

## COMUNICAÇÃO

### LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM PLANTIOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO NOROESTE DO PARANÁ

#### Survey of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* incidence in sugarcane plantations of the northwest region of Paraná State

Fernanda Santos Marcuz<sup>1</sup>, Eliezer Rodrigues de Souto<sup>2</sup>, Rafael Augusto Vieira<sup>3</sup>,  
Marco Aurélio Marrafon<sup>4</sup>, Antônio Augusto Lazarini Barboza<sup>5</sup>, Edelclaiton Daros<sup>6</sup>

#### RESUMO

O raquitismo-da-soqueira, causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é considerado uma das mais importantes doenças bacterianas da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Para verificar a possível ocorrência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na região noroeste do Paraná, foi realizado um levantamento em 32 áreas de plantio de duas usinas, utilizando-se o método sorológico "Dot blot" e um protocolo baseado na reação em cadeia da polimerase. As amostras foram coletadas em áreas cultivadas com 8 variedades e 2 clones, a partir de plantas em diferentes épocas de corte, perfazendo um total de 1395 amostras. Constatou-se a presença da bactéria no fluído fibrovascular de plantas da variedade SP77-5181 coletado em uma das propriedades, com índice de incidência de 23%. Esses resultados indicam a incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no noroeste do Paraná.

**Termos para indexação:** Raquitismo-da-soqueira, sorologia, PCR.

#### ABSTRACT

Ratoon stunting disease caused by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* is one of the most important bacterial diseases of sugarcane (*Saccharum spp.*). A ratoon stunting disease survey was carried in 32 sugarcane producing areas from two mills in the northwest region of Paraná State through a dot blot serological protocol and a polymerase chain reaction-based assay. A total of 1395 samples were collected in areas planted with 8 varieties and 2 sugarcane clones collected from plants at different harvest periods. The bacterium was detected in the fibrovascular fluid of the SP77-5181 variety from a producing area in a 23% rate of incidence. These data indicated that *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* is present in the northwest region of Paraná.

**Index terms:** Ratoon-stunt disease, serology, PCR.

(Recebido em 9 de janeiro de 2008 e aprovado em 23 de setembro de 2008)

De acordo com levantamentos da Companhia Nacional de Abastecimento, o Paraná é o segundo maior produtor de álcool e o terceiro maior produtor de açúcar no Brasil, apresentando expansão de 25% da área plantada com cana-de-açúcar, na safra atual (CONAB, 2007).

As doenças representam um dos fatores responsáveis pelo decréscimo da produtividade da cana-de-açúcar em todo o mundo, e o raquitismo-da-soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS et al., 1980, 1984; EVTUSHENKO et al., 2000) é

uma das mais importantes, podendo ocasionar perdas significativas, estimadas em até 21% (CHAGAS & MATSUOKA, 1988).

*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* encontra-se classificada no grupo corineforme, Gram positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa. Produz *in vitro* colônias minúsculas e translúcidas, após 14 dias de cultivo em meio SC – Soybean Corn (CARDOSO, 1986; GILLASPIE et al., 1981).

Em anos de seca, podem ser observados sintomas externos do raquitismo-da-soqueira como crescimento

<sup>1</sup>Bióloga, Mestre em Produção Vegetal, Departamento de Agronomia/DAG – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, PR – fernandamarcuz@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Biólogo, Doutor em Fitopatologia, Departamento de Agronomia/DAG – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, PR – ersouto@uem.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Departamento de Agronomia/DAG – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, PR – rfavieira@msn.com

<sup>4</sup>Graduando em Agronomia, Departamento de Agronomia/DAG – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, PR – marcomarrafon@hotmail.com

<sup>5</sup>Biólogo, Mestre em Produção Vegetal, Departamento de Agronomia/DAG – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, PR – gutolazarini@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – Universidade Federal do Paraná/UFPR – Rua dos Funcionários, 1534 – Juvevê – Cx. P. 2959 – 80001-970 – eddaros@ufpr.br

irregular, plantas raquíticas, pouco perfilhamento e colmos finos. Porém, essa sintomatologia é facilmente confundida com fatores abióticos tais como baixa fertilidade do solo e até mesmo falta de água. Não havendo déficit hídrico, esses sintomas podem não surgir (TOKESHI, 1997). Sintomas internos observáveis apenas em variedades suscetíveis, são caracterizados pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas nos feixes do xilema na região nodal. Porém, nenhum sintoma interno ou externo tem poder diagnóstico, por não ser exclusivo do raquitismo-da-soqueira (COMSTOCK et al., 1997).

A dificuldade da avaliação dos sintomas no campo é um dos motivos da disseminação da bactéria em áreas cultivadas com cana-de-açúcar em todo mundo (CARDOSO, 1986). Dessa forma, a diagnose da doença só pode ser realizada pela detecção direta do patógeno (SANGUINO, 1998; SANGUINO et al., 1984).

As técnicas de detecção da bactéria mais utilizadas são a microscopia de contraste de fase (STEINDL, 1976), sorologias (GILLASPIE, 1978) e a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (PAN et al., 1998).

Considerando a importância econômica da cultura para o Paraná e a expansão da cana-de-açúcar para novas áreas, objetivou-se, neste trabalho levantar a incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nos plantios comerciais de 2 usinas do noroeste do Paraná, através do teste sorológico “Dot blot” e por PCR.

Assim foram selecionados canaviais com, no mínimo, 9 meses de idade e retirados 20 a 40 colmos por amostra, independente do tamanho do talão, intercalando-se 5 linhas de plantio entre uma coleta e outra, percorrendo-se uma distância de 100 metros na linha escolhida, e a cada 10 metros, coletou-se na base, rente ao solo, o colmo mais velho de cada touceira. Após as coletas, os colmos foram limpos e cortados na altura do quarto internódio basal, identificados, e levados ao laboratório.

Para as amostragens foram escolhidas 8 variedades mais cultivadas na região e 2 clones promissores (RB724545, RB835089, RB855536, RB835486, RB835054, RB845257, RB855156, SP77-5181, CL RB946903, e CL RB956911) em 32 áreas de plantio, totalizando 1395 colmos. As amostragens foram realizadas no período de maio-junho e outubro-novembro de 2006, coletando-se desde cana planta até plantas de sexto corte. Para a extração da seiva foram utilizados segmentos do segundo ou terceiro internódios basais, retirando-se um cilindro de 1x2 cm da região central de cada colmo, com o auxílio de um furador de rolhas. Posteriormente, os cilindros foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugados por 5 min, a 12.000 rpm em uma microcentrífuga

Hsiangtai®. O extrato resultante foi armazenado a -20°C. Nos ensaios sorológicos foi utilizada a técnica “Dot Blot EIA” (“Dot Blot Enzyme Immunoassay”), Harisson & Davis (1986), modificada conforme Carneiro et al. (2004), utilizando-se antissoro policlonal específico contra *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* produzido e testado por Carneiro et al. (2004). Como padrões positivos foram utilizadas suspensões da bactéria pura, seiva extraída de plantas das variedades CB492606 e SP70-1078 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, previamente testadas, seiva de cana doente diluída 10 vezes em água destilada, e como padrão negativo, somente água destilada.

O DNA de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi obtido a partir do fluido fibrovascular de cana-de-açúcar, segundo o método proposto por Taylor et al. (2003), e nas ampliações por PCR foram utilizados os pares de oligonucleotídeos Lxx 23SF, Lxx 23SR (GAGLIARDI, 2003) e C2F, C2R (TAYLOR et al., 2003). Para cada variedade ou clone foram testados 5 colmos escolhidos aleatoriamente. Cinco microlitros de cada produto de amplificação foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 3,0%, em tampão TBE 1X (Tris-base 50mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM – pH 8,5) a 85V. Os géis foram corados com brometo de etídio (5 µg/ml) e os que apresentaram bandas foram fotografados.

A bactéria foi detectada em 14 colmos da variedade SP77-5181, correspondente a 1% do total de amostras analisadas (Figura 1). Na área cultivada com a variedade SP77-5181, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* teve 23% de incidência, e conforme estimativas de Sanguino (1998), para cada 1% de incidência bacteriana há uma perda média de 0,4% na produtividade da cana-de-açúcar. Desse modo, foi estimada uma perda de 6,9 t/ha para a área cultivada com a SP77-5181, considerando-se a média de produtividade de 75 t/ha. Comportamento semelhante foi observado por fitopatologistas da UFRPE/EECAC no nordeste, onde a SP77-5181 apresentou incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* de 51% (CHAVES et al., 2002). A variedade SP77-5181 é definida como responsiva, ou seja, apresenta uma boa resposta a condições favoráveis de cultivo, porém não se adapta a ambientes mais restritivos (LANDEL et al., 2006).

Nas variedades e clones RB não se constatou a presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Todavia, em um levantamento realizado em Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo (PONTE, 2006), a bactéria foi detectada em todas as variedades amostradas, com índice de incidência variando de 4,8 a 28%, inclusive nas variedades RB855536, RB72454, RB835054 e RB835089, que também foram analisadas neste trabalho.

O regime hídrico na região noroeste do Paraná, durante o ano de 2006, foi bastante propício ao desenvolvimento da cana-de-açúcar, com chuvas bem distribuídas ao longo do período. Sabe-se que variedades infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* podem não apresentar sintomas externos devido à boa disponibilidade de água para a planta, nesses casos, a densidade populacional da bactéria seria menor que nas cultivares muito suscetíveis, dificultando assim a diagnose (DAVIS et al., 1994; TOKESHI, 1997). A técnica sorológica “Dot blot” apresenta sensibilidade de  $2 \times 10^6$  células bacterianas/ml (HARRISON & DAVIS, 1986), sendo menor quando comparada com a imunofluorescência e ao PCR, que detectam em torno de  $10^3$  a  $10^4$  células/ml (TAYLOR et al., 2003).

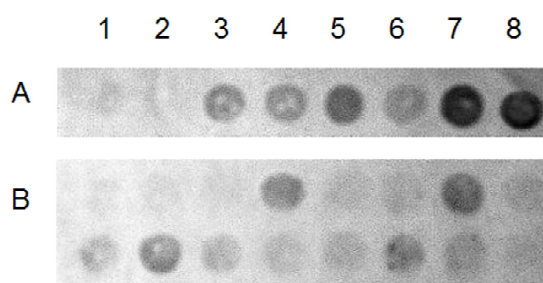


Figura 1 – Resultado de um experimento “Dot blot” com amostras de cana-de-açúcar da variedade SP77-5181, cultivada no noroeste do Paraná. Os pontos de tonalidade mais forte em (B2, B4, B6 e B7) indicam reação positiva para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em 4 colmos da SP77-5181. Os pontos de A3 até A7, representam controles positivos previamente selecionados da variedade CB492606 infectada com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. A8, bactéria pura.

Apesar disso, o “Dot blot” é suficientemente sensível para orientar a necessidade do uso do tratamento térmico em material propagativo (CARNEIRO et al., 2004).

Nas reações de PCR realizadas com dois pares de oligonucleotídeos específicos para diferentes regiões do genoma bacteriano, novamente *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi detectada apenas em amostras da SP77-5181 (Figura 2). Foi observado ainda que, mesmo nos testes com amostras de CB492606 e SP70-1078 utilizadas como controles positivos, a reprodutibilidade das amplificações por PCR não era constante, provavelmente devido à ação de inibidores da reação presentes nos extratos brutos da cana-de-açúcar, os quais anteriormente já foram apontados como um problema a ser superado para que esse método possa ser utilizado na diagnose de rotina do RSD (PAN et al., 1998).

A constatação da ocorrência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no noroeste do Paraná demonstra a importância do monitoramento periódico das áreas de cultivo, o manejo varietal adequado, e a substituição de variedades muito suscetíveis como a SP77-5181, além da adoção de medidas preventivas como o tratamento térmico, e a desinfecção dos instrumentos de corte, para se evitar a disseminação da bactéria para áreas aparentemente livres do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar.

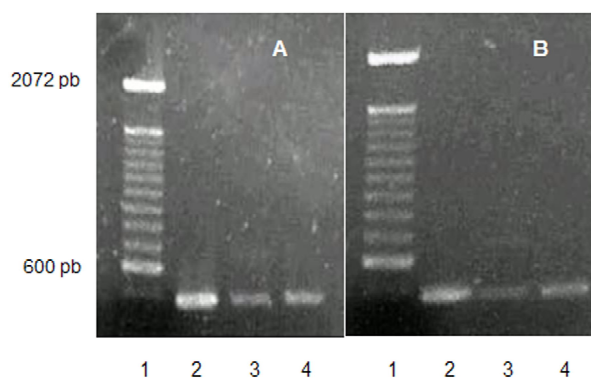


Figura 2 – Resultados dos ensaios de PCR com oligonucleotídeos específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **A** - Amplificações com os oligonucleotídeos C2F e C2R (TAYLOR et al., 2003). **B** - Amplificações com os oligonucleotídeos 23SF e 23SR (GAGLIARDI, 2003). **2** - Produtos de amplificação de suspensão de bactéria pura. **3 e 4** produtos de amplificação a partir de extrações da variedade SP77-5181. **1** - DNA Ladder 100 bp.

#### AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Josil. B. Carneiro (UFRRJ), Álvaro Sangüíneo (CTC), Paulo R. Gagliardi (UFSCar) e Ricardo A. Oliveira (UFPR), e aos agrônomos Walter Sticanela (Usaciga) e William A. Bissoli (Cooperval), pelas contribuições dadas para a realização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, C. O. N. Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, v. 34, p. 48-52, 1986.
- CARNEIRO, J. B.; SILVEIRA, S. F.; SOUZA FILHO, G. A.; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTTI, E. A. Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 614-619, 2004.

- CHAGAS, P. R. R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, v. 106, n. 1, p. 40-44, 1988.
- CHAVES, A.; CAVALCANTE, J. F. D.; FERREIRA, G. E.; PEDROSA, E. M. R.; ARAÚJO, C. F. S. Comportamento de variedades comerciais de cana-de-açúcar em relação ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli subsp. xyli*) na região Nordeste do Brasil: avaliações em cana planta. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., 2002, Recife, PE. **Anais...** Recife: STAB, 2002. v. 1, p. 27.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2007/2008, segundo levantamento, agosto/2007.** Brasília, DF, 2007.
- COMSTOCK, J. C.; PERDOMO, R.; POWELL, G.; WANG, Z. Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. **Journal American of Sugarcane Technologists**, v. 17, p. 95-101, 1997.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, v. 210, p. 1365-1367, 1980.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*, a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria *Clavibacter xyli subsp. xyli* sp. nov.; subsp. nov. and *Clavibacter xyli subsp. cynodontis* subsp. nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.
- EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. *Leifsonia poae*. gen. nov.; sp. nov.; isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov.; nom. rev. comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.*; 1984) gen. nov. comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 371-380, 2000.
- GAGLIARDI, P. R. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli subsp. xyli*.** 2003. 61 f.
- Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.
- GILLASPIE, A. G. Ratoon stunting disease for sugarcane serology. **Phytopathology**, v. 68, p. 529-532, 1978.
- GILLASPIE, A. G.; DAVIS, M. T.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease bacterium. **International Sugar Journal**, v. 83, p. 324-326, 1981.
- HARRISON, J.; DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli subsp. xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v. 70, n. 6, p. 556-558, 1986.
- LANDEL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, C. M.; PINTO, L. R.; RESTE, S. Manejo varietal em cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. de S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Orgs.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar.** [S.l.: s.n.], 2006. p. 57-65.
- PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli subsp. xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v. 82, n. 3, p. 285-290, 1998.
- PONTE, E. L. de. **Incidência de *Leifsonia xyli subsp. xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, Sul da Bahia e Oeste mineiro e determinação do tamanho da amostra para detecção sorológica.** 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.
- SANGUINO, A. Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli subsp. xyli*. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, p. 26, 1998. Resumo.
- SANGUINO, A.; MORAES, V. A.; SANTOS FILHO, O. T. D. Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. **Tecnologia Agrônômica**, v. 2, p. 250-253, 1984.
- STEINDL, D. R. L. The use of phase contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease. **Proceedings of the Conference of Queensland Society of Sugarcane Technologists**, p. 71-72, 1976.

TAYLOR, P. W. J.; PETRASOVITS, L. A.; VELDE, R. van der; BIRCH, R. G.; CROFT, B. J.; FEGAN, M.; SMITH, G. R.; BRUMBLEY, S. M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 3, p. 367-375, 2003.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, A. L.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.).

**Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 207-225.