIETY, 52., 2008, Camberra. **Proceedings...** Canberra: Australian Agricultural and Resource Economics Society, 2008.
- BEDENDO, I. P. Carvões. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres; 1999. v. 1, cap. 49, p. 881-888.
- BERGAMIM 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**, Piracicaba, p. 23, 1987. Edição especial.
- BLACKBURN, F. **Sugar-cane**. London and New York: Longman, 1984. 414 p.
- BRAITHWAITE, K. S.; BAKKEREN, G.; CROFT, B. J.; BRUMBLEY, S. M. Genetic variation in a worldwide collection of the sugarcane smut fungus *Ustilago scitaminea*. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 26, p. 2-9, 2004.
- BRICEÑO, R.; DE SOUZA VIEIRA, O.; REA, R. Reaction of twenty sugarcane clones to smut disease *Ustilago scitaminea* Sydow. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v.22, p.399-406, 2005.
- BUENO, C. R. N. C. **Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- 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. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

COMSTOCK, J. C. Smut. In: ROTT, P.; BAILEY, R.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B.; SAUMTALLY, S. (Ed). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD/ISSCT, 2000. cap. 87, p. 181-184.

COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. Sugarcane smut disease. SS-AGR-208, **Series of the Agronomy Department**, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2005.

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.

EDGERTON, C. W. **Sugarcane and its diseases**. 2nd. Baton Rouge: Louisiana State University Press, 1959. 301p.

GLÓRIA, B. A.; ALBERNAS, M. C. C.; AMORIM, L. Structural characteristics of buds of sugarcane cultivars with different levels for resistance to smut. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 102, n. 5, p. 502-508, 1995.

HIRSCHHORN, E. Um nuevo metodo de infección artificial com el carbon de la caña del azúcar. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, v. 4, p. 335-344, 1949.

HUTCHINSON, P.B. A note on disease resistance for sugarcane varieties. **Proceedings on the international Society on Sugarcane Technologists**. v. 13, p.1087-1089, 1969.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 07 abr. 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201603_1.shtm>. Acesso em: 19 abr. 2016.

LANDELL, M. G. de A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. dos; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N. da; MENDONÇA, J. R. de; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F. de; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agrônômico de Campinas, 2013. 17 p. (IAC. Documentos, 109).

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

LLOYD, H. L.; PILLAY, M. The development of na improved method for evaluating sugarcane for resistance to smut. **Proceeding of the South African Sugar**

- Technologists Association**, Mount Edgecombe, v. 54, p. 168-172. 1980.
- MAGAREY, R. C.; BULL, J. I.; LONIE, K. J.; PIPERIDIS, G. The effect of smut resistance on disease incidence and severity under natural spread. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 34, p. 1-8. 2012.
- MATA, J. F. **Preservação e determinação de viabilidade de clamidósporos de *Ustilago scitaminea***. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.
- MATSUOKA, S.; SORDI, R. A.; MASUDA, Y.; ARIZONO, H. Reability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid indentification of smut suscetible sugarcane clones. **Proceedings International Society Sugar Cane Tecnologists**, Quatre-Bournes, v. 19, p. 375-385, 1986.
- MOZAMBINI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.;
- NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP.2, 2006. V. 1, p. 12-18.
- OLWENY, C. O.; NGUGI, K.; NZIOKI, H.; GITHIRI, S. M. Evaluation of smut inoculation techniques in sugarcane seedlings. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 10, n. 4, p. 341-345, 2008.
- ORDOSGOITTI, A.; GONZÁLEZ, V.; APONTE, A. El carbon de la caña de azucar en Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 31, n. 1-6, p. 301-307, 1982.
- PEROS, J. P.; BAUDIN, P. Etude de la variabilite 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, n. 1, p. 71–80, 2002.
- PINTO, L. R.; OLIVEIRA, K. M.; MARCON I. T.; GARCIA, A. A. F.; ULIAN, E. C.; SOUZA, A. P. de. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breeding**, Oxfordshire, v. 125, p. 378-384, 2006.
- RABOIN, L. M. **Génétique de la résistance au charbon de la canne à sucre causé par *Ustilago scitaminea* syd.**: caractérisation de la diversité génétique du pathogène, cartographie de QTL dans un croisement bi-parental et étude d’associations dans une population de cultivars modernes. 2005. 182f. These (Docteur) – Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2005.
- 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**, Maryland Heights, v. 44, n. 1, p. 64-76, 2007.

RAGO, A. M.; CASAGRANDE, M. V.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 93-97, 2009.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 285 p. (IAC. Boletim técnico, 100).

SINGH, N.; SOMAI, B. M.; PILLAY, D. In vitro screening of sugarcane to evaluate smut susceptibility. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, p. 259-266, 2005.

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.

STOLL, M.; PIEPENBRING, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, p. 976-984. 2003.

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

TOFFANO, W. B. O carvão na região de Assis. **Contribuição da refinadora Paulista S.A. para a campanha de combate ao carvão da cana-de-açúcar**. Piracicaba, 25p. 1953.

TOKESHI, H.; RAGO, A. M. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM 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.

WALLER, J. M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya II. Infection and resistance. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 54, n. 3, p. 405-414, 1970.

WHITENEAAD, C. **Variety studies**: reports experimental Station African Sugar Association. 1967. p. 24-30.

YANG, C.F.; GAO, Y.J.; YANG, C.F.; HUANG, Y.X.; ZHANG, B.Q.; ZHOU, S.; YANG, L.T.; ZHANG, G.M.; LI, Y.R. Evaluation of two forms of *Sporisorium scitaminea* sydow

inoculum in sugarcane. **International Journal of Development Research.** v. 5, p.4412-4417, 2015.