

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis*
pv. *manihotis* POR ANÁLISE DE ISOENZIMAS E AGRESSIVIDADE**

ROBERTO LUÍS PORTZ

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO/ 2003

ROBERTO LUÍS PORTZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis*
pv. *manihotis* POR ANÁLISE DE ISOENZIMAS E AGRESSIVIDADE**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia -
Nível Mestrado, para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Renato
Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO/ 2003

No princípio criou Deus os céus e a terra...

(Gênesis 1: 1)

Havendo o Senhor Deus formado da terra todos os animais do campo e todas as aves do céu, trouxe-os ao homem, para ver como lhes chamaria; e a tudo o que o homem chamou a todo ser vivente, isso foi o seu nome.

(Gênesis 2: 19)

Ao Deus eterno, imortal, invisível mas real...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo, autor e consumidor da fé, dando me a oportunidade de percorrer este caminho;

A minha família, em especial aos meus pais João e Juliana Portz, irmãos Gilberto, Lenir e Márcio, que não mediram esforços nos momentos difíceis;

Ao meu companheiro de horas incansáveis de laboratório e sol ardente, Odair José Kuhn, pelas valiosas contribuições, compreensão, esforço e dedicação a este trabalho;

Ao professor e amigo Dr. José Renato Stangarlin, pelo ensino e oportunidades de desenvolvimento dos conhecimentos adquiridos durante todos estes anos, pela paciência e orientação para a conclusão deste trabalho;

Ao professor Cleber Furlanetto, pela amizade e incentivo ao ingresso na pós-graduação;

Aos colegas, verdadeiros amigos, Odair Johanns, Rubens Fey e Alfredo de Gouvêa, pelo apoio em todos os momentos;

A Sigmar Herpich, Técnicos relacionados à cadeia produtiva da mandioca na região oeste do Paraná, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, Dauri Tessman e Antônio Carlos Maringoni, pela provisão de material de estudo;

A CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Ensino Superior, pela concessão de bolsa auxílio,

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agronomia professor Dr. Ubirajara Conto Malavasi pelo empenho na condução do curso;

As secretárias do Centro de Ciências Agrárias em especial a Noili pela disposição;

Ao Professor Dr. Mário Cezar Lopes, por conduzir e disponibilizar o Núcleo de Estações Experimentais da UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, para realização do trabalho; e, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta Dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A CULTURA DA MANDIOCA.....	3
2.1.1 A Cultura da Mandioca do Paraná	4
2.2 BACTERIOSE DA MANDIOCA	5
2.2.1 Etiologia.....	6
2.2.2 Sintomas	7
2.2.3 Epidemiologia.....	9
2.2.4 Controle.....	10
2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	11
2.3.1 Eletroforese	11
2.3.2 Análises Multidimensionais	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>X. AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i>	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DE AMIDO...	19

3.3	CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA AGRESSIVIDADE	20
3.4	ELETROFORESE PARA A ISOENZIMA ESTERASE	22
3.4.1	Obtenção do Extrato Protéico	22
3.4.2	Dosagem de Proteínas Totais	23
3.4.3	Preparo do Gel e Eletroforese	24
3.5	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	ISOLADOS DE <i>X. AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i>	27
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DE AMIDO...30	
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA AGRESSIVIDADE	31
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA ESTERASE.....	33
5	CONCLUSÕES	37
6	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICES	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exsudação bacteriana, sintoma típico da forma sistêmica, devido ao ataque de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	7
Figura 2.	Manchas foliares, sintoma típico da forma não sistêmica, devido ao ataque de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	8
Figura 3.	Colônias de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> com formação de halo translúcido, indicando hidrólise de amido.....	19
Figura 4.	Aspecto de plantas de mandioca utilizadas no ensaio para verificar a agressividade de isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	20
Figura 5.	Escala de notas de 0 a 3 sendo: 0, folíolo sem sintomas; 1, folíolo com manchas de até 5 mm de diâmetro; 2, folíolo com manchas necróticas maiores que 5 mm de diâmetro; 3, folíolo totalmente necrosado.....	21
Figura 6.	Etapas do processo de obtenção do extrato protéico: A) ependorfe com 300 mg de células bacterianas; B) processo de maceração; C) e D) detalhes da filtragem da amostra.....	23
Figura 7.	Aparência do gel durante a secagem.....	25
Figura 8.	Representação das bandas de α e β – esterase, obtidas pelo processo eletroforético para os 21 isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , e mobilidade relativa (MR) para cada banda (—) da enzima.....	34
Figura 9.	Dendrograma gerado pelo método UPGMA representando a distância genética, tomando como parâmetro à atividade esterásica entre os isolados. Municípios de Entre Rios do Oeste (ERO), Marechal Cândido Rondon (MCR), Mercedes (MER), Nova Santa Rosa (NSR), Pato Bragado (PBR) e Estado de São Paulo (SP).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis taxonômicos nos quais diferentes técnicas podem ser utilizadas para diferenciação de bactérias.....	13
Tabela 2. Municípios amostrados, variedades de mandioca e resultados quanto à presença e/ou ausência de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> em amostras coletadas nos municípios de abrangência do trabalho.....	28
Tabela 3. Incidência de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , em amostras de mandioca coletadas em municípios da região oeste do Paraná.....	30
Tabela 4. Capacidade de hidrólise de amido, em meio nutriente-amido, de isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> obtidos de ramas de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná.....	31
Tabela 5. Agressividade de isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , obtidos de ramas de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná.....	32

RESUMO

Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por análise de isoenzimas e agressividade

A bacteriose ou murcha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) é a doença de maior importância econômica na cultura da mandioca e sua ocorrência está generalizada em todos os locais onde esta é cultivada. A intensidade da doença está relacionada, principalmente, com a resistência e idade da planta e com as condições edafoclimáticas. Com o objetivo de obter informações sobre a variabilidade genética desta bactéria em municípios produtores da região Oeste do Paraná, foi realizado um levantamento, através de coletas de ramas com sintomas semelhantes aos causados pela doença, em Entre Rios do Oeste, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa e Pato Bragado. Foram coletadas ramas de variedades de mandioca destinadas para indústria e para mesa. Os isolados obtidos foram caracterizados quanto à atividade “*in vitro*” de amilase, análise eletroforética de isoenzimas de α e β -esterase e quanto à agressividade. A partir de 61 materiais vegetais coletados, foi possível obter 19 isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, sendo que, materiais provenientes de variedades de mesa apresentaram maior incidência em relação àsquelas para indústria. Manivas provenientes de Pato Bragado, Entre Rios do Oeste e Mercedes apresentaram incidências de 10, 27 e 10%, respectivamente, valores inferiores aos de Marechal Cândido Rondon (50%) e de Nova Santa Rosa (58%). Os isolados puderam ser

agrupados em três, seis e 12 grupos distintos com relação à capacidade amilolítica, agressividade e isoenzimas de esterase, respectivamente. Não houve relação entre a atividade de amilase e agressividade dos isolados. Baseado na procedência, isolados de Marechal Cândido Rondon foram mais agressivos que os provenientes das outras regiões amostradas. O agrupamento com base em esterase permitiu verificar que isolados provenientes de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes apresentam, entre si, alto grau de similaridade. Estes resultados indicam haver diferenciação entre os isolados da bactéria presentes nos municípios amostrados.

ABSTRACT

Characterization of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by isoenzymes analysis and aggressiveness

The bacterial blight of cassava (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) is the most important disease in the culture of the cassava and its occurrence is generalized in all the places where it is cultivated. The intensity of the disease is related, mainly, with the resistance and age of the plant and with the soil and weather conditions. With the objective of obtaining information about the genetic variability of these bacteria in the West region of Paraná, a research was accomplished, throughout sampling of stems with similar symptoms to the caused by the disease, at Entre Rios do Oeste, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa and Pato Bragado. Stems of cassava varieties destined for industry and varieties for human consume were sampled. The isolates obtained were characterized to "*in vitro*" amylase activity, eletrophoretic analysis of isoenzymes α and β -esterase and aggressiveness. From 61 collected materials, it was possible to obtain 19 isolated of *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Materials of human consume varieties showed larger incidence than those for industry. Stems from Pato Bragado, Entre Rios do Oeste and Mercedes showed incidences of 10, 27 and 10%, respectively, values smaller than those of Marechal Cândido Rondon (50%) and Nova Santa Rosa (58%). The isolates could be contained in three, six and 12 different groups to amylolytic activity,

aggressiveness and esterase isoenzymes, respectively. There was not relationship between the amylase activity and aggressiveness of the isolates. Based on the origin, isolates of Marechal Cândido Rondon were more aggressive than those of other sampled areas. The clustering for esterase allowed to verify that isolates from Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa and Mercedes showed high similarity degree. These results indicate there to be differentiation among the isolates of the bacteria presents in the studied regions.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) detém uma importância social e econômica em todos os locais onde é cultivada. No Brasil a cultura, comporta-se em alguns Estados como importante geradora de divisas, influenciando diretamente nos hábitos da população das regiões onde é cultivada.

O Estado do Paraná ocupa, atualmente, o primeiro lugar no ranking da produção nacional de mandioca, sendo a região oeste do Estado a que apresenta o maior número de indústrias relacionadas ao processamento da raiz.

A cultura da mandioca vem apresentando, com a tecnificação do sistema de produção, um acréscimo nos problemas relacionados à ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas. No caso de doenças, a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* tem potencial para reduzir a produção e inviabilizar novos cultivos, isto porque o patógeno pode ser disseminado a longas distâncias pelo próprio material propagativo.

A bacteriose tem um comportamento muito variável quando se trata de diferentes variedades de mandioca, bem como, o próprio patógeno apresenta variações quanto à agressividade de isolados, o que já foi identificado com maior número de ocorrência nos países da América do Sul, centro de origem da cultura e do patógeno. A principal forma de disseminação de *X. axonopodis* pv. *manihotis* é através de manivas infectadas, obtidas de plantas doentes mas, muitas vezes, assintomáticas. Dessa forma, estudos que proporcionem obter informações a

despeito das diferentes populações desta bactéria, existentes em uma região, podem contribuir para amenizar tal disseminação ou mesmo, a introdução de populações mais agressivas em uma área de cultivo isenta do patógeno ou que apresente isolados menos agressivos.

Com o objetivo de obter informações sobre a variabilidade de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, foi conduzido um trabalho avaliando-se a atividade *in vitro* de amilase, a análise de isoenzimas α e β -esterase e a agressividade de diferentes isolados da bactéria coletados em municípios da região Oeste do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta do tipo arbusto perene, resistente à seca, com raízes tuberosas (que acumulam amido) de formato variado e em número de cinco a 20. O caule (sem ramificação no período vegetativo) é ereto, de cor cinza ou prateada ou pardo-amarelada, com folhas simples de cinco a sete lóbulos. As flores são unissexuadas masculinas ou femininas e o fruto é uma cápsula com três sementes e que se abre quando seco (Bahia, 2001). Embora a mandioca apresente sementes viáveis, estas são utilizadas apenas para a produção de novas cultivares no melhoramento genético, sendo a propagação comercial feita por estaca (manivas). Por ser propagada vegetativamente, uma série de doenças podem estar sendo levadas juntamente com o órgão propagativo.

Registros históricos indicam que a mandioca é cultivada há mais de 5000 anos na América e que mesmo antes de 1600, quando do avanço do processo de colonização, já era encontrada na África e Ásia. A cultura inicialmente estabeleceu-se no Congo Africano, atingindo em pouco tempo a África oriental e estabelecendo-se logo após no continente Asiático. Esta expansão da cultura adveio, principalmente, por influência portuguesa, atingindo aproximadamente 92 países tropicais e subtropicais até o final do século XIX (Miura & Monteiro, 1997).

Segundo Henain & Cenoz (1971), dentro do grupo das plantas alimentícias ou de subsistência dos povos das regiões tropicais e subtropicais do mundo, a

mandioca ocupa um lugar de suma importância junto ao milho e arroz, tendo uma destacada expressão econômica, social e histórica.

A importância da cultura é evidenciada pelo alto teor de amido, encontrado em suas raízes e sua utilização na alimentação de aproximadamente 500 milhões de pessoas. Em termos mundiais, dos anos 1960 a 1990 a produção, em milhões de toneladas, aumentou de 70 para 152, respectivamente (Lavina & Miura, 1995; Silva et al., 2001).

Os quatro maiores produtores de mandioca são a Nigéria (31 milhões de toneladas), Brasil (25), Zaire (17) e Indonésia (15). Dos 16 milhões de hectares cultivados, 57% estão na África, 25% na Ásia e 18% na América Latina. Cerca de 85% da área cultivada se destinam ao consumo doméstico (57% para alimentação humana e 28% para consumo animal). Os 15% restantes (30 milhões de toneladas) se destinam à industrialização, na produção de raspas, farinha, fécula e seus derivados (Miura & Monteiro, 1997). O consumo mundial médio é de 18 kg por pessoa ano (kg/p/a), porém, na África, o consumo médio é de 96 kg/p/a, sendo o Zaire o maior consumidor, com cerca de 391 kg/p/a (Lavina & Miura, 1995).

Com relação ao centro de origem da planta, o Brasil possui o maior número de variedades geneticamente adaptadas às diferentes condições ecológicas e sistemas de cultivo e, conseqüentemente, o maior número de doenças associadas à cultura. São conhecidos cerca de 20 patógenos que causam doenças, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides e protozoários. Entretanto, em condições de cultivo tradicional com finalidade de subsistência, que predominam no Brasil, poucas são as doenças que têm poder de causar grandes prejuízos aos agricultores, sendo geralmente de ocorrência sazonal ou ainda confinadas a determinadas regiões geográficas (Miura & Monteiro, 1997; Poltronieri & Trindade, 1999).

2.1.1 A Cultura da Mandioca do Paraná

A cultura da mandioca, no Estado do Paraná, vem experimentando sucessivos aumentos a partir de 1980 e alcançou a primeira posição nacional na última safra, 00/01. Este crescimento, em determinados anos, variou de 10 a 15% da área plantada e na última safra atingiu 211.000 ha plantados e uma produção de 4.400.000 toneladas de raiz. A produtividade no Estado vem variando entre 20.000 e

22.000 kg ha⁻¹, o que representa uma larga vantagem se comparada com a média nacional de 14.003 kg ha⁻¹ (SEAB/DERAL, 2002). Segundo Groxko (2002), esta diferença é resultante de clima e solo favoráveis e, também, as regiões produtoras de mandioca destinada às indústrias utilizam um bom grau tecnológico. No Estado, a produção de Mandioca continua concentrada nas regiões do Noroeste, Centro Oeste e Oeste. Esta última, apesar de mais recente, é a mais expressiva em termos de produtividade, alcançando acima de 25.000 kg ha⁻¹ de mandioca de um ciclo.

O Paraná também conta com o maior e mais moderno parque industrial do país. Atualmente, existem 41 indústrias de fécula no Estado, todas de médio e grande porte e ainda cerca de 120 farinheiras (FUNDETEC, 2000).

2.2 BACTERIOSE DA MANDIOCA

A doença de maior importância econômica na cultura da mandioca é a bacteriose ou murcha bacteriana, e sua ocorrência está generalizada em todos os locais onde a mandioca é cultivada (Lozano & Booth, 1982; Miura & Monteiro, 1997). Os relatos da doença constam de 1912, inicialmente no Estado de São Paulo e, atualmente, pode ser encontrada em todo território nacional. Além do Brasil, a bacteriose tem sido relatada causando surtos epidêmicos em outros países da América do Sul, América Central, África e Ásia (Massola & Bedendo, 1997).

Os prejuízos causados à produção variam principalmente em função da variedade utilizada, condições climáticas, inóculo inicial (representado por material de plantio infectado) e variações na virulência e/ou agressividade de diferentes isolados da bactéria. Em variedades suscetíveis, as perdas podem variar de 50 a 100% quando condições de temperaturas estão entre 20 e 24 °C e umidade relativa elevada, enquanto que em variedades resistentes não ultrapassa 5 a 7% da produção. Estas perdas podem ser maiores quando patógenos secundários, como *Coanephora cucurbitarum* e *Colletotrichum* spp. invadem os tecidos infectados pela bactéria. Este efeito sinérgico entre patógenos tem sido verificado principalmente quando a bacteriose ocorre em culturas que apresentam antracnose (Massola & Bedendo, 1997).

2.2.1 Etiologia

A Bacteriose da mandioca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar, 1915) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995, é considerada a doença de maior importância para a cultura. Este patógeno foi inicialmente denominado de *Bacillus manihotis* Arthaud-Berthet (Miura e Monteiro, 1997; Massola & Bedendo, 1997) e identificado no Brasil em 1912 (Bondar, 1912). Mais tarde, a bactéria foi chamada de *Phythomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Viegas e, posteriormente, incluído no gênero *Xanthomonas* como *X. manihotis* (Arthaud-Berthet) Star, o qual permaneceu por muito tempo. Em 1974, com a publicação da oitava edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, a bactéria passou a ser considerada como um patovar de *X. campestris*, variando apenas pela especificidade a hospedeiros de gênero *Manihot*, recebendo o nome de *X. campestris* pv. *manihotis* (Berthet & Bondar) (Massola & Bedendo, 1997). Porém, em 1996, com a publicação da *Review of Plant Pathology*, foi proposta a divisão da espécie *X. campestris* em duas espécies, de tal forma que uma parte dos patovares permaneceu como *X. campestris* e outra parte tornou-se *X. axonopodis*, sendo que esta bactéria passou a chamar-se *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Young et al., 1996).

A célula bacteriana da *X. axonopodis* pv. *manihotis* possui o formato de bastonete fino com 0,5 x 0,2 micra, é gram-negativa, movimenta-se por um flagelo polar (monótrica), possui células não encapsuladas e não formadoras de esporos, é aeróbica, com rápido crescimento, sem formar pigmentos em meios com açúcares. Além disso, não induz reação de hipersensibilidade em folhas de fumo e não causa podridão em tubérculos de batata ou raízes de mandioca (Miura & Monteiro, 1997; Massola & Bedendo, 1997). Também não fermenta a glicose, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, mostra reação negativa no teste da oxidase de Kovacs (Massola & Bedendo, 1997) e positivo para o teste de hidrólise de amido (Amaral, 1958; Lozano & Sequeira, 1974a).

Elango & Lozano (1981) e Alves & Takatsu (1984), estudando o comportamento de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, não detectaram diferenças na patogenicidade, embora tenham verificado diferenças na sua virulência. Verdier et al. (1993) detectaram a presença de variabilidade genética

entre diferentes isolamentos da patovar *manihotis*, com maior variabilidade nos isolados na América do Sul.

2.2.2 Sintomas

São constatadas duas formas sintomatológicas distintas em plantas de mandioca afetadas pela bacteriose. A forma sistêmica ocorre quando a bactéria atinge os tecidos vasculares (**Figura 1**), enquanto que a forma não sistêmica ou localizada ocorre quando há somente infecções dos tecidos foliares (**Figura 2**).



Fonte: do autor

Figura 1. Exsudação bacteriana, sintoma típico da forma sistêmica, devido ao ataque de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

A forma sistêmica é a que causa maiores danos. A intensidade da doença está relacionada, principalmente, com a resistência e idade da planta, as condições edafoclimáticas e o grau de virulência e/ou agressividade do isolado bacteriano. Ao atingir os tecidos vasculares, a bactéria se transloca por estes, obstruindo-os pelo acúmulo de células bacterianas ou pela formação de caloses. Verifica-se a descoloração dos tecidos vasculares quando se fazem cortes longitudinais nas raízes. Também se observa presença de cancrs no caule, nos pecíolos, nas nervuras e sobre a lâmina foliar. Os cancrs são visíveis a olho nu, e, por meio destes, ocorre uma intensa exsudação bacteriana (Miura & Monteiro, 1997).

Posteriormente, observam-se murcha, seca, queda de folhas e morte de plantas. As plantas, nesta fase, caracterizam-se por apresentarem murcha parcial ou total. De oito a 16 dias após a infecção ocorre a morte descendente das plantas. Nas raízes, inicialmente se verifica descoloração dos tecidos vasculares (Miura & Monteiro, 1997).

Na forma não sistêmica, os sintomas são verificados nas folhas e são caracterizados inicialmente por pequenas lesões angulares (limitadas pelas nervuras), necróticas, de aspecto aquoso ou oleoso. Posteriormente, pode haver a coalescência das lesões, tornando-se de coloração pardo-clara a marrom, com tonalidade azulada na face inferior das folhas, onde se pode observar exsudação bacteriana, como na forma sistêmica. Quando a infecção ocorre através dos hidatódios, os sintomas assemelham-se a uma queima causada por água quente, por isso chamada escaldadura, caracterizando-se por lesões nas bordas das folhas (Miura & Monteiro, 1997).



Fonte: do autor

Figura 2. Manchas foliares, sintoma típico da forma não sistêmica, devido ao ataque de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

Verifica-se em algumas regiões, como as semi-áridas do Nordeste, a chamada "bacteriose das pontas". Esta se caracteriza pela perda de turgescência e secamento das extremidades das hastes, que raramente excedem o comprimento de 30 cm e apresentam manchas escuras (Conceição, 1973).

2.2.3 Epidemiologia

A murcha bacteriana é disseminada a longas distâncias por meio de material de plantio (manivas) infectado (Lozano & Sequeira, 1974b). Não há dúvidas de que, por meio deste, esta bacteriose foi disseminada por todo o Brasil e inclusive outros países. Como não há um rigoroso controle do trânsito de materiais vegetais dentro do território nacional, as manivas infectadas, quase sempre, são responsáveis pela introdução da doença em áreas isentas. As ferramentas também constituem veículo de disseminação, principalmente aquelas utilizadas em podas ou para cortar novas manivas para plantio (Massola & Bedendo, 1997).

Dentro de um mesmo campo de cultivo, a chuva desempenha papel importante na disseminação da doença. Os respingos, ao atingirem plantas infectadas, promovem a liberação dos talos bacterianos presentes nas exudações, que, em contato com folhas saudáveis, penetram através de ferimentos ou aberturas naturais e, em presença de alta umidade, iniciam novas infecções. Isto explica a alta severidade da doença em estação chuvosa. Segundo Lozano & Sequeira (1974b), da penetração ao início dos sintomas são necessários em média 11 a 13 dias.

Temperaturas entre 20 e 24 °C e alta precipitação pluvial são consideradas ótimas para o desenvolvimento da doença, podendo a murcha bacteriana constituir problema sério. Tais condições são encontradas na região Sul, nos planaltos das regiões Sudeste e Centro-Oeste e em algumas regiões de alta precipitação pluvial no Nordeste. Temperaturas muito baixas (próximas a 10 °C) ou muito quentes (acima de 30 °C) limitam a atividade do patógeno e o desenvolvimento de sintomas. A umidade do ar próxima a 100% favorece a penetração do patógeno (que ocorre em aproximadamente 6 h) e a manifestação dos sintomas da doença (Miura & Monteiro, 1997).

Sementes verdadeiras também podem carregar o patógeno. A contaminação pode ocorrer pelos respingos de chuva ou por translocação da bactéria através do xilema até o embrião, onde permanece quiescente. Sementes infectadas não exibem nenhum sintoma e germinam normalmente (Massola & Bedendo, 1997).

O patógeno possui baixa capacidade de sobrevivência no solo. Em geral, solos com pH entre 6,0 e 6,5 e com baixo teor de matéria orgânica são mais favoráveis, mas mesmo nesses solos, a sobrevivência dificilmente ultrapassa 60

dias. Em restos de cultura este período pode se estender até seis meses (Fresco, 1986). Períodos de um ano na ausência da mandioca são considerados eficientes para erradicar totalmente a bactéria do solo (Miura & Monteiro, 1997).

Ikotun (1981) não detectou nenhuma espécie vegetal que pudesse ser hospedeira alternativa da bactéria dentre várias espécies daninhas em áreas de cultivo de mandioca. Portanto, sua gama de hospedeiros parece estar limitada a plantas do gênero *Manihot*. Com exceção de *M. esculenta*, as demais espécies deste gênero são pouco cultivadas ou raramente encontradas em condições naturais a ponto de atuarem como fontes de inóculo capazes de causar epidemias (Martinez & Prates, 1983).

2.2.4 Controle

O controle mais eficiente tem sido o uso de variedades tolerantes, sendo que estas variedades, mesmo em condições propícias para a bactéria, não sofrem muitos danos (Massola & Bedendo, 1997). A maioria das variedades tolerantes são de uso industrial e não se prestam para o consumo *in natura*, devido ao sabor amargo devido a presença de alto teor de HCN. Por outro lado, a grande maioria das variedades de mesa é suscetível a esta doença. A eliminação dos restos culturais para redução da fonte de inóculo é uma prática eficiente (Miura & Monteiro, 1997), ou mesmo o pousio ou rotação de culturas para a eliminação natural do patógeno, uma vez que o mesmo possui baixa longevidade no solo.

A cultura da mandioca no que diz respeito às formas de cultivo não dispõe de investimentos em tratamentos culturais quando comparados a outras culturas, apresentando um comportamento muito variado quanto ao grau de tolerância, principalmente quando se trata da bacteriose.

Quando são usadas variedades suscetíveis, com boas características agronômicas, são recomendadas medidas auxiliares de controle como: plantio de manivas sadias; rotação de culturas ou simples remoção de restos culturais, seguido de aração e pousio por seis meses; uso de ferramentas desinfestadas e restrição ao movimento de pessoas das áreas afetadas para as áreas sadias; inspeção fitossanitária com erradicação de plantas doentes e, se possível, utilizar o sistema de consórcio com outras culturas (Massola & Bedendo, 1997).

Trabalhos realizados em Uganda verificaram que altos níveis de fertilidade (particularmente através da aplicação de P e K) não preveniram a infecção das plantações pela bactéria, no entanto, retardaram o desenvolvimento da doença (Fresco, 1986).

O controle químico de fitobactérias é bem mais difícil em comparação com o controle de fungos causadores de doenças em plantas. Os antibióticos constituem um grupo de agroquímicos de emprego relativamente recente no controle de doenças de plantas (Kimati, 1997). Para fungos, novas moléculas estão sendo desenvolvidas a cada ano. No entanto, o mesmo não ocorre para o controle de bactérias, sendo os bactericidas de hoje os mesmos usados na década de 1950, quando houve sua descoberta como potencial para uso em plantas doentes. Os fungicidas a base de cobre, juntamente com os antibióticos estreptomicina, tetraciclina e kasugamicina, são os únicos produtos químicos disponíveis no Brasil para o controle de bacterioses (Lopes, 1998). Outro fator agravante é a limitação do uso apenas, em culturas de alto valor econômico com alto risco de prejuízos (Kimati, 1997).

2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

Para que seja viável a utilização de cultivares resistentes, bem como, para que seja possível o uso de métodos rápidos de diagnose desta bactéria, como os métodos serológicos, é necessário que se conheça qual a diversidade genética existente em populações de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, diversidade esta que pode refletir na virulência e/ou agressividade dos isolados bacterianos presentes em uma determinada região. Neste caso, a diversidade genética em uma população de organismos pode ser verificada por diferentes métodos. A seguir será comentada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e uso da mesma no estudo de fitobactérias.

2.3.1 Eletroforese

Por ser a eletroforese uma técnica simples, cujos resultados refletem a atividade gênica, ela é de grande valia para estudos genéticos, populacionais, taxonômicos e evolucionários de seres vivos (Paccola-Meirelles et al., 1988).

O termo eletroforese deriva do grego *élektron* + *phorese* e significa "conduzido pela eletricidade". Esta técnica teve seus primórdios em 1930, com os trabalhos de Arne Tiselius, quando foi utilizado um meio líquido na migração de proteínas. Mais tarde, com algumas modificações, desenvolveu-se a eletroforese de zona, na qual o meio de migração constitui-se de um suporte não condutor. Suportes como papel de filtro, acetato de celulose, géis de ágar, agarose, amido, poliacrilamida, camadas porosas de vidro em pó, areia, amido, pectina, gelatina, PVC, celulose, sílica gel e resinas de troca iônica, são também utilizados em técnicas eletroforéticas (Mandarino & Vidaurre, 1995).

Em microrganismos, principalmente, a utilização de eletroforese em géis de poliacrilamida e agarose vem se tornando indispensável, servindo para distinção entre espécies, linhagens e mutantes por meio do perfil eletroforético em zimogramas. Tudo isso é de grande valia como recurso técnico para auxiliar a genética básica e biotecnologia. Embora não sejam de difícil execução, nem necessitem de equipamento sofisticado e dispendioso, as técnicas eletroforéticas têm etapas definidas que precisam ser rigorosamente seguidas para que se obtenha o sucesso almejado. De fato, em vários laboratórios que trabalham com microrganismos no Brasil, essas técnicas já constituem rotina (Paccola-Meirelles et al., 1988).

A identificação de um organismo é fundamentada em um ou mais caracteres, ou em um padrão de caracteres típicos de determinado grupo (Krieg, 1984).

De acordo com Oliveira & Scortichini (1998), bactérias possuem dimensões extremamente reduzidas, não sendo possível, portanto, sua identificação com base apenas em caracteres anatomorfológicos, bioquímicos e/ou fisiológicos. Sendo assim, a identificação, por meio de métodos tradicionais nem sempre é possível, notadamente no nível de patovares e isolados. Em tais casos, para obtenção de identificação acurada, faz-se necessária a utilização de técnicas modernas, como eletroforese de proteínas totais e, ou, de isoenzimas, serologia ou hibridização de ácidos nucleicos. Estes e outros métodos podem ser utilizados para diferenciação de bactérias (**Tabela 1**).

Tabela 1. Níveis taxonômicos nos quais diferentes técnicas podem ser utilizadas para diferenciação de bactérias

Técnica	Família	Gênero	Espécie	Isolado
RFLP				
Métodos sorológicos				
Tipagem com Fagos e bacteriocinas				
Padrões eletroforéticos de proteínas				
Zimogramas				
Pirólise GLC				
Análises fenotípicas				
Hibridização DNA:DNA				
Ácidos graxos celulares				
Outros marcadores quimio-taxonômicos				
Sondas de DNA				
Hibridização DNA:rNA				
Seqüenciamento de rNA				

Segundo Kersters (1990), as proteínas constituem uma fonte de informação de grande potencial para classificação, caracterização e identificação de bactérias. Eletroforese de proteínas é uma técnica muito sensível que, normalmente, fornece dados úteis sobre a similaridade ou a dissimilaridade de isolados dentro de espécies, subespécies ou biótipos (Kersters & De Ley, 1980; Jackman, 1985; Kersters, 1985).

Segundo Oliveira & Scortichini (1998), organismos relacionados possuem proteínas celulares idênticas ou similares. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) produz, em condições padronizadas, um padrão de bandas bastante complexo, o qual pode ser considerado uma “impressão digital” ou “uma assinatura” do isolado bacteriano investigado (Kersters, 1990).

Estudos eletroforéticos podem ser utilizados para estimar a diversidade e estrutura genética de populações bacterianas (Oliveira & Scortichini, 1998). Selander et al. (1986) descreveram os procedimentos utilizados para estudar variação

genética em *Escherichia coli* e em outras bactérias. Segundo esses autores, os procedimentos descritos podem ser aplicados a qualquer espécie de bactéria.

São várias as aplicações da eletroforese em fitobacteriologia, permitindo a classificação e identificação rápida de bactérias e “screening” de grande número de isolados, para identificar grupos de organismos similares, antes de proceder estudos de homologia DNA:DNA. Além disso, permite a verificação rápida de autenticidade de isolados; diferenciação de colônias contaminantes e colônias variantes; estudos ecológicos e epidemiológicos; construção de perfis eletroforéticos característicos de isolados importantes, como isolados tipo e isolados patenteados (Kerstens, 1990).

Bandas protéicas podem ser, também, isoladas para utilização em estudos serológicos. Pode-se realizar a identificação de fitobactérias, em nível intra-específico, com anti-soros produzidos pelo emprego de bandas específicas (Oliveira & Scortichini, 1998).

O gênero *Xanthomonas* possui poucas propriedades morfológicas e bioquímicas que permitem sua distinção (Stolp et al., 1965). A identificação precisa de espécies e patovares de *Xanthomonas* é muito difícil sem a realização de testes de patogenicidade. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que tanto espécies quanto patovares podem ser diferenciados por meio de padrão eletroforético de proteínas solúveis totais e isoenzimas (El-Sharkawy & Huislingh, 1968 e 1971; Kimura & Dianese, 1983; Thaveechai & Schaad, 1986). El-Sharkawy & Huislingh (1971), estudando diversas espécies de *Xanthomonas*, e, com relação a sete enzimas e outras proteínas solúveis, encontraram similaridade entre isolados da mesma espécie e diferenças entre espécies diferentes. Kimura & Dianese (1983) verificaram que os perfis das isoenzimas esterase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida e desidrogenase da glicose-6-fosfato permitiram a distinção entre isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, bem como entre estes e outras espécies de *Xanthomonas*. Os estudos, entretanto, estão, em sua maioria, relacionados ao aperfeiçoamento da taxonomia do gênero *Xanthomonas* (Oliveira & Scortichini, 1998) e não com a caracterização de diferentes populações de uma determinada espécie.

2.3.2 Análises Multidimensionais

Ao focalizar múltiplos locos em populações não estruturadas hierarquicamente, diversos índices e coeficientes têm sido propostos para expressar o grau de similaridade e distância genética entre amostras de populações. Alguns desses coeficientes se baseiam nas frequências alélicas estimadas do modo convencional, enquanto outros operam com frequências alélicas arbitrárias do tipo 1 e 0, referindo-se à presença e à ausência, respectivamente, de dado alelo. Muitos coeficientes são calculados com base em locos individuais, sendo a distância final obtida a partir da média das distâncias dos locos. Outros são calculados usando-se a combinação de todos os locos, sem individualizar qualquer deles. Além disso, muitas distâncias genéticas são essencialmente medidas de distâncias geométricas, sem qualquer conteúdo genético, e por isso mesmo são denominadas coeficientes de dissimilaridade ou divergência (Dias, 1998). As análises multidimensionais podem ser feitas através da análise de componentes principais, de escala multidimensional e de agrupamento, que será comentada a seguir.

2.3.2.1 Análise de Agrupamento

A análise de agrupamento, ou análise de “cluster” como também é conhecida, ou ainda *cluster analysis*, é uma técnica multivariada que visa classificar **n** itens diversos (populações, clones, variedades, indivíduos, etc.), avaliados por um conjunto de **p** caracteres ou variáveis, a partir de uma medida de distância entre os itens. Na escolha das variáveis, a maior relevância e o maior poder discriminatório das mesmas devem ser os critérios a serem seguidos para a classificação. Com respeito ao número de variáveis a ser mensurado, a solução também é subjetiva. Esse número de variáveis deve ser tal que permita a descrição dos itens de acordo com o objetivo do estudo (Dias, 1998).

A análise de agrupamento é uma técnica meramente exploratória que visa a geração de hipóteses, a partir da análise de dados multivariados. Basicamente, a técnica compõe-se de duas etapas. Num primeiro momento, uma matriz de distâncias é gerada a partir da amostra dos **n** itens, totalizando **n (n – 1)/2** pares de distâncias. A seguir, um algoritmo de agrupamento é aplicado sobre essa matriz, de modo a identificar e conectar grupos homogêneos. Tais grupos são representados

graficamente em um diagrama de árvore denominado dendrograma. Percebe-se a utilidade dessa técnica ao empregá-la sobre um grande conjunto de itens (n elevado), de modo a transformá-lo em pequenos subconjuntos de manipulação, análise e interpretação facilitadas (Dias, 1998).

Esta técnica não contempla, *a priori*, o número e a composição dos diferentes grupos ou “clusters” a serem formados. No entanto, com esta técnica é possível alocar itens em grupos semelhantes. Naturalmente que muitos são os coeficientes de distância e os algoritmos de agrupamento passíveis de serem aplicados. Estudos com diferentes objetivos requerem distintos coeficientes e algoritmos. Entre os coeficientes de similaridade pode-se citar o de Nei e Li (S_{NI}), o de concordância simples (S_{CS}) e de Jaccard (S_J). A versatilidade e o poder discriminatório da análise de agrupamento tem permitido a sua aplicação nas mais diversas áreas da ciência (Dias, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *X. AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

Os isolados da bactéria foram obtidos mediante coletas de material vegetal (ramas) com sintomas na forma sistêmica da doença, provenientes da região Oeste do Paraná.

As coletas foram direcionadas em municípios em que a mandioca apresenta importância econômica significativa na região, destacando-se Entre Rios do Oeste, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa e Pato Bragado, os quais foram amostrados no período de agosto de 2001 a julho de 2002.

A aquisição das ramas infectadas foi realizada de forma a aumentar o número de variedades amostradas, incluindo variedades industriais e/ou de mesa.

O isolamento foi realizado conforme a metodologia proposta por Mariano et al. (2000). Para tanto, foram retiradas partes do tecido infectado de cada amostra em separado. Neste processo foram realizadas desinfestações superficiais sucessivas através de flambagem, após imersão dos ramos em álcool, para eliminação de possíveis contaminantes. Em seguida, partes do tecido foram repassadas para tubos de ensaio contendo solução salina (água destilada e esterilizada + 0,85% de NaCl) evitando assim, o rompimento das células bacterianas, que poderia ocorrer devido à diferença de potencial osmótico. O tecido vegetal permaneceu na solução por aproximadamente 20 min e, em seguida, foram transferidas alíquotas da solução

para placas de Petri contendo meio nutriente amido (3 g de extrato de levedura, 5 g de sacarose, 5 g de peptona bacteriológica, 8 g de amido de milho, 0,064 g de clorotalonil, 15 g de ágar e 1000 mL de água). Foram realizadas diluições em série, através do método de riscagem, e as placas permaneceram em temperatura ambiente ($\pm 26\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o crescimento de colônias individualizadas.

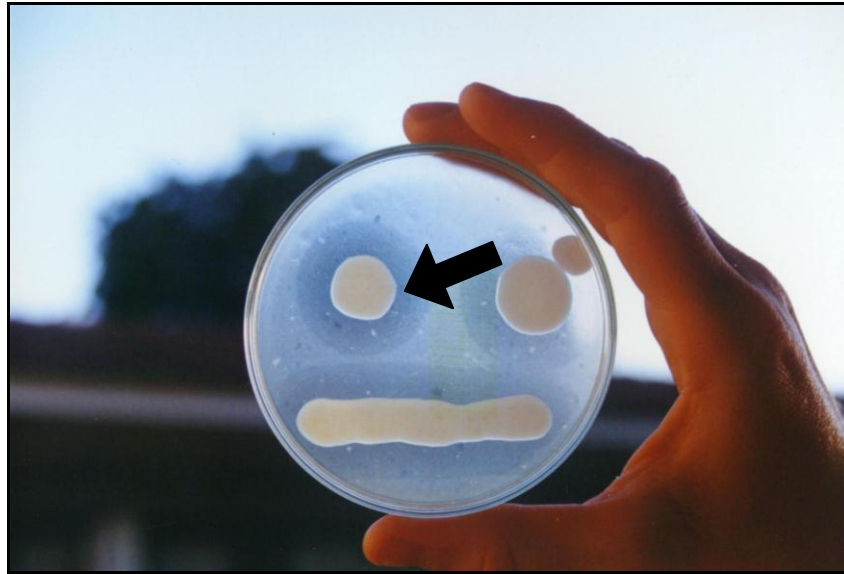
As colônias que apresentaram consumo de amido (**Figura 3**), indicado pela formação de halo translúcido, foram selecionadas e repassadas para tubos de ensaio contendo solução salina. Em seguida, foi realizada repicagem para novas placas no qual o crescimento das bactérias foi mantido por 48 h. Com a finalidade de ajustar a expressão do genoma bacteriano para o novo ambiente, os isolados em estudo foram cultivados sobre determinado meio por pelo menos três vezes, a intervalos de uma semana (Alfenas et al, 1998). Segundo Oliveira & Scortichini (1998), sob condições de crescimento idênticas, um isolado bacteriano sempre produzirá o mesmo grupo de proteínas e, conseqüentemente, o mesmo padrão eletroforético, sendo adequados para a diferenciação de espécies e isolados de bactérias. O meio de cultura utilizado foi o 523 proposto por Kado & Heskett (1970): 10 g de sacarose, 8 g de caseína ácida hidrolizada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de K_2HPO_4 , 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1000 mL de água destilada.

Para o armazenamento dos isolados, foram colocados 0,6 mL de solução de glicerol a 20% e 0,4 mL de meio 523 líquido em tubos ependorfe de 2,0 mL. Após autoclavagem, foram repassadas alíquotas de massa bacteriana para os mesmos e, posteriormente, os tubos foram agitados e armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para recuperar o isolado, foi realizada repicagem em placa com meio nutriente amido.

Na identificação dos isolados também foi realizada a coloração de Gram, observação da motilidade e teste de hipersensibilidade em plantas de fumo. Este consiste, na aplicação abaixo da epiderme da folha, de solução contendo 10^8 células bacterianas $\cdot \text{mL}^{-1}$, com o auxílio de seringas hipodérmicas e observação dos resultados após 24 h. A presença de necrose nas áreas infiltradas indica resposta positiva para hipersensibilidade.

A última etapa foi confirmar a capacidade de causar doença, por parte dos isolados, no hospedeiro. Para realizar este teste foi injetada uma solução contendo

10^8 células bacterianas . mL⁻¹ em folhas e caule de mandioca para verificar o aparecimento de sintomas típicos da doença.



Fonte: do autor

Figura 3. Colônias de *X. axonopodis* pv. *manihotis* com formação de halo translúcido, indicando hidrólise de amido.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DE AMIDO

Com a finalidade de verificar as diferenças entre os isolados com relação a hidrólise de amido, um ensaio foi conduzido em placas de Petri contendo meio nutritivo amido. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, onde os tratamentos consistiram dos isolados da bactéria, sendo cada tratamento composto por quatro repetições. O plaqueamento dos isolados foi realizado a partir de uma alíquota (alça de platina) por placa, de uma suspensão contendo 10^8 células bacterianas . mL⁻¹ de solução salina, cultivadas em meio nutritivo amido durante 48 h. Os resultados foram obtidos através da mensuração direta do diâmetro da área de amido hidrolisado e diâmetro da colônia após 148 h. As médias foram calculadas por $dc + dh \backslash dc$ sendo que dc = diâmetro da colônia e dh = diâmetro da área hidrolisada, e após, comparadas através de análise de variância.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA AGRESSIVIDADE

Para avaliar o comportamento dos isolados em relação à agressividade, foi realizado um ensaio utilizando-se a variedade Verdinha, altamente susceptível ao patógeno. O ensaio foi conduzido na área de cultivo protegido do Núcleo de Estações Experimentais (NEE) da UNIOESTE - *Campus* de Marechal Cândido Rondon, em túnel baixo coberto com sombrite (malha 50%). As plantas de mandioca foram cultivadas em vasos plásticos (com aproximadamente 6 L de solo previamente esterilizado) até atingirem aproximadamente 25 cm de altura (**Figura 4**).



Fonte: do autor

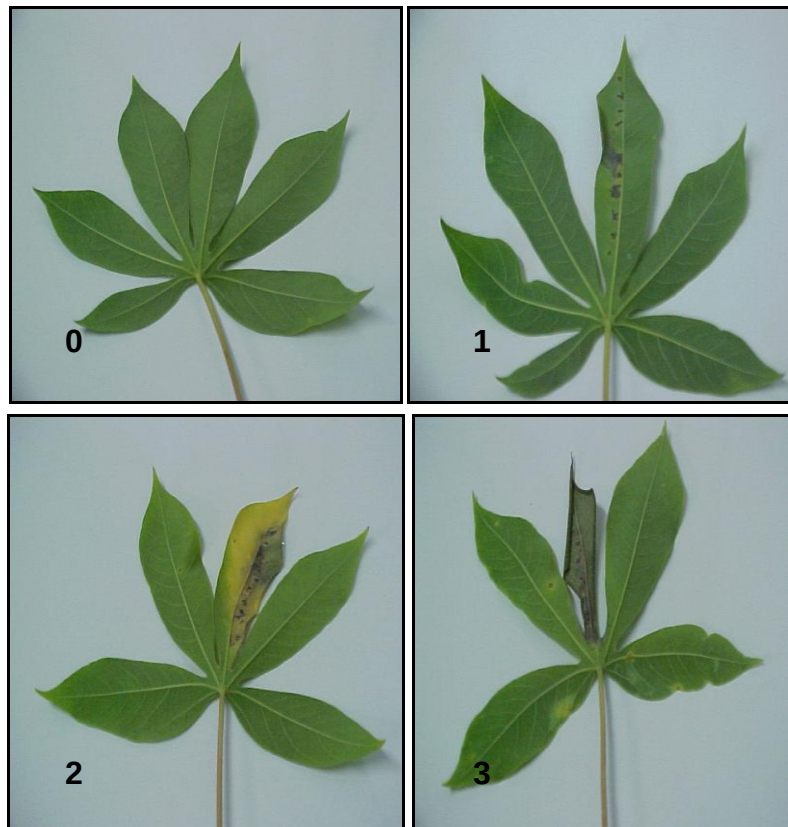
Figura 4. Aspecto de plantas de mandioca utilizadas no ensaio para verificar a agressividade de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, onde os tratamentos consistiram dos isolados da bactéria, sendo cada tratamento composto de quatro repetições.

Após obtenção de suspensão de 10^8 células bacterianas . mL⁻¹ de solução salina dos isolados, foram realizadas inoculações com seringa hipodérmica em apenas um folíolo da quarta folha (contada a partir do ápice). Em seguida, foi inoculada uma alíquota da mesma suspensão bacteriana na terceira axila a partir do

ápice. As avaliações foram realizadas após 18 dias, período suficiente para o desenvolvimento de sintomas, próximo ao verificado por Lozano & Sequeira (1974b) de 11 a 13 dias.

Os sintomas presentes no folíolo foram determinados mediante escala de notas variando de 0 a 3, sendo: 0, folíolo sem sintomas; 1, folíolo com manchas de até 5 mm de diâmetro; 2, folíolo com manchas necróticas maiores que 5 mm de diâmetro; 3, folíolo totalmente necrosado (**Figura 5**).



Fonte: do autor

Figura 5. Escala de notas de 0 a 3 sendo: 0, folíolo sem sintomas; 1, folíolo com manchas de até 5 mm de diâmetro; 2, folíolo com manchas necróticas maiores que 5 mm de diâmetro; 3, folíolo totalmente necrosado.

Para os sintomas presentes nas plantas decorrentes da inoculação no caule a avaliação foi de acordo com escala proposta por Miura et al. (1990), considerando uma escala de notas de 0 a 5, sendo: 0, planta sem sintoma; 1, presença de pequenas manchas angulares nos folíolos; 2, aparecimento de lesões do tipo requeima nos folíolos, e murcha de folhas; 3, exsudação de goma nos pecíolos,

murcha e queda de folhas; 4, lesões necróticas nas hastes, com ou sem exsudação de goma, murcha de folha, desfolhamento parcial e morte dos brotos apicais e 5, presença de grandes lesões necróticas nas hastes, intenso desfolhamento, morte acentuada de hastes, ou, ainda morte total da planta.

3.4 ELETROFORESE PARA A ISOENZIMA ESTERASE

3.4.1 Obtenção do Extrato Protéico

O processo de obtenção do extrato protéico partiu de isolados cultivados em meio nutriente amido, a 28 °C por 72 horas.

A massa bacteriana, cerca de 5 g, foi coletada por meio de uma espátula estéril e colocada em tubos para centrífuga contendo 100 mL de tampão Tris-HCl 0,5M (pH 6,9) (constituído de 74,75 g de Tris base e q.s.p. 1000 mL).

As bactérias foram centrifugadas com o tampão a 5.000 x *g* por 20 minutos, a 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e realizada nova lavagem com 50 mL do mesmo tampão e nova centrifugação a 5.000 x *g* por 20 min.

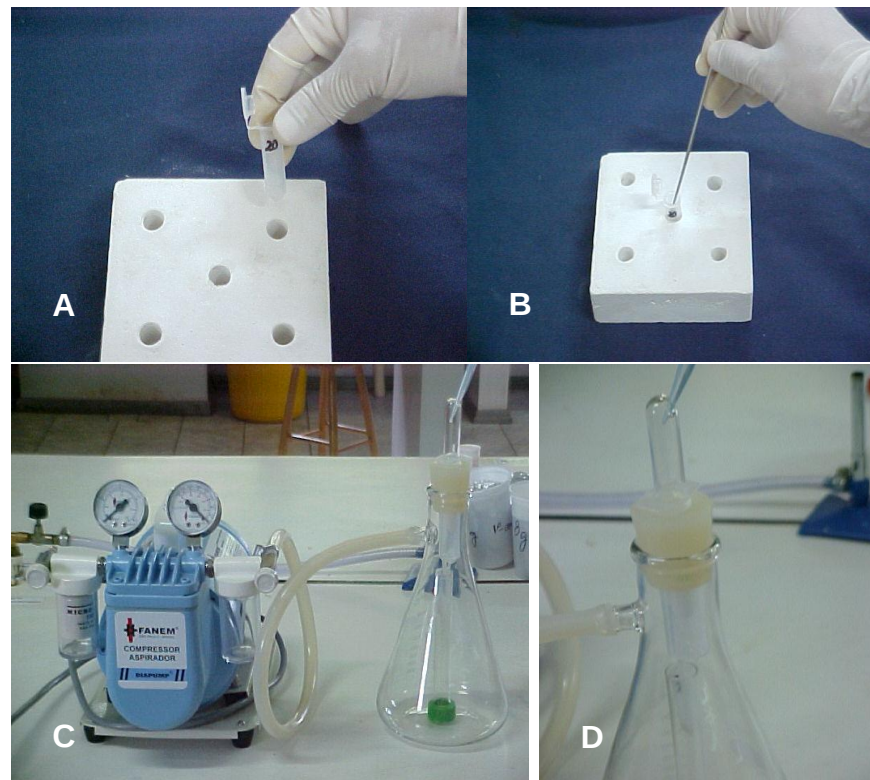
Para cada isolado, foram coletadas 300 mg das células obtidas na centrifugação, as quais foram colocadas em tubos ependorfe e mantidas em freezer por 10 min até o completo congelamento. Em seguida, esses tubos, foram repassados para placas de gesso, previamente mantidas no freezer, as quais apresentavam cavidades para acoplamento dos ependorfes, com a finalidade de manter condições de temperaturas próximas a 4 °C (**Figura 6A**).

As células bacterianas foram rompidas utilizando-se areia fina, obtida através de peneiramento em malha de 48 mesh. A proporção de areia/massa de células foi de v:v. Realizou-se a maceração por 10 min com o auxílio de bastões de aço com extremidades abauladas (**Figura 6B**). Após 5 min de maceração, foram adicionados 0,5 mL da solução extratora da amostra (**Apêndice 1**) e, após completar os 10 min de maceração, foi adicionado mais 1,0 mL de solução extratora.

O macerado obtido permaneceu no tubo por 15 min para que ocorresse completa decantação da areia, sendo então o extrato repassado para outro ependorfe e adicionado mais 0,5 mL da solução extratora. Em seguida, foi realizada nova centrifugação durante 20 min a 5000 x *g* e o sobrenadante foi filtrado em

membrana milipore (0,45 μm de diâmetro de poro), com o objetivo de remover células e restos de parede celular da bactéria provenientes do processo de maceração do extrato.

O aparato no qual foi realizada a filtração consistiu de uma seringa de 20 mL adaptada em uma rolha de silicone acoplada a um kitasatto, e este conectado a uma bomba de vácuo. Na seringa foi retirado o êmbolo e no local colocado a membrana com auxílio de um tubo de ensaio. Este tubo possuía um orifício por onde a amostra era injetada. O extrato foi coletado novamente em ependorfe (**Figuras 6C e 6D**), mantido à 4 °C e usado no processo de eletroforese após a determinação da quantidade de proteínas totais.



Fonte: do autor

Figuras 6. Etapas do processo de obtenção do extrato protéico: A) ependorfe com 300 mg de células bacterianas; B) processo de maceração; C) e D) detalhes da filtração da amostra.

3.4.2 Dosagem de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais, no extrato obtido para cada isolado, foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976). Para cada 2,4 mL de amostra

(2,2 mL de solução extratora e 0,2 mL do extrato) adicionou-se, sob agitação, 0,6 mL de reagente concentrado de Bradford. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm. Como referência foram utilizados 2,4 de solução extratora da amostra e 0,6 mL de reagente concentrado de Bradford.

A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) por mL de amostra (μg proteína . mL^{-1}) foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 μg . mL^{-1} (**Apêndice 2**).

3.4.3 Preparo do Gel e Eletroforese

Para a análise eletroforética, foi utilizado gel nativo de poliacrilamida 4% (gel concentrador) e 10% (gel separador) (**Apêndice 1**), segundo metodologia proposta por Alfenas & Brune (1998).

O gel separador foi aplicado na moldura do gel entre as placas de vidro até a altura de 1,5 cm abaixo da extremidade inferior do pente. Em seguida, foi adicionada água para uniformização da parte superior do gel e proteção contra o oxigênio. Após a polimerização, a água foi removida com papel-filtro e, em seguida, houve a aplicação, sob o gel polimerizado, da solução do gel empilhador. O pente foi posto no gel para formação das cavidades. As cavidades foram enxaguadas com solução tampão do tanque (**Apêndice 1**) e o excesso de tampão foi removido das cavidades com auxílio de papel-filtro.

Nas cavidades formadas no gel foram aplicadas, cuidadosamente, alíquotas do extrato protéico dos isolados de forma individual por cavidade, que apresentavam a mesma concentração de proteína total por mL. Nas extremidades do gel foram aplicados 20 μL do marcador de corrida azul-de-bromofenol e também o isolado 24 que foi tomado como padrão para todos os géis.

A quantidade de amostra a ser aplicada foi em função da concentração de proteína. Os volumes variaram de 20 a 38 μL do extrato. Foram utilizadas concentrações em torno de 35 μg de proteína por μL para os extratos de cada isolado bacteriano.

Os volumes das cavidades foram completados com solução tampão do tanque diluída (1:10) e adicionada, respectivamente, nos tanques superior e inferior 100 e 300 mL dessa mesma solução. O aparelho foi calibrado para 100 V até que a linha frontal de azul-de-bromofenol atingiu o gel separador, quando então, o aparelho foi regulado para 200 V e mantido nesta voltagem até o fim da corrida, realizada a 4 °C.

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente repassado para solução tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,9, em bandeja plástica sob agitação, onde foi realizada uma primeira lavagem. O tampão foi removido e adicionado solução corante para esterase (**Apêndice 1**), descrita por Brune & Alfenas (1998), e o gel incubado por 30 min a 30 °C.

Com as bandas da esterase já coradas, descartou-se a solução corante e adicionou-se a solução para descolorir o gel (**Apêndice 1**). O gel foi envolto por papel celofane, previamente umedecido em solução secadora (**Apêndice 1**) e colocado sobre placa de vidro plana, evitando-se a formação de bolhas. O gel foi mantido a uma temperatura de 15 °C durante 24 h até completa secagem (**Figura 7**).



Fonte: do autor

Figura 7. Aparência do gel durante a secagem.

Após a completa desidratação o gel foi arquivado para posterior comparação dos resultados.

3.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética foi verificada pela avaliação qualitativa para a presença ou ausência de bandas para esterase nos géis de poliacrilamida. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o coeficiente de Jaccard (S_j). O dendrograma foi obtido utilizando-se o algoritmo UPGMA (Método de Pares de Grupos não Balanceados com Média Aritmética) a partir do programa NTSYS – PC, versão 1.7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLADOS DE *X. AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

Foram obtidos, mediante coletas direcionadas em áreas com o cultivo da mandioca, 61 materiais com sintomas semelhantes aos causados pela bacteriose (**Tabela 2**), e, para comparação, foram incluídos os isolados 9A e 9B, já identificados como *X. axonopodis* pv. *manihotis* e fornecidos pelo Dr. Antônio Carlos Maringoni, da Faculdade de Ciências Agrônômicas (UNESP – Botucatu/SP).

Do total de amostras coletadas, obtiveram-se 19 isolados bacterianos de diferentes variedades da cultura, sendo que, o número de isolados por município refletiu indiretamente o comportamento da bacteriose, quanto ao grau de contaminação de material vegetal propagativo, durante o período da coleta (**Tabela 3**).

Observou-se que a ocorrência da bacteriose foi maior quando se tratou de variedades de mesa (9 amostras), seguidas pelas variedades para indústria Fécula Vermelha (5), Fécula Branca (4) e Verdinha (1), representando, quando comparado ao total coletado de cada variedade 47,4%, 33,3%, 28,6% e 25% de material com a presença da bactéria, respectivamente.

Estes resultados concordam com trabalhos que indicam que as variedades de mesa são mais suscetíveis a bacteriose, enquanto que variedades industriais são mais resistentes (Takahashi & Gonçalo, 2001).

Tabela 2. Municípios amostrados, variedades de mandioca e resultados quanto à presença e/ou ausência de *X. axonopodis* pv. *manihotis* em amostras coletadas nos municípios de abrangência do trabalho

Registro	Município	Variedade	Identificação
01	Nova Santa Rosa	Verdinha	Ausência
02	Nova Santa Rosa	Olho Junto	Ausência
03	Pato Bragado	Verdinha	Ausência
04	Marechal Cândido Rondon	Fécula Branca	Ausência
05	Pato Bragado	Fécula vermelha	Ausência
06	Pato Bragado	Fécula vermelha	Ausência
07	Missal	Fécula branca	Ausência
08	Marechal Cândido Rondon	Fécula branca	Ausência
09	Pato Bragado	Espeto	Ausência
10	Missal	Espeto	Ausência
11	Pato Bragado	Fécula vermelha	Ausência
12	Missal	De mesa	Ausência
13	Pato Bragado	Fécula vermelha	Ausência
14	Pato Bragado	Espeto	Ausência
15	Pato Bragado	Verdinha	Ausência
16	Pato Bragado	Fécula branca	Ausência
17	Entre Rios do Oeste	De mesa	Ausência
18	Mercedes	Cascuda	Ausência
19	Mercedes	Cascuda	Ausência
20	Mercedes	Cascuda	Ausência
21	Mercedes	Fécula vermelha	Ausência
22	Mercedes	Fécula vermelha	Ausência
23	Mercedes	Fécula vermelha	Ausência
24	Mercedes	Fécula branca	Presença da bactéria
25	Mercedes	Fécula branca	Ausência
26	Mercedes	Fécula branca	Ausência
27	Mercedes	Soglo	Ausência
28	Mercedes	Africana	Ausência
29	Entre Rios do Oeste	De mesa	Ausência
30	Entre Rios do Oeste	De mesa	Ausência
31	Entre Rios do Oeste	De mesa	Presença da bactéria

Tabela 2, Cont.

32	Entre Rios do Oeste	De mesa	Presença da bactéria
33	Entre Rios do Oeste	Fécula vermelha	Ausência
34	Entre Rios do Oeste	Fécula vermelha	Ausência
35	Entre Rios do Oeste	Fécula vermelha	Ausência
36	Entre Rios do Oeste	Fécula branca	Presença da bactéria
37	Entre Rios do Oeste	Fécula branca	Ausência
38	Entre Rios do Oeste	Fécula branca	Ausência
39	Marechal Cândido Rondon	Fécula branca	Presença da bactéria
40	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Ausência
41	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Presença da bactéria
42	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Ausência
43	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Ausência
44	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Presença da bactéria
45	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Ausência
46	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Ausência
47	Nova Santa Rosa	De mesa	Presença da bactéria
48	Nova Santa Rosa	De mesa	Presença da bactéria
49	Nova Santa Rosa	De mesa	Presença da bactéria
50	Nova Santa Rosa	De mesa	Ausência
51	Nova Santa Rosa	Fécula branca	Presença da bactéria
52	Nova Santa Rosa	Fécula branca	Ausência
53	Nova Santa Rosa	Fécula branca	Ausência
54	Nova Santa Rosa	Fécula vermelha	Presença da bactéria
55	Nova Santa Rosa	Fécula vermelha	Presença da bactéria
56	Nova Santa Rosa	Fécula vermelha	Presença da bactéria
57	Pato Bragado	Verdinha	Presença da bactéria
58	Marechal Cândido Rondon	Fécula vermelha	Presença da bactéria
59	Marechal Cândido Rondon	Fécula vermelha	Presença da bactéria
60	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Presença da bactéria
61	Marechal Cândido Rondon	De mesa	Presença da bactéria
9A	Estado de São Paulo	—	Presença da bactéria
9B	Estado de São Paulo	—	Presença da bactéria

Tabela 3. Incidência de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, em amostras de mandioca coletadas em municípios da região oeste do Paraná

Município	Total de amostras	Total de isolados	Incidência (%)
Entre Rios do Oeste	11	3	27,3
Nova Santa Rosa	12	7	58,3
Pato Bragado	10	1	10
Mercedes	11	1	9,1
Mal. Cândido Rondon	14	7	50
Missal	3	0	0
Total	61	19	31,2

A relação entre maior ou menor severidade a uma variedade pode estar ligada a maiores ou menores concentrações de ácido cianídrico presentes na planta. Isto poderia explicar, em parte, o porque de variedades de mesa apresentarem maior suscetibilidade à doença. Por outro lado, uma variação do patógeno também pode estar diretamente envolvida no processo doença, tornando-se importante o mapeamento ou ao menos, a verificação da relação entre diferentes variedades da cultura e variações do agente causal da doença.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DE AMIDO

Os resultados, quanto à atividade amilolítica, permitiram a separação dos 21 isolados em seis grupos (**Tabela 4**). O isolado 39 apresentou a menor média da relação consumo de amido e crescimento da colônia, enquanto o isolado 51 apresentou a maior média.

Resultados semelhantes foram descritos por Alves & Takatsu (1984), avaliando a capacidade de hidrólise de amido de 32 isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* provenientes de diferentes regiões do Brasil, incluindo isolados do Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Colômbia. Estes autores verificaram, entre os isolados, uma grande variabilidade na atividade amilolítica, encontrando isolados com alta atividade e outros com atividade quase indetectável após 48 h de incubação.

Tabela 4. Capacidade de hidrólise de amido, em meio nutriente-amido, de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* obtidos de ramas de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná

Isolados	Procedência ¹	Médias ² (cm)
51	NSR	2,40 a ³
31	ERO	2,07 ab
47	NSR	2,00 bc
41	MCR	1,99 bc
44	MCR	1,96 bc
60	MCR	1,89 bcd
32	ERO	1,86 bcde
56	NSR	1,86 bcde
54	NSR	1,76 bcde
48	NSR	1,73 bcde
57	PTB	1,71 bcde
61	MCR	1,68 cde
9B	SP	1,67 cde
24	MER	1,66 cde
49	NSR	1,66 cde
55	NSR	1,66 cde
58	MCR	1,57 de
36	ERO	1,55 de
9A	SP	1,51 de
59	MCR	1,50 e
39	MCR	1,10 f
C.V. (%)		8,00
Média geral		1,68

¹ Municípios de Entre Rios do Oeste (ERO), Marechal Cândido Rondon (MCR), Mercedes (MER), Nova Santa Rosa (NSR), Pato Bragado (PBR) e Estado de São Paulo (SP).

² Médias calculadas por $dc + dh/dc$ sendo que dc = diâmetro da colônia e dh = diâmetro da área hidrolisada.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ATRAVÉS DA AGRESSIVIDADE

Os 21 isolados apresentaram diferenças na agressividade. Para avaliações realizadas nas folhas, os resultados permitiram a separação em três grupos (**Tabela**

5). Quanto à comparação de médias, os valores em termos de agressividade indicam que os isolados 44, 60, 61, 55, 57 e 58 diferiram significativamente dos isolados 31, 32, 39, 48 e 51, os quais foram menos agressivos.

Tabela 5. Agressividade de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, obtidos de ramas de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná

Isolados	Procedência ¹	Agressividade ²	Exsudação ⁴
44	MCR	3,0 a ³	+
60	MCR	3,0 a	+
61	MCR	3,0 a	+
55	NSR	2,7 a	+
57	PTB	2,5 a	+
58	MCR	2,5 a	+
24	MER	2,2 ab	+
9A	SP	2,0 abc	+
9B	SP	2,0 abc	+
36	ERO	2,0 abc	+
41	MCR	2,0 abc	+
49	NSR	2,0 abc	+
54	NSR	2,0 abc	+
59	MCR	2,0 abc	+
47	NSR	1,2 bc	+
56	NSR	1,2 bc	+
31	ERO	1,0 c	-
32	ERO	1,0 c	-
39	MCR	1,0 c	+
48	NSR	1,0 c	-
51	NSR	1,0 c	-
C.V. (%)			21.00
Média geral			1.93

¹ Municípios de Entre Rios do Oeste (ERO), Marechal Cândido Rondon (MCR), Mercedes (MER), Nova Santa Rosa (NSR), Pato Bragado (PBR) e Estado de São Paulo (SP).

² Valores obtidos mediante escala de notas variando de 0 (folíolo sem sintomas) a 3 (folíolo totalmente necrosado) a partir de folhas inoculadas com os isolados bacterianos.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%.

⁴ Exsudação de pus bacteriano em ramos de mandioca (+: presença; -: ausência).

Para a avaliação nas plantas, o comportamento foi praticamente idêntico, sendo que apenas os isolados 31, 32, 48 e 51 não apresentaram exsudação bacteriana nos ramos.

O uso do método de inoculações em folhas e uso da escala de notas apresentou os melhores resultados por apresentar maior sensibilidade na distinção dos sintomas da doença, quando comparado às inoculações no caule.

Trabalho semelhante, conduzido por Alves & Takatsu (1984), no entanto, não se demonstrou eficiente. Segundo os autores, o método de inoculação em folhas de mandioca mostrou-se inadequado para distinção de isolados quanto à agressividade devido à variação nos sintomas apresentados.

A comparação dos resultados para o ensaio que avaliou a capacidade da hidrólise de amido com aqueles da agressividade dos isolados, não demonstrou correlação, o que pode ser observado quando são comparadas as médias de atividade amilolítica dos isolados 39 e 51 e sua agressividade respectivamente, concordando com resultados obtidos por Alves & Takatsu (1984).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA ESTERASE

A variabilidade entre os isolados de *X. axonopodis* pv *manihotis* foi evidenciada pelas diferenças no número e mobilidade relativa das bandas de esterase dos 21 isolados. Os perfis de esterase dos isolados apresentaram de três a oito bandas, enquanto que, os valores da mobilidade relativa (MR) variaram de 0,06 a 1,00 (**Figura 8**).

Para a comparação dos isolados bacterianos através do padrão esterásico, foi realizada análise qualitativa, para presença de bandas, indicada pelo valor 1, e ausência de bandas, indicada pelo valor 0, que inicialmente partiu de uma matriz retangular (**Apêndice 3**), permitindo a obtenção de uma matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard (S_J) (**Apêndice 4**).

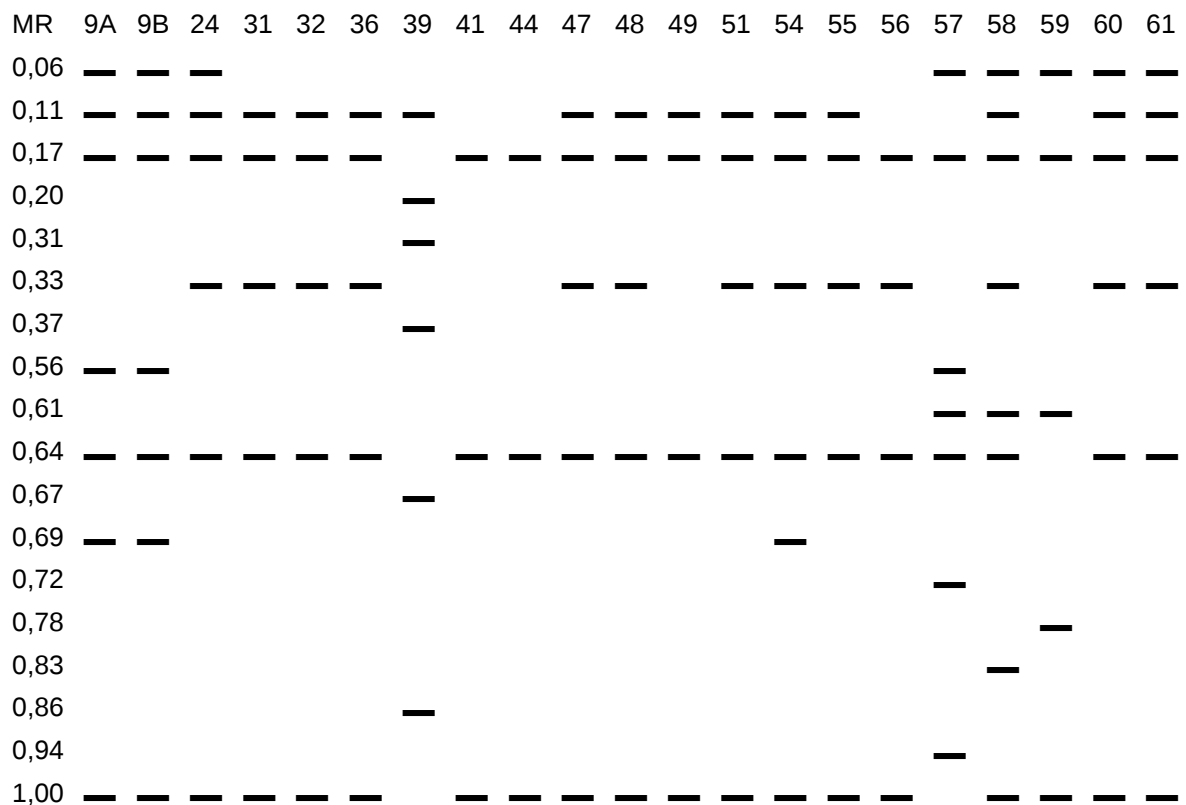


Figura 8. Representação das bandas de α e β – esterase, obtidas pelo processo eletroforético para os 21 isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, e mobilidade relativa (MR) para cada banda (—) da enzima.

Após a obtenção da matriz de similaridade foi realizado o agrupamento dos isolados utilizando-se o algoritmo UPGMA para a construção do dendrograma. Analisando a topologia do dendrograma para a esterase, os isolados foram separados em 12 grupos (**Figura 9**).

Os isolados provenientes de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes apresentam, entre si, alto grau de similaridade. Os isolados provenientes de Marechal Cândido Rondon estão distribuídos em diferentes agrupamentos e alguns, como os dos grupos L e M, possuem menores valores de similaridade com os isolados coletados em outras regiões. Os isolados obtidos em Botucatu/SP apresentam em torno de 51% de similaridade com os isolados provenientes do Paraná.

Estes resultados, associados aos de agressividade e capacidade amilolítica, indicam haver diferenciação entre os isolados da bactéria presentes nos municípios amostrados na região Oeste do Paraná.

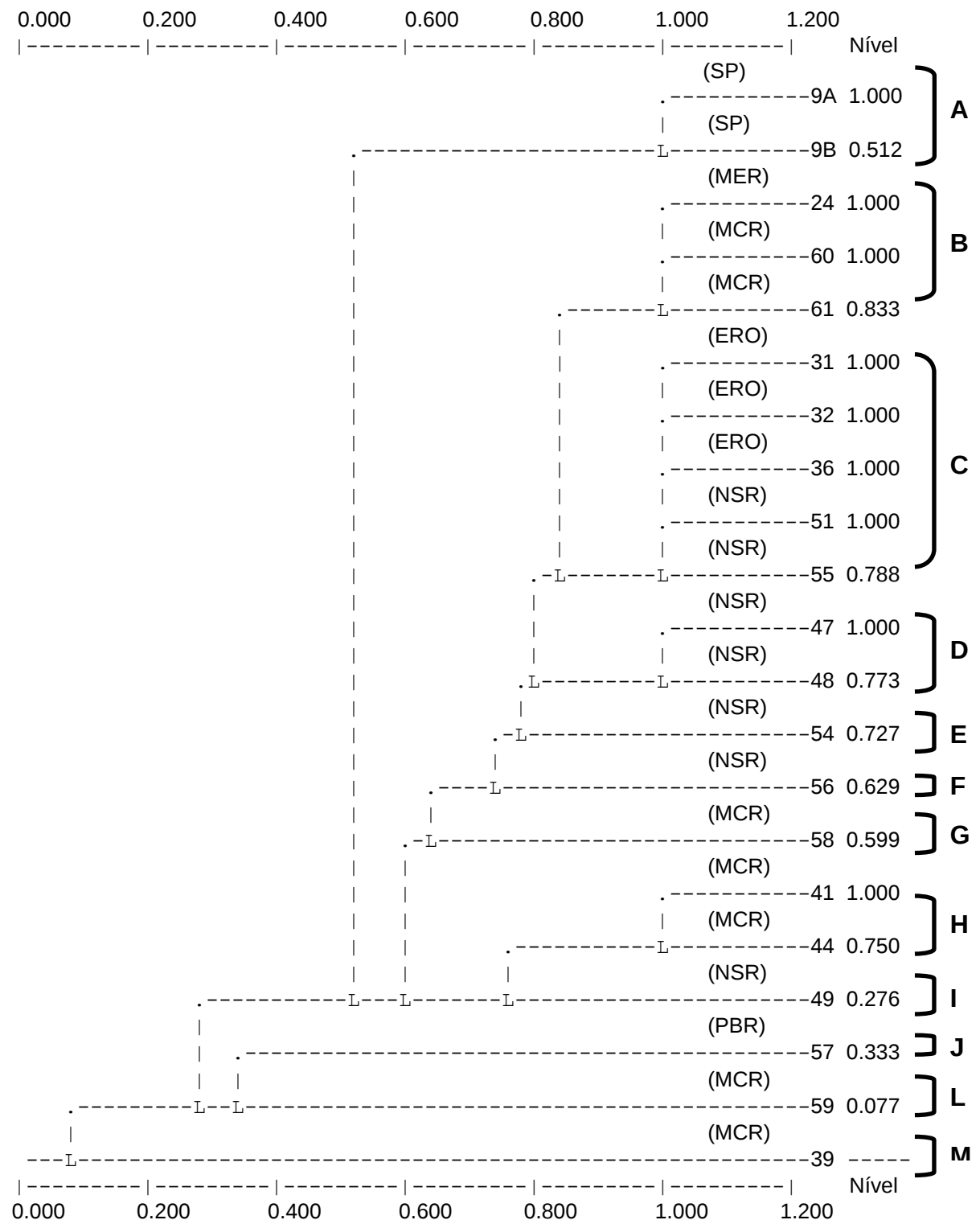


Figura 9. Dendrograma gerado pelo método UPGMA representando a distância genética, tomando como parâmetro a atividade esterásica entre os isolados. Municípios de Entre Rios do Oeste (ERO), Marechal Cândido Rondon (MCR), Mercedes (MER), Nova Santa Rosa (NSR), Pato Bragado (PBR) e Estado de São Paulo (SP).

5 CONCLUSÕES

- a) Os dados obtidos na região Oeste do Paraná, durante a coleta de ramas de mandioca, indicaram que materiais provenientes de variedades de mesa apresentam maior incidência de *X. axonopodis* pv. *manihotis* em relação às variedades industriais;
- b) Os dados de atividade amilolítica e agressividade permitiram a distinção entre os isolados bacterianos. No entanto, não foi verificada relação entre essas características;
- c) As maiores incidências da bacteriose ocorreram nos municípios de Nova Santa Rosa e Marechal Cândido Rondon, sendo que neste último, estão presentes os isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* de maior agressividade;
- d) Os perfis eletroforéticos para a isoenzima esterase permitiram a detecção de variações entre isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, havendo alto grau de similaridade entre aqueles provenientes de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes.

6 REFERÊNCIAS ¹

ALFENAS, A.C., BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 151-182.

ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., ALONSO, S.K., SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 85-113.

ALVES, M.L.B. & TAKATSU, A. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 9, 1984. p. 485- 494.

AMARAL, J.F. Caracteres bioquímicos do *Xanthomonas manihotis* e *X. rubrisubalbicans* e suas posições na chave de Burkholder (*Schizomicetes, Pseudomonadaceae*) **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 25, 1958. p. 67-72.

BAHIA, Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. **Cultura – Mandioca**. Disponível em: <<http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/Mandioca.htm#Botânica/Descrição/Variedades>> Acesso em: 16 maio 2001.

BONDAR, G. Uma nova moléstia bacteriana das hastes da mandioca. **Chácaras e quintaes**. v. 5, 1912. p. 15-18.

BONDAR, G. Moléstia bacteriana da mandioca. *Boletim de Agricultura*, São Paulo. v. 16, 1915. p. 513-524.

¹ Referências conforme Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas – Curitiba: Editora da UFPR, 2000 72p. (Normas para apresentação de documentos científicos; 6)

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, 1976. p. 248-254.

BRUNE, W; ALFENAS, A.C. Identificação de proteínas em gel. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 183-197.

CONCEIÇÃO, A.J. **Moléstias da mandioca** (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas, UF-BA/BRASCAN NORDESTE.1973.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 405-473.

ELANGO, F. & LOZANO, J.C. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of Cassava Bacterial Blight. **Fitopatologia Brasileira**. v. 6, 1981. p. 57-65.

EL-SHARKAWY, T.A.; HUISINGH, D. Identification of *Xanthomonas* species by acrilamida-gel disc electrophoresis of soluble bacterial proteins. **Phytopathology**. v. 58, 1968. 1049, (abstr.).

EL-SHARKAWY, T.A.; HUISINGH, D. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrilamida gel electrophoresis of soluble proteins. **Journal of Genetic Microbiology**. v. 68, 1971. p. 155-165.

FRESCO, L. Cassava in shifting cultivation: a systems approach to agricultural technology development in África. Amsterdam: Ed. Royal Tropical Institute, 1986. p. 168-170.

FUNDETEC – Fundação para o desenvolvimento científico e tecnológico. Projeto estratégico de desenvolvimento agroalimentar. Cascavel: Ed. EDUNIOESTE. 2000. 2. ed. 145 p.

GROXKO, M. **Mandioca**. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/seab/mandioca.pdf>> Acesso em: 24 junho 2002.

HENAIN, A. E.; CENOZ, H. M. La mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). Corrientes: Apuntes, n. 12 - Departamento de produccion vegetal. 1971. p. 1 - 9.

IKOTUN, T. Studies on the host range of *Xanthomonas manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 6, 1981. p. 15-21.

JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. Ed. **Chemical methods in bacterial systematics**. London, Academic Press. 1985. p.115-128.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, 1970. p. 969-976.

KESTERS, K. Numerical methods in the classification and Identification of bacteria by electrophoresis. In: GOODFELLOW, M.; JONES, D.; PRIEST, F.G. Ed. **Computer-assisted bacterial systematics**. London, Academic Press. 1985. p.337-368.

KESTERS, K. Polyacrylamide gel electrophoresis of bacterial proteins. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. **Methods in phyto bacteriology**. Budapest, Akadémia kiadó. 1990. p.1991-1998.

KESTERS, K.; DE LEY, J. Classification and Identification of bacteria by electrophoretic of their protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; BOARD, R.G. Ed. **Microbial Identification and classification**. London, Academic Press. 1980. p.237-297.

KIMATI, H. Controle químico In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v. 1, 1997. p. 761-785.

KIMURA, O.; DIANESE, J.C. Caracterização protéica e isoenzimática das patovares de *Xanthomonas campestris* que atacam a mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 18, n.11, 1983. p. 1215-1228.

KRIEG, N.R. Identification of bacteria. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., Ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore. v.1, 1984.

LAVINA, M.L.; MIURA, L. **Cadeia produtiva da mandioca**. Itajaí, S.C., EPAGRI. 1995. 32p.

LOPES, C. A. Controle de fitobacterioses. **Fitopatologia Brasileira**. v. 23 (suplemento), 1998. p. 202-203.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: Etiology. **Phytopathology**. v. 64, 1974a. p. 74-82.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: epidemiology and control. **Phytopathology**. v. 64, 1974b. p. 83-88.

LOZANO, J.C. & BOOTH, R.H. Enfermedades de la yuca. In: Dominguez, C.E. Ed. **Yuca: investigacion, producción y utilización**. Cali, Programa Yuca. Ciat/pnud. 1982. p.421-461.

MANDARINO, J.M.G. & VIDAURRE, T.J.C. **Técnicas eletroforéticas**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 1995. 36p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 86).

MARTINEZ, A.A. & PRATES, H.S. **A bacteriose da mandioca**. Campinas, CATI. 1983. 9p. (Boletim técnico, 173).

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2000. p. 67-108.

MASSOLA, N. S. J. & BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca, In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v. 2, 1997. p. 501-510.

MIURA, L.; FROSI, J. F.; MONDARDO, E.; TERNES, M. Seleção de germoplasma de mandioca resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 25, n. 8, 1990. p. 1209-1214.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) - Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: Grandes culturas**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília – DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. v. 2, 1997. p. 791-814.

OLIVEIRA, J. R.; SCORTICHINI, M. Proteínas na taxonomia e na genética de fitobactérias. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 513-520.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L. de; ALFENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas de microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. Doenças da cultura da mandioca, In: DUARTE, M. de L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro – Plantas industriais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. v. 1, 1999. p. 139-157.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTMAN, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied Environmental Microbiology**. v. 51, 1986. p. 873-884.

SEAB/DERAL. Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento/ Departamento de Economia Rural. **Aspectos da agropecuária paranaense**. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/seab/aspectos/mandioca.html>> Acesso: maio 2002.

SILVA, J. R. da; ASSUMPÇÃO, R. de; VEGRO, C. L. R. **Produção de Raiz de Mandioca**. Sebrae – SP. Disponível em: <http://www.sebraesp.com.br/sebrae/sebraenovo/Cad_Pro/Mandioca/raiz.asp> Acesso em: 16 maio 2001.

STOLP, H.; STARR, M.P.; BAIGENT, N.L. Problems in the speciation of phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. **Annual Review Phytopathology**. v. 3, 1965. p. 231-269.

TAKAHASHI, M. & GONÇALO, S. **A cultura da mandioca**. Paranaíba, PR: Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, 2001. 88 p.

THAVEECHAI, N.; SCHAAD, N.W. Serological and electrophoresis analysis of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. **Phytopathology**. v. 76, 1986. p. 139-147.

VERDIER, V.; DONGO, P.; BOHER, B. & CHEVRIER, D. Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strains, causal agent of cassava bacterial blight. In: Roca, W.M. & Thro, A.M. eds. **International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network**. Cartagena, Colombia, 1992. Proceedings... Cali, CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1993. p. 69-74 (Working Document, 123).

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**. v. 75, n. 9, 1996. p. 721-761.

APÊNDICES

Apêndice 1. Preparo das soluções para a análise eletroforética².

Bis-Acrilamida (solução estoque 30%)

Acrilamida.....	87,60 g
Bis-Acrilamida.....	2,40 g
Água destilada (q.s.p.).....	300 mL

Tampão do gel separador ou de corrida Tris-HCL pH 8,9

Tris base.....	45,75 g
Água destilada (q.s.p.).....	100 mL

* O pH 8,9 foi ajustado com ácido clorídrico concentrado.

Tampão do gel empilhador Tris-HCL 0,5 M, pH 6,9

Tris base.....	7,475 g
Água destilada (q.s.p.).....	100 mL

* O pH 6,9 foi ajustado com ácido clorídrico concentrado.

Gel separador (10%)

Água destilada.....	3,350 mL
Tris-HCl 0, 5 M (pH 8,9).....	2,777 mL
Bis-Acrilamida.....	3,706 mL
TEMED.....	3 µL
Persulfato de amônio (32 mg . mL ⁻¹).....	0,167 mL

Gel separador (4%)

Água destilada.....	3,500 mL
Tris-HCl 0, 5 M (pH 6,9).....	0,500 mL
Bis-Acrilamida.....	0,750 mL
TEMED.....	5 µL
Persulfato de amônio (32 mg . mL ⁻¹).....	0,285 mL

Tampão do tanque (10 vezes)

Tris base.....	7,5 g
Glicina.....	36,0 g
Água destilada (q.s.p.).....	1000 mL

Solução extratora ou da amostra (para proteínas nativas)

Glicerol.....	5,0 mL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,9.....	2,5 mL
Água destilada (q.s.p.).....	25,0 mL

² Continua na próxima página

Solução corante da esterase

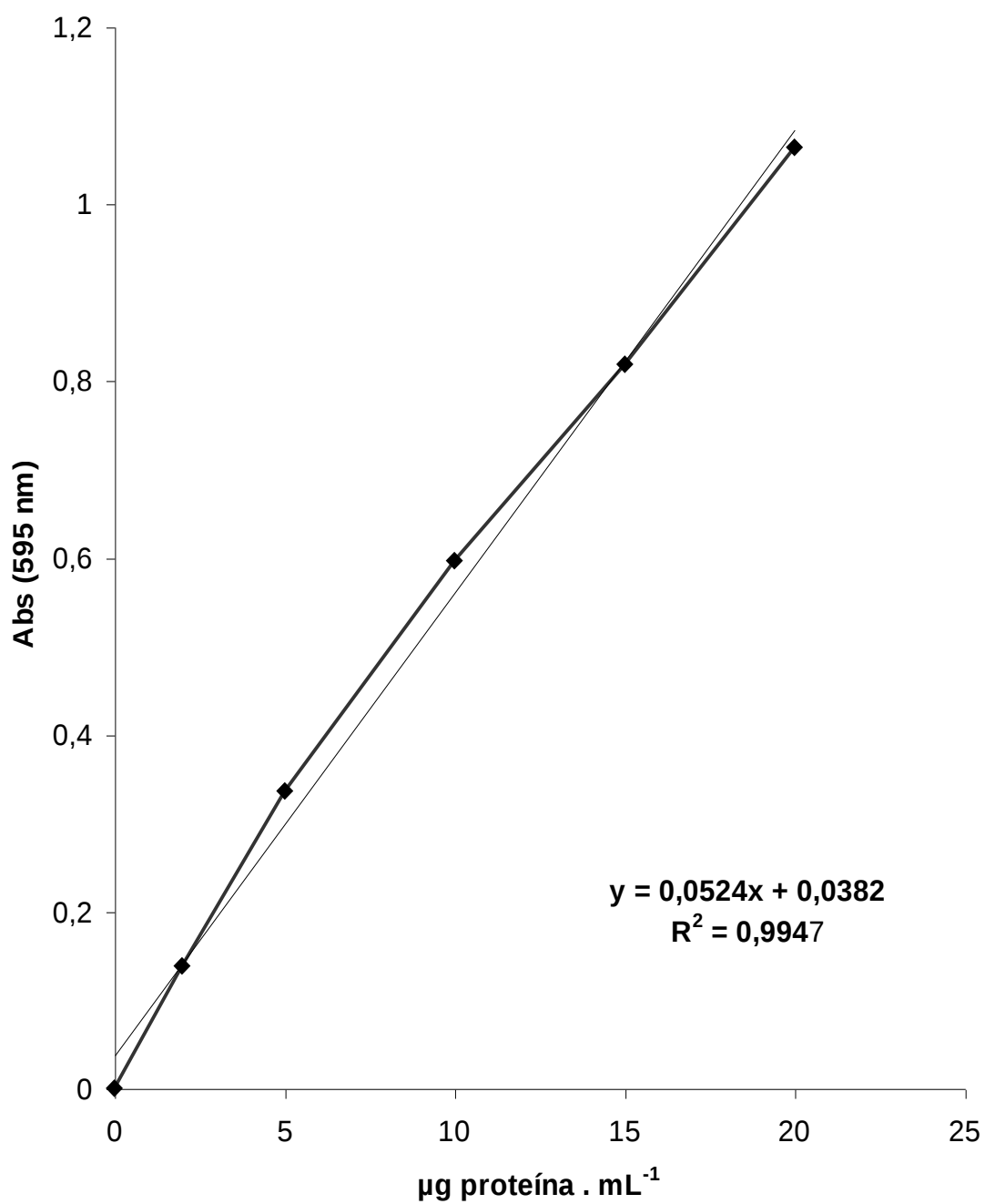
Tampão Tris HCl 0,5 M, pH 7,1.....	5,0 mL
Fast blue RR salt.....	50,0 mg
Solução estoque α e β - naftil acetato ($1\text{g} \cdot 100\text{ mL}^{-1}$).....	1,5 mL
Água destilada.....	43,5 mL

Solução descorante

Etanol absoluto.....	300 mL
Ácido acético glacial.....	50 mL
Água destilada (q.s.p.).....	650 mL

Solução secadora

Glicerina.....	30 mL
Metanol.....	400 mL
Água destilada (q.s.p.).....	600 mL

Apêndice 2. Curva padrão para determinação da concentração de proteínas totais.

Apêndice 3. Matriz retangular com dados originais, onde (1) indica presença de banda e (0) ausência de banda.

9A	9B	24	31	32	36	39	41	44	47	48	49	51	54	55	56	57	58	59	60	61
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

Apêndice 4. Matriz de similaridade para os isolados, utilizando o coeficiente de Jaccard.

9A	9B	24	31	32	36	39	41	44	47	48	49	51	54	55	56	57	58	59	60	61
1.000																				
1.000	1.000																			
0.625	0.625	1.000																		
0.500	0.500	0.833	1.000																	
0.500	0.500	0.833	1.000	1.000																
0.500	0.500	0.833	1.000	1.000	1.000															
0.091	0.091	0.100	0.111	0.111	0.111	1.000														
0.429	0.429	0.500	0.600	0.600	0.600	0.000	1.000													
0.429	0.429	0.500	0.600	0.600	0.600	0.000	1.000	1.000												
0.444	0.444	0.714	0.833	0.833	0.833	0.100	0.500	0.500	1.000											
0.444	0.444	0.714	0.833	0.833	0.833	0.100	0.500	0.500	1.000	1.000										
0.571	0.571	0.667	0.800	0.800	0.800	0.125	0.750	0.750	0.667	0.667	1.000									
0.500	0.500	0.833	1.000	1.000	1.000	0.111	0.600	0.600	0.833	0.833	0.800	1.000								
0.625	0.625	0.714	0.833	0.833	0.833	0.100	0.500	0.500	0.714	0.714	0.667	0.833	1.000							
0.500	0.500	0.833	1.000	1.000	1.000	0.111	0.600	0.600	0.833	0.833	0.800	1.000	0.833	1.000						
0.375	0.375	0.667	0.800	0.800	0.800	0.000	0.750	0.750	0.667	0.667	0.600	0.800	0.667	0.800	1.000					
0.400	0.400	0.300	0.200	0.200	0.200	0.000	0.250	0.250	0.182	0.182	0.222	0.200	0.182	0.200	0.222	1.000				
0.500	0.500	0.750	0.625	0.625	0.625	0.083	0.375	0.375	0.556	0.556	0.500	0.625	0.556	0.625	0.500	0.364	1.000			
0.333	0.333	0.375	0.250	0.250	0.250	0.000	0.333	0.333	0.222	0.222	0.286	0.250	0.222	0.250	0.286	0.333	0.444	1.000		
0.625	0.625	1.000	0.833	0.833	0.833	0.100	0.500	0.500	0.714	0.714	0.667	0.833	0.714	0.833	0.667	0.300	0.750	0.375	1.000	
0.625	0.625	1.000	0.833	0.833	0.833	0.100	0.500	0.500	0.714	0.714	0.667	0.833	0.714	0.833	0.667	0.300	0.750	0.375	1.000	1.000