



### ***Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*: bactéria quarentenária com risco para as culturas forrageiras no Brasil**

Marcus Vinícius S. Coelho<sup>1</sup>  
Abi S. A. Marques<sup>2</sup>  
Olinda Maria Martins<sup>3</sup>

## Introdução

A murcha bacteriana da alfafa (*Medicago sativa* L.) é uma doença que ocorre na maioria das áreas produtoras do mundo. Devido às perdas de produção observadas é considerada a principal doença dessa forrageira nos Estados Unidos e também é importante na Austrália, ex-URSS e Polônia (CLOSE e MULCOCK, 1972). Causada pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, ataca alfafa e outras leguminosas, sendo de distribuição geográfica relativamente ampla (Fig. 1).

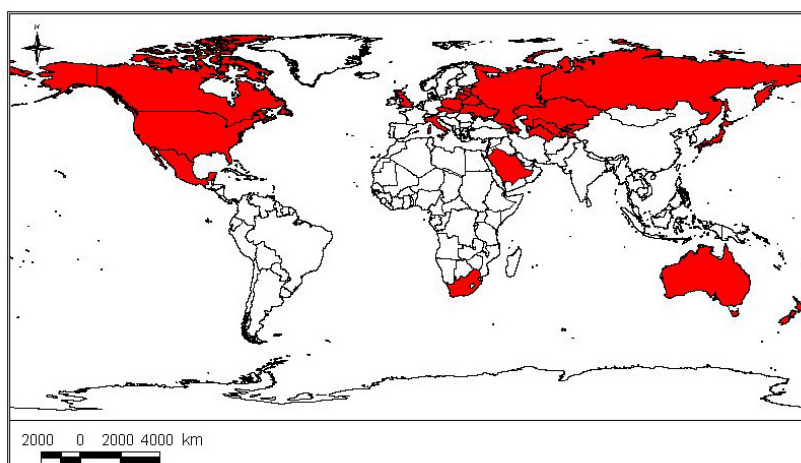


Fig. 1 – Distribuição geográfica de *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*  
(Fonte: COMMONWEALTH..., 1973; BRADBURY, 1986).

<sup>1</sup> Eng. Agr., MSc., Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

<sup>2</sup> Eng. Agr., PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: amarques@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> Eng. Agr., PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: olinda@cenargen.embrapa.br

### Posição taxonômica de *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*

A bactéria causadora da murcha bacteriana da alfafa, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (McCulloch) Davis et al. (1984), ocupa a seguinte posição taxonômica:

Divisão: Firmicutes  
Classe: Actinobacteria  
Família: Microbacteriaceae

### Sinonímia

Identificada nos Estados Unidos em 1925 (MCCULLOCH, 1925; JONES e MCCULLOCH, 1926), a bactéria responsável pela murcha bacteriana da alfafa foi denominada originalmente de *Aplanobacter insidiosus* McCulloch 1925 (MCCULLOCH, 1925), tendo recebido as seguintes denominações:

*Aplanobacter insidiosus* McCulloch 1925;  
*Bacterium insidiosum* (McCulloch) Stapp 1928;  
*Phytomonas insidiosa* (McCulloch) Bergey et al. 1930;  
*Erwinia insidiosa* (McCulloch) Jensen 1934;  
*Corynebacterium insidiosum* (McCulloch) Jensen 1934;  
*Mycobacterium insidiosum* (McCulloch) Krasil'nikov 1941;  
*Burkholderiella insidiosa* (McCulloch) Sauvulescu 1947;  
*Corynebacterium michiganense* pv. *insidiosum* (McCulloch) Dye & Kemp 1977;  
*Corynebacterium michiganense* subsp. *insidiosum* (McCulloch, 1925) Carlson & Vidaver 1982;

Finalmente, baseando-se em taxonomia numérica, estudos

fisiológicos e análise dos componentes celulares, a bactéria foi reclassificada dentro do novo gênero *Clavibacter*, denominando-se *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (McCulloch) (DAVIS et al., 1984; YOUNG et al., 1996).

### Nomes da doença

A murcha bacteriana da alfafa é conhecida em inglês como “bacterial wilt of lucerne”, em espanhol como “marchitez bacteriana de la alfalfa”, em francês como “fletrissement bactérien de la luzerne” e em alemão, “bakterielle luzernwelke”.

### Distribuição geográfica

A distribuição geográfica da murcha bacteriana da alfafa é bastante ampla (Fig. 1). Existem registros de ocorrência da doença nos seguintes países: África do Sul, na **África**; Canadá, Estados Unidos e México, na **América do Norte**; Arábia Saudita e Japão, na **Ásia**; Itália, Inglaterra, Irlanda, Grécia, ex-URSS, Polônia, Romênia, República Tcheca e Eslováquia, Croácia, Bósnia e Iugoslávia na **Europa**; Austrália e Nova Zelândia na **Oceania**. (BRADBURY, 1986; CLAVIBACTER..., 2004).

A bacteriose não ocorre na **América do Sul**, embora tenha havido um relato no Estado do Ceará, em 1972, sem, entretanto, existir qualquer depósito da cultura do patógeno em coleção de microrganismos nacional ou internacional (ROBBS, 1985). Trata-se, possivelmente, de uma descrição equivocada da bactéria no Brasil.

*C. michiganensis* subsp. *insidiosus* é regulamentada como Praga quarentenária A1 para o Brasil e para a região do COSAVE (BRASIL, 1999).

### Sintomas

Plantas de alfafa infectadas apresentam-se raquíticas e cloróticas. Nas raízes os sintomas típicos observados são descoloração e formação de anéis amarelos ou marrons nos tecidos vasculares cortados. Folhas mais novas podem tornar-se ligeiramente curvadas ou totalmente retorcidas. O desenvolvimento da doença é afetado pelo estado nutricional da planta, sendo que os sintomas mais severos são observados quando os níveis de nitrogênio (N) e fósforo (P) são altos e potássio (K) baixo. Em infecções muito severas, a planta pode morrer (ERWIN, 1990).

### Morfologia e Metabolismo Celular

*C. michiganensis* subsp. *insidiosus* é uma bactéria tipo bastonete (pleomórfico), não móvel, Gram positiva e aeróbica estrita. Requer fatores de crescimento e não utiliza acetato, lactato, propionato e succinato como fontes de carbono. É catalase positiva e Levan, oxidase, lipase e urease negativa. A temperatura ótima para crescimento da bactéria em meio artificial é de 23 °C, mínima de 1 °C e máxima de 31-32 °C (ERWIN, 1990). A bactéria produz ácido a partir de celobiose, galactose, maltose, manose, trealose e xilose. Em meio de cultura, as colônias apresentam crescimento lento e são, em geral, amarelo-pálidas, redondas ou fluidas, lisas, brilhantes, aplanadas ou ligeiramente elevadas. Colônias mais

velhas podem apresentar produção de pigmento azul (indigoidine). Os caracteres fluidez, coloração e produção de pigmento, entretanto, são bastante instáveis entre os isolados (BRADBURY, 1986; CLAVIBACTER..., 2004).

### Bioecologia

*C. michiganensis* subsp. *insidiosus* penetra nas raízes através de ferimentos provocados por insetos, nematóides ou implementos agrícolas. Após a penetração, a bactéria coloniza o xilema da hospedeira interrompendo o transporte de água na planta. Também são produzidos glicopeptídios tóxicos à planta (RIES e STROBEL, 1972). A bactéria pode ser encontrada, ainda, nos espaços intercelulares do parênquima da semente (CLAVIBACTER..., 2004). No campo, os sintomas da infecção normalmente demoram a se manifestar, sendo observados frequentemente após o segundo ou terceiro ano de cultivo. A doença é favorecida por condições de clima úmido e é mais comum em áreas de plantio mal drenadas. Observa-se que a ocorrência do nematóide *Meloidogyne hapla* Chitwood pode resultar em aumento da incidência e severidade da doença (HUNT et al., 1971). A bactéria é capaz de sobreviver em restos de cultura e também associada a feno e sementes de alfafa (CORMACK, 1961).

### Epidemiologia

A dispersão do patógeno entre plantas se dá por meio de respingos de água de chuva ou irrigação e de implementos agrícolas

contaminados. A disseminação a longas distâncias pode se dar pelo plantio de sementes infectadas ou através de feno infectado pela bactéria (CORMACK e MOFFATT, 1956; CORMACK, 1961). O nematóide *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev pode ser vetor da bactéria, além de aumentar a suscetibilidade da hospedeira

(HAWN, 1971). A bactéria pode sobreviver em tecidos secos ou sementes por pelo menos 10 anos em condições de laboratório, podendo sobreviver também no solo (ERWIN, 1990).

O ciclo de hospedeiras naturais de *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* é bastante reduzido (Tabela 1).

Tabela 1: Hospedeiras de *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*

<b>Infecção natural</b>	<b>Referência</b>
Alfafa ( <i>Medicago sativa</i> )	Close e Mulcock (1972)
Comichão ( <i>Lotus corniculatus</i> )	Hayward e Waterson (1973)
<i>Medicago falcate</i>	Hayward e Waterson (1973)
Meliolato ( <i>Melilotus alba</i> ),	Close e Mulcock (1972)
<i>Onobrychis viciaefolia</i>	Hayward e Waterson (1973)
Trevo ( <i>Trifolium</i> sp).	Hayward e Waterson (1973)
<b>Inoculação artificial</b>	
<i>Medicago dzawkhetica</i>	Bradbury (1986)
<i>M. glutinosa</i>	Bradbury (1986)
<i>M. hemicycla</i>	Bradbury (1986)
<i>M. marina</i>	Bradbury (1986)
<i>M. prostate</i>	Bradbury (1986)
<i>M. sativa</i> var. <i>gaetula</i>	Bradbury (1986)
<i>M. sativa</i> var. <i>parviflora</i>	Bradbury (1986)
<i>M. sativa pilifera</i>	Bradbury (1986)
<i>M. zogdiana</i>	Bradbury (1986)
<i>M. suffruticosa</i>	Bradbury (1986)
<i>M. tianschanica</i>	Bradbury (1986)
<i>M. transoxana</i>	Bradbury (1986)

#### **a) Procedimentos de inspeção e detecção**

O isolamento de *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* pode ser feito pelo plaqueamento de alíquotas do macerado das sementes ou de pedaços da haste em meio de

cultura semi-seletivo (SCHAAD et al., 2001). A diagnose e a identificação são feitas normalmente pela avaliação de caracteres bioquímicos e fisiológicos da bactéria

isolada a partir de material fresco infectado.

Recentemente, Samac et al. (1998) desenvolveram um método para detecção e identificação de *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* por meio da amplificação de sequências repetidas do genoma da bactéria (rep-PCR). O método mostrou-se eficiente e específico para a bactéria. Louws et al. (1998), utilizando essa técnica, conseguiram identificar e separar as sub-espécies de *Clavibacter michiganensis*, inclusive *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, confirmando a separação das cinco sub-espécies atualmente estabelecidas.

Existem poucos trabalhos de identificação molecular, relacionados especificamente a esta sub-espécie de *Clavibacter*, sendo que “primers” específicos estão sendo desenvolvidos (BRYXIOVA et al., 2002). Borowicz (2001) sintetizou um par de primers, utilizando dados da sequência de DNA da região de espaços intergênicos, amplificando um fragmento de 218 pb.

O antissoro preparado por Kokoskova et al. (2000) mostrou-se específico após absorção cruzada para purificação, podendo ser usado para o teste ELISA (PTA e DAS).

## **b) Controle**

A estratégia de controle recomendada consiste no plantio de material resistente, havendo relato de muitas cultivares que apresentam essa característica (ERWIN, 1990). Devido à heterogeneidade genética da alfafa, uma variedade resistente pode apresentar cerca de 50 a 70%

de resistência à doença (SAMAC et al., 1998)

## **Medidas quarentenárias**

A forma mais eficiente de exclusão do patógeno é, certamente, o uso de sementes saudáveis, uma vez que pode ser transmitido a longa distância via sementes infectadas.

Considerando que em áreas secas, com baixo índice pluviométrico e sem irrigação, a doença não se manifesta (ERWIN, 1990), análises de risco prévias às importações de sementes devem contemplar fortemente esse aspecto como determinante da origem das mesmas. Devido ao perigo potencial de introdução da bactéria no Brasil, o desenvolvimento de planos de contingência seria fundamental para reduzir o risco da sua entrada no país.

## **Agradecimentos**

A Sérgio Eustáquio de Noronha pela confecção do mapa.

## **Referências Bibliográficas**

BOROWICZ, B. P. Use of the DNA sequence of the intergenic spacer region between the 16S and 23S rRNA genes for the identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* at the molecular level. **Bulletin OEPP**, v. 31, n. 4, p. 489-491, 2001.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Wallingford, UK: CAB International, 1986. 332 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 38, de 14 de outubro

de 1999. Lista de pragas quarentenárias A1, A2 e não quarentenárias regulamentadas – alerta máximo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 out. 1999. Seção I, p. 23.

BRYXIOVA, M.; KUDELA, V. Detection of bacterial wilt pathogen of lucerne by PCR. **Plant Protection Science**, v. 38, special 2, p. 294-296, 2002. CONFERENCE OF EUROPEAN FOUNDATION FOR PLANT PATHOLOGY, 6., 2002, Prague, Czech Republic. Disease resistance in plant pathology: proceedings. Editado por TABORSKY, V.; POLAK, J.; LEBEDA, A.; KUDELA, V.

*CLAVIBACTER michiganensis* subsp. *insidiosus*. Disponível em: <[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter\\_m\\_insidiosus/CORBIN\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_insidiosus/CORBIN_ds.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2004.

CLOSE, R.; MULCOCK, A. P. Bacterial wilt, *Corynebacterium insidiosum* (McCulloch 1925) Jensen 1934, lucerne in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 15, n. 1, p. 141-148, 1972.

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. **Distribution maps of plant diseases**: map n. 67. 3<sup>rd</sup> ed. Farnham Royal, UK, 1973.

CORMACK, M. W. Longevity of the bacterial wilt organism in alfalfa hay, pod debris, and seed. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 51, p. 260-261, 1961.

CORMACK, M. W.; MOFFATT, J. E. Occurrence of the bacterial wilt organism in alfalfa seed. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 46, p. 407-409, 1956.

DAVIS, M. J.; GILLASPSIE JUNIOR, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *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.

ERWIN, D. C. **Bacterial wilt**. In: STUTEVILLE, D. L.; ERWIN, D. C. (Eds.). Compendium of alfalfa diseases. 2<sup>nd</sup> ed. St. Paul: APS Press, 1990. p. 5-6.

HAWN, E. J. Mode of transmission of *Corynebacterium insidiosum* by *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 3, p. 420-421, 1971.

HAYWARD, R. C.; WATERSON, J. M. **CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, n. 13, 1973.

HUNT, O. J.; GRIFFIN, G. D.; MURRAY, J. J.; PEDERSEN, M. W.; PEADEN, R. N. The effects of root knot nematode on bacterial wilt in alfalfa. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 61, p. 256-259, 1971.

JONES, F. R. A new bacterial disease of alfalfa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 15, p. 243-244, 1925.

JONES, F. R.; MCCULLOCH, L. A bacterial wilt and root rot of alfalfa caused by *Aplanobacter insidiosum* L. McC. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 33, n. 6, p. 493-521, 1926.

KOKOSKOVA, B.; PANAKOVA, I.; KREJZAR, V. Characteristics of

polyclonal antisera for detection and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. **Plant Protection Science**, v. 36, n. 2, p. 46-52, 2000.

LOUWS, F. J.; JELL, J.; MEDINA-MORA, C. M.; SMART, C. D.; OPGENORTH, D.; ISHIMARU, C. A.; HAUSBECK, M. K.; BRUIJN, F. J.; FULBRIGHT, D. W. rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 88, n. 8, p. 862-868, 1998.

MCCULLOCH, L. *Aplanobacter insidiosum* n.sp., the cause of an alfalfa disease. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 15, p. 496-497, 1925.

RIES, S. M.; STROBEL, G. A. Biological properties and pathological role of a phytotoxic glycopeptide from *Corynebacterium insidiosum*. **Physiological and Plant Pathology**, London, v. 2, p. 133-142, 1972.

ROBBS, C. F. O gênero *Corynebacterium* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 213-215, 1985.

SAMAC, D. A.; NIX, R. J.; OLESON, A. E. Transmission frequency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* to alfalfa seed, and identification of the bacterium by PCR. **Plant Disease**, St. Paul, US, v. 82, n. 12, p. 1362-1367, 1998.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul, US: APS Press, 2001.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. R. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, GB, v. 75, p. 721-763, 1996.

<p>Comunicado Técnico, 118</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2004): 150 unidades</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p><b>Presidente:</b> Maria Isabel de Oliveira Penteadó <b>Secretário-Executivo:</b> Maria da Graça Simões Pires Negrão <b>Membros:</b> Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteadó Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro <b>Supervisor editorial:</b> Maria da Graça S. P. Negrão Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado <b>Editoração eletrônica:</b> Maria da Graça Simões Pires Negrão</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

