

Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Roberto Luis Portz¹, Odair José Kuhn², Gilmar Franzener³ e José Renato Stangarlin^{3*}

¹Programa de Pós-graduação, Technische Universität München, Life Science Center, Phytopathology of Woody Plants, Freising, Alemanha. ²Programa de Pós-graduação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós (Esalq/Usp); ³Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Rua Pernambuco, 1777, Cx. Postal 1008, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: jrstangarlin@unioeste.br

RESUMO. A bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) é a doença de maior importância econômica na cultura da mandioca. Para estudar a variabilidade genética desta bactéria no Oeste do Paraná, foram realizados levantamentos em Entre Rios do Oeste, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa e Pato Bragado. Os isolados foram caracterizados em relação à atividade de amilase, α e β -esterase e agressividade. Dos 61 materiais vegetais coletados, obtiveram-se 19 isolados da bactéria, com maior incidência para variedades de mesa em relação àqueles 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 Nova Santa Rosa (58%). Os isolados foram agrupados em cinco, seis e 12 grupos em relação à capacidade amilolítica, agressividade e isoenzimas de esterase, respectivamente. Não houve relação entre atividade de amilase e agressividade. Isolados de Marechal Cândido Rondon foram mais agressivos que os provenientes das outras regiões. O agrupamento com base em esterase permitiu verificar que isolados provenientes de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes apresentaram alto grau de similaridade. Estes resultados indicam haver diferenciação entre os isolados da bactéria presentes nos municípios amostrados.

Palavras chave: *Manihot esculenta*, mandioca, bacteriose, esterase.

ABSTRACT. Characterization of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. The bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) is the most important disease of cassava. To study the genetic variability of pathogen in the West of Paraná, a research was carried out at Entre Rios do Oeste, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa and Pato Bragado. The isolates were characterized to amylase activity, α and β -esterase and aggressiveness. From 61 collected materials, were obtained 19 bacterial isolates, with larger incidence for varieties of human consume 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 five, six and twelve different groups to amylolytic activity, aggressiveness and esterase isoenzymes, respectively. There was not relationship between the amylase activity and aggressiveness. Marechal Cândido Rondon isolates were more aggressive than those of other sampled areas. According to the clustering for esterase, isolates from Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa and Mercedes presented high similarity degree. According to the results, there is differentiation among the isolates of the bacteria presented in the studied regions.

Key words: *Manihot esculenta*, cassava, cassava bacterial blight, esterase.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) detém importância social e econômica em todos os locais onde é cultivada. Em alguns estados do Brasil a cultura é importante geradora de divisas, influenciando diretamente nos hábitos da população das regiões onde é cultivada (Lavina e Miura, 1995; Silva *et al.*, 2001).

O estado do Paraná é o segundo produtor nacional de mandioca, sendo a região oeste do estado a que apresenta o maior número de indústrias relacionadas ao processamento da raiz (FUNDETEC, 2000).

A mandiocultura 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, pois o patógeno pode ser disseminado a longas distâncias pelo próprio material propagativo (Lozano e Booth, 1982; Massola e Bedendo, 2005).

A bacteriose pode ocorrer com diferentes intensidades dependendo da variedade de mandioca, bem como do próprio patógeno que 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 (Elango e Lozano, 1981; Alves e Takatsu, 1984; Verdier *et al.*, 1993). Kimura e 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* e entre estes e outras espécies de *Xanthomonas*.

A principal forma de disseminação de *X. axonopodis* pv. *manihotis* é por meio de manivas infectadas, obtidas de plantas doentes, porém assintomáticas, muitas vezes (Poltronieri e Trindade, 1999). 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*, este trabalho foi conduzido, avaliando-se a atividade *in vitro* de amilase, a análise das isoenzimas α e β -esterase e a agressividade de diferentes isolados, coletados em municípios da região Oeste do Paraná.

Material e métodos

Aquisição e manutenção dos isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*

Os isolados da bactéria foram obtidos de coletas de material vegetal (ramas) com sintomas da forma sistêmica da doença, provenientes da região Oeste do Estado do Paraná. As coletas foram direcionadas a 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, municípios amostrados no período de agosto de 2001 a julho de 2002. A aquisição das ramas infectadas foi realizada de forma a otimizar 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). O meio de cultura utilizado foi o 523 proposto por Kado e 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de ágar 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 tubos. Posteriormente, estes foram agitados e armazenados em freezer a $-20^\circ C$. Para recuperar o isolado, foi realizada repicagem em placa com meio nutriente amido (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 2 g de amido solúvel, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada).

Na identificação dos isolados também foi realizada a coloração de Gram, observação da motilidade e teste de hipersensibilidade em plantas de fumo. O teste consistiu na infiltração abaixo da epiderme da folha, de suspensão contendo 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL), com o auxílio de seringas hipodérmicas e observação dos resultados após 24 h. A presença de necrose nas áreas infiltradas indicou resposta positiva para hipersensibilidade.

A última etapa foi confirmar a capacidade dos isolados em causar doença no hospedeiro. Para realizar esse teste foi injetada uma suspensão contendo 10^8 ufc/mL em folhas e caule de mandioca a fim de verificar o aparecimento de sintomas típicos da doença.

Caracterização de isolados através da hidrólise de amido

Com a finalidade de verificar as diferenças entre os isolados em relação à hidrólise de amido, um ensaio foi conduzido em placas de Petri contendo meio nutritivo amido. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. 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 ufc/mL de solução salina, cultivadas em meio nutritivo amido durante 48 h. Os resultados foram obtidos através da mensuração direta do halo da hidrólise de amido após 148 h de incubação a $25^\circ C$. As médias de consumo foram comparadas mediante análise de variância.

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 suscetível ao patógeno. O ensaio foi conduzido no Núcleo de Estações Experimentais da Unioeste - *Campus* de Marechal Cândido Rondon, Estado do Paraná, em túnel coberto com sombrite. As plantas de mandioca foram cultivadas em vasos plásticos (com aproximadamente 6 L de solo previamente esterilizado) até atingirem aproximadamente 25 cm de altura. Após obtenção de suspensão com 10^8 ufc/mL 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.

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. Para os sintomas decorrentes da inoculação no caule a avaliação foi de acordo com escala proposta por Miura *et al.* (1990).

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

Obtenção do extrato protéico para eletroforese

O processo de obtenção do extrato protéico partiu de isolados cultivados em meio nutriente amido, a 28°C por 72 h. A massa bacteriana, cerca de 5 g, foi coletada com espátula estéril e colocada em tubos para centrífuga contendo 100 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,9). As bactérias foram centrifugadas com o tampão a 5.000 x g por 20 min, a 4°C. 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, que foram colocadas em tubos de microcentrífuga 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, nas quais havia cavidades para acoplamento dos tubos, com a finalidade de manter condições de baixa temperatura.

As células bacterianas foram rompidas, utilizando-se areia fina, obtida por meio de peneiramento em malha de 48 mesh. A proporção de areia/massa de células foi de 1:1 (v:v). Realizou-se a maceração por 10 min com bastões

de aço com extremidades abauladas. Após 5 min de maceração foram adicionados 0,5 mL da solução extratora da amostra (5 mL de glicerol, 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,9, 25 mL de água destilada) 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 o extrato repassado, então, para outro tubo de microcentrífuga 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 de 0,45 µm de diâmetro de poro, com o objetivo de remover restos de parede celular bacteriana, provenientes do processo de maceração.

Preparo do gel e eletroforese

Para a análise eletroforética, foi utilizado gel de poliácridamida 4% (gel concentrador) e 10% (gel separador), segundo metodologia proposta por Alfenas e Brune (1998). A quantidade de amostra aplicada foi em função da concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (1976). 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. 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 nessa 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 descrita por Brune e 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. O gel foi envolto por papel celofane, previamente umedecido em solução secadora (30 mL de glicerina; 400 mL de metanol e 600 mL de água destilada) e colocado sobre placa de vidro plana, evitando-se a formação de bolhas. O gel foi mantido a 15 °C durante 24 h até completa secagem. Após a completa desidratação o gel foi arquivado para posterior comparação dos resultados.

Análise da diversidade genética

A diversidade genética foi verificada pela avaliação qualitativa para a presença ou ausência de bandas para esterase nos géis de poliácridamida. 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.

Resultados e discussão

Isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*

Foram obtidos 61 materiais com sintomas semelhantes aos causados pela bacteriose (Tabela 1) 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 Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, Estado de São Paulo.

Do total de amostras coletadas, foram obtidos 19 isolados bacterianos. O grau de contaminação de manivas por municípios pode ser verificado na Tabela 2.

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 amostras), Fécula Branca (4 amostras) e Verdinha (1 amostra), 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 para mesa são mais suscetíveis a bacteriose, enquanto as variedades para indústria são mais resistentes (Takahashi e Gonçalves, 2001).

Embora o teor de ácido cianídrico seja maior nas variedades para indústria, não há relação entre o teor desse composto presente nos tecidos vegetais e a ocorrência de doença, conforme verificado por Fukuda *et al.* (1985). Por outro lado, uma variação na agressividade ou virulência do patógeno, como demonstrado neste trabalho, pode estar diretamente envolvida no processo doença, tornando-se importante o mapeamento ou, ao menos, a verificação da relação entre diferentes variedades de mandioca e diferentes isolados bacterianos.

Tabela 1. Municípios da região Oeste do Paraná e variedades de mandioca amostrados e resultados da incidência de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

Nº de Registro	Município	Variedade	Incidência
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
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 2. 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

Caracterização de isolados através da hidrólise de amido

A atividade amilolítica permitiu a separação dos 21 isolados (19 obtidos nas amostragens e dois utilizados como controle) em seis grupos (Tabela 3). 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 e 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 grande variabilidade na atividade amilolítica, encontrando isolados com alta atividade e outros com atividade quase não detectável após 48 h de incubação.

Tabela 3. Capacidade de hidrólise de amido, em meio nutriente-amido, de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* obtidos de ramos de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná.

Nº de Registro	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 bcde
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. (%)		8,0
Média geral		1,68

¹Municípios 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); ²Médias calculadas por dc + dh/dc sendo que dc = diâmetro da colônia e dh = diâmetro da área hidrolisada; ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%.

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 4). 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, menos agressivos.

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.

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

Trabalho semelhante, conduzido por Alves e Takatsu (1984), no entanto, não se mostrou eficiente. Segundo os autores, o método de inoculação em

folhas de mandioca foi 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 verificado quando são observadas as médias de atividade amilolítica dos isolados 39 e 51 e sua agressividade respectivamente, concordando com resultados obtidos por Alves e Takatsu (1984).

Tabela 4. Agressividade de isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* obtidos de ramos de mandioca coletadas em municípios da região Oeste do Paraná.

Nº de Registro	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. (%)		21,0	
Média geral		1,93	

¹Municípios 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); ²Valores obtidos mediante escala de notas variando de 0 (foliolo sem sintomas) a 3 (foliolo totalmente necrosado) a partir de folhas inoculadas com os isolados bacterianos; ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%; ⁴Exsudação de pus bacteriano em ramos de mandioca (+: presença; -: ausência).

Caracterização dos isolados através da esterase

A variabilidade em *X. axonopodis* pv. *manihotis* foi evidenciada pelas diferenças no número e mobilidade relativa das bandas de esterase dos 21 isolados. Os perfis de esterase apresentaram de três a oito bandas, enquanto os valores da mobilidade relativa (MR) variaram de 0,06 a 1,00. Analisando a topologia do dendrograma para esterase, os isolados foram separados em 12 grupos (Figura 1). Esses 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. Alto grau de similaridade foi encontrado entre aqueles provenientes de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes.

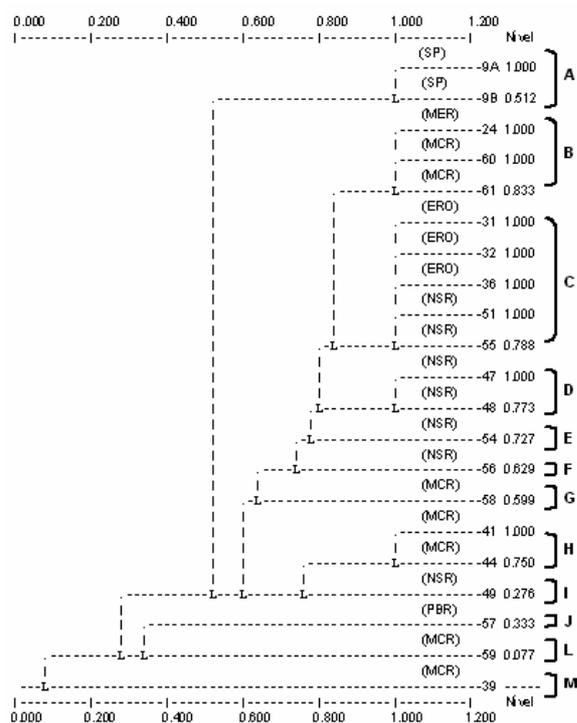


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA representando a distância genética, tomando como parâmetro a atividade esterásica entre isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Municípios de Entre Rios do Oeste (ERO), Marechal Cândido Rondon (MCR), Mercedes (MER), Nova Santa Rosa (NSR), Pato Bragado (PBR) e Estado de São Paulo (SP).

Conclusão

Os dados obtidos na região Oeste do Paraná, durante a coleta de ramas de mandioca, indicaram que materiais provenientes de variedades de mesa apresentaram maior incidência de *X. axonopodis* pv. *manihotis* em relação às variedades para fécula ou para indústria;

Os dados de atividade amilolítica e agressividade permitiram a distinção entre os isolados bacterianos. No entanto, não foi verificada relação entre essas características;

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;

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 do municípios de Entre Rios do Oeste, Nova Santa Rosa e Mercedes.

Referências

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). *Eletroforese de*

isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, p. 151-182. 1998.

ALVES, M.L.B.; TAKATSU, A. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 9, n. 3, p. 485- 494, 1984.

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

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

ELANGO, F.; LOZANO, J.C. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of Cassava Bacterial Blight. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 6, n. 1, p. 57-65, 1981.

FUKUDA, C. et al. Quantificação de ácido cianídrico em variedades de mandioca com diferentes graus de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Rev. Bras. Mandioca*, Cruz das Almas, v. 4, p. 81-87, 1985.

FUNDETEC—Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Projeto estratégico de desenvolvimento agroalimentar. 2. ed. Cascavel: Ed. Edunioeste. 2000. 145 p.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

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

LAVINA, M.L.; MIURA, L. *Cadeia produtiva da mandioca*. Itajaí: Epagri. 1995.

LOZANO, J.C.; BOOTH, R.H. Enfermedades de la yuca. In: DOMINGUEZ, C.E. (Ed.). *Yuca: investigación, producción y utilización*. Cali: Programa Yuca. Ciat/PNUD, p. 421-461. 1982.

MARIANO, R.L.R. et al. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. (Ed.). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 67-108. 2000.

MASSOLA, N.S.J.; BEDENDO, I.P. Doenças da mandioca (*Manihot esculenta*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 2, p. 449-455. 2005.

MIURA, L. et al. Seleção de germoplasma de mandioca resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* em Santa Catarina. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 25, n. 8, p. 1209-1214, 1990.

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

SILVA, J.R. et al. *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.

TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. *A cultura da mandioca*. Paranavaí: Instituto Agrônômico do Paraná – Iapar, 2001.

VERDIER, V. *et al.* Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strains, causal agent of cassava bacterial blight. In: ROCA, W.M.; THRO, A.M. (Ed.). 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).

Received on February 17, 2006.

Accepted on July 28, 2006.