

# CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA E ISOENZIMÁTICA DAS PATOVARES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS QUE ATACAM A MANDIOCA<sup>1</sup>

OSAMU KIMURA<sup>2</sup> e JOSÉ CARMINE DIANESE<sup>3</sup>

**RESUMO** - Os perfis eletroforéticos de proteína solúvel, esterase, fosfatase alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato foram determinados para onze isolados de *X. campestris* pv. *manihotis*, três isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e um de *X. campestris* pv. *campestris* por eletroforese de disco em gel de poliacrilamida. Os perfis de esterase e fosfatase ácida foram mais precisos do que os de proteína total, fosfatase alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato na caracterização das patovares de *X. campestris* (Pammel) Dowson isolados da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Com base nesses perfis, os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* foram caracterizados segundo suas procedências, ao contrário de *X. campestris* pv. *manihotis*, que não puderam ser agrupados. A semelhança entre o único isolado sul-americano de *X. campestris* pv. *cassavae* e alguns isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* sugere que o primeiro pode ser uma estirpe amarela de *X. campestris* pv. *manihotis*. Os perfis de fosfatase ácida dos isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* permitiram agrupá-los segundo graus de patogenicidade.

Termos para indexação: proteína solúvel, esterase, fosfatase ácida e alcalina, *manihot esculenta*.

## PROTEIC ISOENZYMIC CHARACTERIZATION OF THE PATHOVARS OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS WHICH ATTACK CASSAVA

**ABSTRACT** - Electrophoretic profiles of soluble protein, esterase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were determined for eleven isolates of *X. campestris* pv. *manihotis*, three isolates of *X. campestris* pv. *cassavae*, and one isolate of *X. campestris* pv. *campestris*. Esterase and acid phosphatase were more useful in characterizing the pathovars of *X. campestris* (Pammel) Dowson from cassava (*M. esculenta* Crantz) than total protein, alkaline phosphatase or glucose-6-phosphate dehydrogenase. Phylogenetic relations were established leading to differentiation of a South American isolate from two African strains of *X. campestris* pv. *cassavae*. The similarity in isozymic patterns of the South American isolate of *X. campestris* pv. *cassavae* and those of some isolates of *X. campestris* pv. *manihotis* suggests that the former could be a yellow strain of *X. campestris* pv. *manihotis*. The isolates of *X. campestris* pv. *manihotis* could be grouped according to pathogenicity by analysing their profiles of acid phosphatase.

Index terms: soluble protein, esterase, alkaline and acid phosphatase, *Manihot esculenta*.

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é cultivada em extensas áreas tropicais e subtropicais entre os paralelos 30° de latitude norte e 30° Sul (Normanha 1976) e consumida *in natura* ou em forma de fécula, polvilho, bebidas, e ainda, como forrageira para a alimentação animal (Phillips 1974).

Entre os fatores limitantes do rendimento da cultura destacam-se o "vírus do mosaico africano da

mandioca" e duas doenças causadas por *X. campestris*. A "bacteriose da mandioca", incitada por *X. campestris* (Pammel) Dowson pv. *manihotis* (Arthaud-Berthet & Bondar) Dye, relatada pela primeira vez no Brasil por Bondar (1912) e, atualmente, encontrada em todos os países onde se cultiva a mandioca (Leu & Chen 1972, Williams et al. 1973, Lozano & Sequeira 1973, Maraite & Meyer 1975, Daniels et al. 1978 e Tominaga et al. 1978) e a "necrose bacteriana da mandioca" causada por *X. campestris* (Pammel) Dowson pv. *cassavae* (Wiehe & Dowson) Maraite & Weyns, encontrada no continente africano (Wiehe & Dowson 1953, Maraite & Weyns 1978, e Mostade & Butare 1978) e Colômbia (Centro Interamericano de Agricultura Tropical 1976). Os sintomas de "bacteriose" incluem mancha angular e crescimento foliar, murcha, exsudação de goma, cancro na haste jovem e morte descendente com seca de parte ou de todo o topo da planta (Drummond & Hipólito 1941), enquanto que a "necrose" resulta ape-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 19 de outubro de 1983.

Trabalho submetido à Universidade de Brasília pelo primeiro autor como requisito parcial para o título de M.Sc. em Fitopatologia.

<sup>2</sup> Eng.º Agr.º, M.Sc., Professor Assistente, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47 - CEP 23560 - Seropédica, RJ.

<sup>3</sup> Eng.º - Agr.º, Ph.D., Professor Adjunto, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Brasília - CEP 70910 - Brasília, DF.

nas manchas angulares nas folhas e caules (Wiehe & Dowson 1953).

A maioria das antigas espécies de *Xanthomonas* são atualmente consideradas patovares de *X. campestris* (Dye & Lelliott 1974 e Young et al. 1978), reconhecendo-se apenas cinco espécies dentro do gênero. Entre as patovares de *X. campestris*, figuram *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis*, ambos patogênicos à mandioca.

Stolp et al. (1965) relataram a dificuldade em se identificar as patovares de *X. campestris* com base no hospedeiro, quando estes não possuem especificidade. Um exemplo é *X. campestris* pv. *vesicatoria*, que ataca o *Lycopersicon esculentum* Mill., *Capsicum annuum* L., *Nicandra physaloides* Gaertn., e *S. melongena* L. (Kimura et al. 1976). Por outro lado, a mandioca é uma das poucas hospedeiras suscetíveis a duas patovares diferentes de *X. campestris*. Portanto, necessita-se melhor caracterizar estes duas patovares (Robbs et al. 1972, Maraite & Weyns 1978 e Centro Interamericano de Agricultura Tropical 1978).

A análise dos perfis de proteína solúvel total e de enzimas pela técnica de eletroforese, contribuiu para o entendimento das relações entre *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* e *Corynebacterium* (El-Sharkawy & Huisingsh 1971a). Hoitink et al. (1968) distinguiram duas espécies de *Pseudomonas* pelo padrão de proteína total. Moustafa & Whittenbury (1970) determinaram os perfis de esterase e catalase de um grupo de *Pseudomonas* fluorescentes. As quatro espécies fitopatogênicas (oxidase-negativas) puderam ser separadas entre si pelo padrão de esterase. As espécies oxidase-positivas, compreendendo *Pseudomonas marginalis* e espécies saprófitas do solo, distinguiram-se das fitopatogênicas com base nos seus perfis de catalase. Também, Palmer & Cameron (1971), Cameron & Palmer (1971) e Baptist et al. (1971) compararam e caracterizaram espécies do gênero *Pseudomonas* por método semelhante.

Clark (1972) e Huisingsh & Durbin (1965, 1967) caracterizaram espécies de *Agrobacterium* comparando os perfis de proteína, catalase e esterase; enquanto que padrões de fosfatase ácida, fosfatase alcalina e catalase, distinguiram estirpes virulentas das avirulentas de *Agrobacterium tumefaciens* (Das et al. 1978). Padrões eletroforéticos de proteína

de ribossomos e proteína solúvel foram usados para separar espécies de *Erwinia* (Kado et al. 1972, Schaad 1974 e Smith & Powell 1968).

Trabalhando com *Xanthomonas* spp., El-Sharkawy & Huisingsh (1968, 1971b) analisaram padrões de proteína solúvel e de sete enzimas. Gill & Khare (1968) analisaram a proteína solúvel de cinco espécies de *Xanthomonas*, observando pouca variação entre isolados da mesma espécie e diferenças interespecíficas marcantes.

A carência de dados sobre as duas patovares de *X. campestris* que afetam a mandioca sugere a necessidade de uma caracterização genético-bioquímica dos mesmos. No presente trabalho, padrões de proteína solúvel, esterase, fosfatase ácida e alcalina e desidrogenase da glicose-6-fosfato, foram usados para esclarecer possíveis vinculações filogenéticas entre as duas patovares e entre diferentes isolados de cada uma das patovares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem e conservação dos isolados das três patovares de *X. campestris*.

Parte dos isolados foi cedida por H. Maraite, da Universidade Católica de Louvain (Bélgica), J.C. Lozano, do Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT (Colômbia), N.W. Schaad, da Universidade da Georgia (EUA); as demais cepas são originais e foram isoladas em Brasília, DF, Brasil, a partir de material doente coletado na região. Cada cepa foi semeada em meio sólido, e a partir de uma única colônia, provavelmente proveniente de célula única, foram repicadas e estocadas pelo método de Pereira et al. (1970) no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Tabela 1).

### Teste de patogenicidade

Com a finalidade de confirmar e caracterizar a patogenicidade, cada isolado foi inoculado na cultivar de mandioca "Aipim Bravo Preto". Cada isolado foi transferido da suspensão estoque para tubos de ensaio com 10 ml do meio 523 líquido (Kado & Heskett 1970), com a seguinte constituição: 10 g de sacarose, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolizada, 0,3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 2 g de  $KH_2PO_4$  por litro de água destilada. Esses tubos, semeados com a bactéria, foram incubados com agitação, à temperatura de  $26 \pm 2^\circ C$  por vinte e quatro horas. Para averiguar a pureza dos isolados, diluiu-se a suspensão celular de cada um em água destilada e esterilizada, na proporção 1:10, e a seguir, foi, a mesma, semeada na superfície do meio 523 sólido em placas-de-petri. O inóculo de cada isolado foi obtido a partir de placa-de-petri, com pureza confirmada, e diluído em água esteriliza-

TABELA 1. Descrição das patovares de *X. campestris* usadas em testes de patogenicidade, e caracterização em eletroforese de disco em gel de poliacrilamida.

Isolado	Instituição fornecedora	Procedência do isolado	Patovar
PDDCE-8	Univ. Georgia (EUA)	EUA	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>
ICPB-125 (ENA-300)	Univ. Cat. Lovaina (Bélgica)	Brasil - RJ	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
NCPB-1834 (ENA-300)	Univ. Cat. Lovaina (Bélgica)	Brasil - RJ	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
CIAT-1193	CIAT (Colômbia)	Brasil - AM	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
CIAT-1105	CIAT (Colômbia)	África	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2646	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2647	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2648	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2649	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2650	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2651	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
ENA-2652	UFRRJ. (Brasil)	Brasil - DF	<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
CIAT-1195 (662a)	CIAT (Colômbia)	Rwanda	<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i>
NCPB-101 (CIAT-1148)	CIAT (Colômbia)	Malawi	<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i>
CIAT-1165	CIAT (Colômbia)	Colômbia	<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i>

da, até atingir cerca de  $10^8$  células por mililitro. A inoculação foi conduzida em casa-de-vegetação, empregando-se quatro plantas no estágio de sete folhas para a inoculação de cada isolado. Das quatro, três foram inoculadas na haste e, a última, nas cinco folhas mais velhas. Inocularam-se as folhas pelo método de Robbs et al. (1972), friccionando-as suavemente, com cotonetes embebidos com a suspensão bacteriana e caborundo (0,1 g/l). A inoculação na haste foi feita inserindo-se a extremidade de palito dentário esterilizado contendo uma gota de suspensão bacteriana, na altura da quinta folha a partir do ápice (Akiba et al. 1972). Durante o ensaio, as temperaturas médias, diurna e noturna, foram de 28°C e 20°C, respectivamente. A avaliação dos resultados foi feita aos vinte e cinco e trinta e cinco dias após a inoculação nas folhas e hastes, respectivamente, adotando-se o critério de notas, segundo o tipo e severidade de sintomas.

#### Extração e preparo da proteína solúvel

As culturas puras de cada isolado foram semeadas no meio 523 sólido, em cinquenta placas-de-petri por isolado da bactéria e incubadas à temperatura de 28°C, por um período de setenta e duas horas. As células obtidas, foram suspensas em 500 ml do tampão Tris (tris(hidroximetil) aminometano) - HCl 0,05 M, pH 7,8 e lavadas duas vezes com o mesmo tampão e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 g em rotor Sorvall GSA, durante vinte minutos, à temperatura de 4°C. O precipitado de células foi ressuspenso em 5 ml do mesmo tampão, acrescido de ácido ascórbico 0,57 mM, hidrocloreto de cisteína 0,64 mM e sacarose 0,4 M. As células mantidas refrigeradas em gelo foram rompidas por sonicação (Sonicador "Bronwill", modelo Biosonik II, Bronwill Scientific Co. USA), operando com potência máxima em ciclos de trinta segundos de

sonificação e intervalo de um minuto até atingir dez minutos de operação. O homogeneizado de células, assim obtido, foi centrifugado a 105.000 g por um período de uma hora e à temperatura de 2°C (Rotor Tipo 30, Beckman). O sobrenadante, contendo a proteína solúvel, foi retirado, cuidadosamente, com auxílio de seringa e estocado em alíquotas de 0,5 ml à temperatura de -20°C. A concentração de proteína foi determinada empregando-se o método de Lowry et al. (1951), utilizando-se como padrão a albumina de soro bovino.

#### Eletroforese da proteína solúvel

As amostras foram corridas em eletroforese de disco, com tubos de 0,5 cm de diâmetro interno e com 10 cm de comprimento, contendo gel de poliacrilamida (5%) até a altura de 8,5 cm, preparada segundo Davis (1964). O tubo de eletroforese recebeu 0,1 ml de amostra, correspondendo a 150 µg de proteína. A corrente foi ajustada em 1 mA por tubo até a penetração da proteína no gel e, posteriormente, aumentada para 3 mA, permanecendo a voltagem em torno de 320 volts até o final da corrida. Azul de bromofenol foi usado para marcar a frente de corrida. As bandas de proteínas solúveis foram coradas com "Coomassie Brilliant Blue" (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA) empregando-se o ácido tricloroacético como fixador de proteína e descorante do gel, seguindo a metodologia de Chrambach et al. (1967). Esterase, fosfatase ácida e alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato foram localizadas pelos métodos de El-Sharkawy & Huisingh (1971a, 1971b). Os géis, após a revelação, foram estocados em solução de etanol a 50% para a desidrogenase e, no caso dos enzimas hidrolíticos e proteína, em ácido acético 7%, para posterior fotografia e leitura em densitômetro EC-910 (E-C Appar. Corp. Philadelphia, Pen. USA).

## RESULTADOS

Patogenicidade dos isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis*

Os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* foram todos patogênicos à cultivar "Aipim Bravo Preto" de mandioca (Tabela 2). Os primeiros, representados pelos isolados CIAT-1195, NCPPB-101 e CIAT-1165, apresentaram patogenicidade uniforme nas inoculações

TABELA 2. Patogenicidade dos isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *cassavae*, expressa pelo tipo e intensidade de sintomas apresentados aos vinte e cinco e trinta e cinco dias após a inoculação, respectivamente, em folhas e hastes da cultivar de mandioca "Aipim Bravo Preto", em casa de vegetação.

Isolado	Inoculação	
	nas folhas <sup>a</sup>	nas hastes <sup>b</sup>
<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>		
ICPB-125 (ENA-300)	+	-
NCPPB-1834 (ENA-300)	+	+
CIAT-1193	++	++
CIAT-1105	+++	+++
ENA-2646	+++	+++
ENA-2647	+++	+++
ENA-2648	+++	+++
ENA-2649	+++	+++
ENA-2650	+	+
ENA-2651	+	+
ENA-2652	+	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i>		
CIAT-1195 (662a)	+	-
NCPPB-101 (CIAT-1148)	+	-
CIAT-1165	+	-

a + = mancha angular sem coalescimento das lesões

++ = mancha angular com o coalescimento das lesões, atingindo os tecidos condutores da haste

+++ = mancha angular com o coalescimento das lesões, atingindo os tecidos condutores da haste

b - = ausência de sintomas

+ = invasão vascular com sintoma de murcha em até 20% das folhas

++ = invasão vascular com sintoma de murcha em 20 a 70% das folhas

+++ = invasão vascular com sintoma de murcha em mais de 70% das folhas.

foliares, e são incapazes de infectar as hastes da hospedeira; porém, os isolados pertencentes a *X. campestris* pv. *manihotis* demonstraram variação na patogenicidade em dois sistemas de inoculação (Tabela 2).

Caracterização dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* por eletroforese de disco em gel de poliacrilamida

O número de bandas da proteína solúvel total de diferentes isolados das três patovares de *X. campestris* variaram de quatorze a vinte, conforme consta na Tabela 3. As bandas foram detectadas na maioria dos isolados, em toda a extensão do gel, com exceção dos isolados CIAT-1165, ENA-2648, ENA-2649 e ENA-2650, que tiveram a máxima migração no  $E_f$  0.84 (Tabela 3). Com base na diferença de mobilidade das bandas, os isolados foram reunidos em nove grupos correspondente aos perfis apresentados: A, B, C, D, E, F, G, H e I (Fig. 1). Os isolados CIAT-1195, NCPPB-101 e CIAT-1165 de *X. campestris* pv. *cassavae* apresentaram respectivamente, os padrões B, C e D, formando um grupo semelhante, com dez bandas em comum, sendo sete delas com a mesma mobilidade de bandas apresentadas pelos isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* (Tabela 3). A variabilidade entre os isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* foi evidenciada pelas diferenças no número, intensidade e mobilidade das bandas nos perfis de onze isolados. De acordo com essas diferenças, os isolados foram reunidos em cinco grupos: E, F, G, H e I, com base em observação direta do gel, cujos eletroforegramas estão na Fig. 3. A variabilidade no padrão eletroforético de esterase foi detectada em ambas as patovares de *X. campestris*. Os perfis de esterase dos isolados apresentaram de seis a dez bandas, as quais variaram em intensidade e distribuição em diversos valores de  $E_f$ . De acordo com a variação nos perfis de esterase, os isolados foram reunidos em seis grupos diferentes, a saber: A, B, C, D, E e F (Fig. 2). Os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT-1195, NCPPB-101 e CIAT-1165) apresentaram dois padrões diferentes, sendo os dois primeiros isolados incluídos no Grupo C e o último no B. As cepas NCPPB-101 e CIAT-1195, isolados em Malawi em Rwanda, formaram o grupo C homogêneo, com seis bandas idênticas, sendo a mais ativa

TABELA 3. Distribuição das bandas de proteína total pertencentes aos isolados de três patovares de *X. campestris*, por intervalo de 0,04 unidades de  $E_f$ .

Patovares de <i>X. campestris</i>	Faixa de $E_f$																				
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	
<i>campestris</i>																					
PDDCE - 8																					
<i>cassavae</i>																					
CIAT - 1195																					
NCPB - 101																					
CIAT - 1165																					
<i>manihotis</i>																					
ICPB - 125																					
NCPB - 1834																					
CIAT - 1193																					
CIAT - 1105																					
ENA - 2646																					
ENA - 2647																					
ENA - 2648																					
ENA - 2649																					
ENA - 2650																					
ENA - 2651																					
ENA - 2652																					

☐ = Bandas comuns aos isolados de duas patovares de mandioca.

☑ = Bandas comuns aos isolados de uma das patovares de mandioca.

\* = Contém duas bandas.

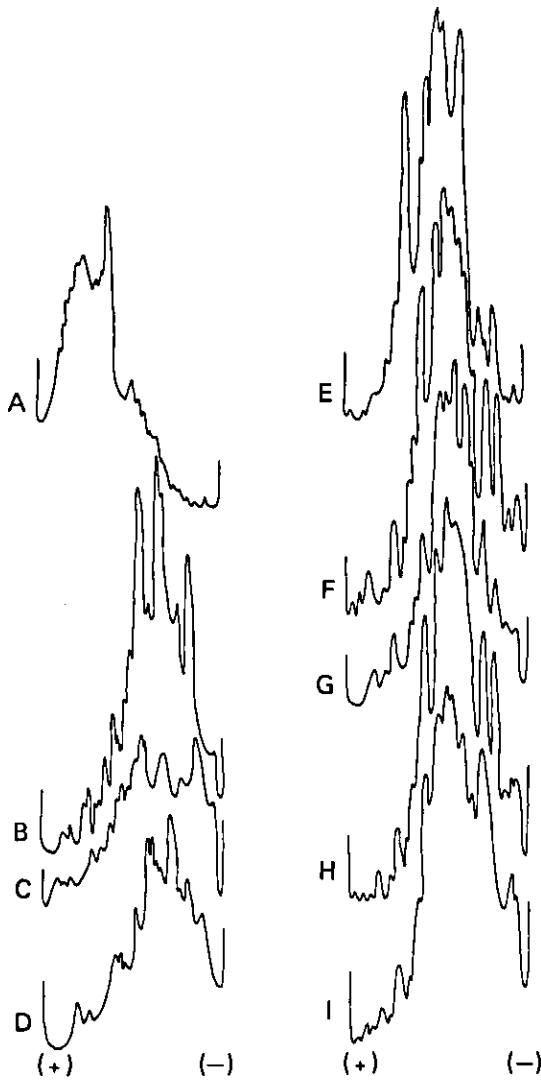


FIG. 1 (A a I). Perfis densitométricos (A, B, C, D, E, F, G, H, e I) de proteína solúvel total, de três patovares de *X. campestris*, segundo os quais os isolados foram reunidos em: grupo A - *X. campestris* pv. *campestris* (PDDCE - 8); grupo B - *X. campestris* pv. *cassavae* (NCPB - 101); grupo C - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1195); grupo D - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1165); grupo E - *X. campestris* pv. *manihotis* (CIAT - 1105), ENA - 2646 e ENA - 2647; grupo F - *X. campestris* pv. *manihotis* (ICPB - 125 e NCPB - 1834); grupo G - *X. campestris* pv. *manihotis* (ENA - 2648, ENA - 2649 e ENA - 2650); grupo H - *X. campestris* pv. *manihotis* (CIAT - 1193) e grupo I - *X. campestris* pv. *manihotis* (ENA - 2651 e ENA - 2652).

localizada nos valores de  $E_f$  entre 0.1 e 0.2. O único isolado da Colômbia, CIAT-1165, apresentou um padrão bastante distinto dos outros dois, com nove bandas e com o pico máximo na leitura do densitômetro em torno de  $E_f$  0,67 (grupo B). Observou-se, ainda, que bandas "c", "d" e "o", são comuns aos três isolados de *X. campestris*

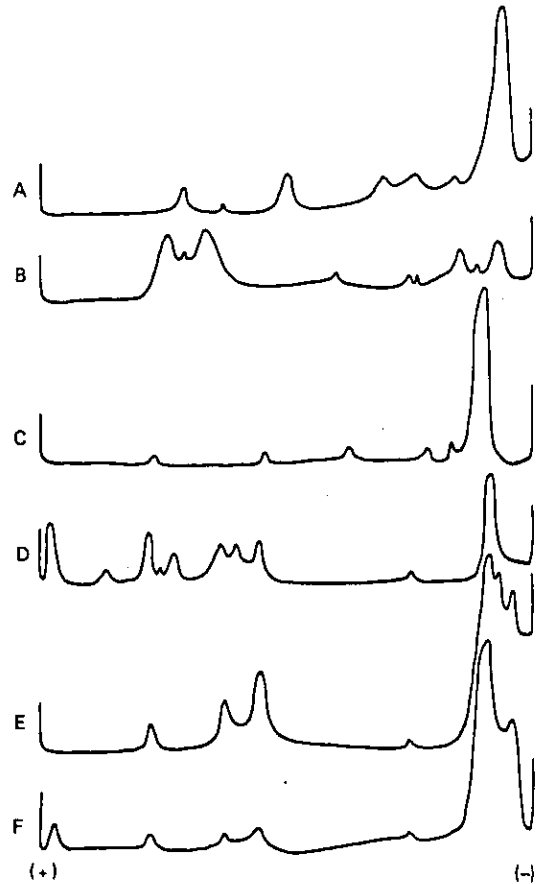


FIG. 2 (A a F). Perfis densitométricos (A, B, C, D, E e F) de esterase, de três patovares de *X. campestris*, segundo os quais os isolados foram reunidos em: grupo A - *X. campestris* pv. *campestris* (PDDCE - 8); grupo B - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1165); grupo C - *X. campestris* pv. *cassavae* (NCPB - 101 e CIAT - 1195); grupo D - *X. campestris* pv. *manihotis* (CIAT - 1193 e ICPB - 125); grupo E - *X. campestris* pv. *manihotis* (ENA - 2646, ENA - 2647, ENA - 2648, ENA - 2649, ENA - 2650, ENA - 2651 e NCPB - 1834) e grupo F - *X. campestris* pv. *manihotis* (CIAT - 1105 e ENA - 2652).

pv. *cassavae* (Tabela 4). A variabilidade no padrão de esterase foi observada também em *X. campestris*, pv. *manihotis*, que apresentou três padrões distintos, reunidos nos grupos: D, E e F. Os isolados das três patovares de *X. campestris* foram reunidos nos grupos A, B, C, D e E (Fig. 3), de acordo com os respectivos perfis de fosfatase ácida apresentados. Os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* apresentaram dois padrões de fosfatase ácida, o mesmo ocorrendo com os onze isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* (Tabela 5). Detectou-se fraca atividade de fosfatase alcalina em todas as patovares de *X. campestris*, com bandas entre  $E_f$  0,20 e 0,44 (Tabela 6). Com base na diferença de mobilidade eletroforética

apresentada, os isolados foram reunidos em grupos A e B, conforme os perfis contidos na Fig. 4 e Tabela 6. Os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* apresentaram um único padrão eletroforético com banda "a", constituindo o grupo B. Por outro lado, o isolado de *X. campestris* pv. *campestris* apresentou três bandas, "b", "c" e "d", compondo o grupo A. A atividade de desidrogenase da glucose-6-fosfato foi detectada em todos os isolados, os quais mostraram de duas a quatro bandas localizadas entre os valores de  $E_f$  0,3 a 0,7. De acordo com os perfis apresentados, os isolados formaram os grupos: A, B, C, D e E (Fig. 5 e Tabela 7). O grupo de semelhança entre os isolados de três patovares de *X. campestris* constam da Fig. 6, expresso pela média das percentagens do total de bandas que são comuns aos pares de isolados nos perfis de proteína solúvel, esterase, fosfatase alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato. Os resultados demonstraram que o isolado PDDCE-8 de *X. campestris* pv. *campestris* é bastante diferente dos isolados de patovares patogênicas à mandioca, com um índice de similaridade em relação a estes, em torno de 30% (23,04 a 37,10%). Ressalte-se que o isolado CIAT-1165 de *X. campestris* pv. *cassavae* apresentou semelhança acentuada com os isolados CIAT-1105, ENA-2646, ENA-2648, ENA-2649, ENA-2650 e ENA-2651 de *X. campestris* pv. *manihotis*, atingindo graus de similaridade equivalentes àqueles observados entre pares de isolados de *X. campestris* pv. *manihotis*.

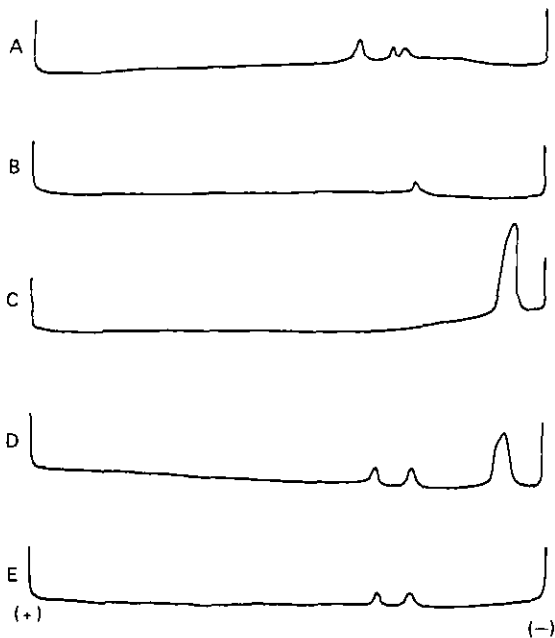


FIG 3 (A a E). Perfis densitométricos (A, B, C, D e E) de fosfatase ácida, de três patovares de *X. campestris*, segundo os quais os isolados foram reunidos em: grupo A - *X. campestris* pv. *campestris* (PDDCE - 8); grupo B - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1195 e NCPB - 101); grupo C - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1165); grupo D - *X. campestris* pv. *manihotis* (CIAT - 1105, ENA - 2646, ENA - 2648, ENA - 2649 e ENA - 2651) e grupo E - *X. campestris* pv. *manihotis* (ICPB - 125, NCPB - 1834, CIAT - 1193, ENA - 2647, ENA - 2650 e ENA - 2652).

## DISCUSSÃO

A variação no número de bandas nos perfis de proteína solúvel total detectada nas patovares de *X. campestris* da mandioca está de acordo com o que foi verificado por El-Sharkawy & Huisinsh (1971b) em outras espécies e patovares de *Xanthomonas*, encontrando entre vinte e oito a trinta bandas para os diferentes isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e dezessete para *X. campestris* pv. *malvacearum*.

Os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* diferiram em seus perfis de proteína total. Esses resultados coincidem com os de El-Sharkawy & Huisinsh (1971b), pois, po-

TABELA 4. Distribuição das bandas de esterase pertencentes aos isolados de três patógenos de *X. campestris*, por intervalos de 0,04 unidades de Ef.

Patógenos de <i>X. campestris</i>	Faixa de Ef																
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q
<i>campestris</i>																	
PDDCE - 8		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			
<i>cassavae</i>																	
CIAT - 1195			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>		
NCPFB - 101			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>		
CIAT - 1165		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>				
<i>manihotis</i>																	
ICPB - 125			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
NCPFB - 1834	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CIAT - 1193			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CIAT - 1105			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2646			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2647			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2648			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2649			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2650			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2651			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENA - 2652			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>					<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

= Bandas comuns aos isolados de dois patógenos de mandioca.

= Bandas comuns aos isolados de uma das patógenos de mandioca.

\* = Contém duas bandas.



TABELA 5. Distribuição das bandas de fosfatase ácida pertencentes aos isolados de três patovares de *X. campestris*, por intervalo de 0,04 unidades de E<sub>f</sub>.

Patovares de <i>X. campestris</i>	Faixa de E <sub>f</sub>			
	a	b	c	d
	0,05	0,25	0,30	0,35
	0,09	0,29	0,34	0,39
<i>campestris</i>				
PDDCE - 8		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>cassavae</i>				
CIAT - 1195		<input type="checkbox"/>		
NCPPB - 101		<input type="checkbox"/>		
CIAT - 1165	<input type="checkbox"/>			
<i>manihotis</i>				
ICPB - 125		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
NCPPB - 1834		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
CIAT - 1193		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
CIAT - 1105	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2646	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2647		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2648	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2649	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2650		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2651	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
ENA - 2652		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

= Bandas comuns aos isolados de uma das patovares de mandioca

TABELA 6. Distribuição das bandas de fosfatase alcalina pertencentes aos isolados de três patovares de *X. campestris*, por intervalo de 0,04 unidades de E<sub>f</sub>.

Patovares de <i>X. campestris</i>	Faixa de E <sub>f</sub>			
	a	b	c	d
	0,20	0,25	0,30	0,40
	0,24	0,29	0,34	0,44
<i>campestris</i>				
PDDCE - 8		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>cassavae</i>				
CIAT - 1195	<input checked="" type="checkbox"/>			
NCPPB - 101	<input checked="" type="checkbox"/>			
CIAT - 1165	<input checked="" type="checkbox"/>			
<i>manihotis</i>				
ICPB - 125	<input checked="" type="checkbox"/>			
NCPPB - 1834	<input checked="" type="checkbox"/>			
CIAT - 1193	<input checked="" type="checkbox"/>			
CIAT - 1105	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2646	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2647	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2648	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2649	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2650	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2651	<input checked="" type="checkbox"/>			
ENA - 2652	<input checked="" type="checkbox"/>			

= Bandas comuns aos isolados de duas das patovares de mandioca

rém não permitiram uma separação satisfatória das duas patovares. Os eletroforegramas revelam uma maior proximidade entre os isolados da mandioca do que entre estes e *X. campestris* pv. *campestris*. Entretanto, a acentuada semelhança no perfil de proteína total dos isolados africanos de *X. campestris* pv. *cassavae* permite distingui-los do isolado colombiano da mesma patovar. Esse fato não coincide com os dados obtidos por El-Sharkawy & Huisingsh (1971b) e Palmer & Cameron (1971) quando trabalharam com espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, respectivamente.

Os resultados mostraram a inexistência de padrão único de esterase, tanto em *X. campestris* pv. *cassavae* como em *X. campestris* pv. *manihotis*. El-Sharkawy & Huisingsh (1971b) encontraram padrões de esterase específicos para a espécie e patovar na maioria dos isolados de *Xanthomonas* spp. estudados, com exceção dos grupos de isola-

dos de *X. campestris* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. albilineans*, cada qual com três perfis diferentes de isoenzimas. Outros autores chegaram a resultado idêntico com patovares de *Erwinia carotovora* (Shekhawat & Rudolph 1978), espécies e isolados de *Agrobacterium* (El-Sharkawy & Huisingsh 1971a, Clark 1972) e isolados de *Pseudomonas cepacia* (Baptist et al. 1971).

Os três isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* de patogenicidade idêntica, mostraram correlação entre os perfis de esterase e respectiva distribuição geográfica, o mesmo não ocorrendo no caso dos onze isolados de *X. campestris* pv. *manihotis*.

Os padrões de fosfatase ácida apresentados pelos isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* foram constituídos de bandas de isoenzimas menos ativas do que as de esterase e desidrogenase da glucose-6-fosfato. Esses resultados coincidem com os de El-Sharkawy

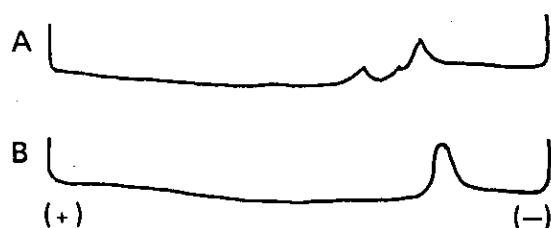


FIG. 4 (A e B). Perfis densitométricos (A e B) de fosfatase alcalina, de três patovares de *X. campestris*, segundo os quais os isolados foram reunidos em: A - *X. campestris* pv. *campestris* (PDDCE - 8) e grupo B - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1195, NCPPB - 101 e CIAT - 1165) e *X. campestris* pv. *manihotis* (ICPB - 125, NCPPB - 1834, CIAT - 1193, CIAT - 1105, ENA - 2646, ENA - 2647, ENA - 2648, ENA - 2649, ENA - 2650, ENA - 2651 e ENA - 2652).

& Huisingh (1971b), quando estudaram três espécies de *Xanthomonas* e encontraram, na maioria dos isolados, uma baixa atividade de fosfatase ácida.

Os perfis de fosfatase ácida, apesar de fracos, permitiram distinguir as três patovares de *X. campestris*. Estes padrões de *X. campestris* pv. *cassavae* permitiram diferenciar os isolados procedentes da África do isolado da Colômbia. Além disso, houve coincidência entre os perfis de fosfatase ácida da maioria dos isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* com o seu nível de patogenicidade. Das et al. (1978) observaram em estirpes não-patogênicas de *A. tumefaciens* um menor número de bandas de fosfatase ácida, coincidindo com os dados aqui obtidos com isolados de *X. campestris* pv. *manihotis*. Verificou-se a presença de três bandas nos perfis dos isolados de alta patogenicidade e duas nos dos isolados menos patogênicos.

A baixa atividade de fosfatase alcalina, verificada em patovares de *X. campestris* patogênicos à mandioca, sugere a presença de enzimas com pouca atividade em pH 8,8, fato, este, também observado em outras espécies e patovares de *Xanthomonas* (El-Sharkawy & Huisingh 1971b) e em patovares de *E. carotovora* (Shekhawat & Rudolph 1978).

Por outro lado, os padrões de fosfatase alcalina observados com os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis* são distin-

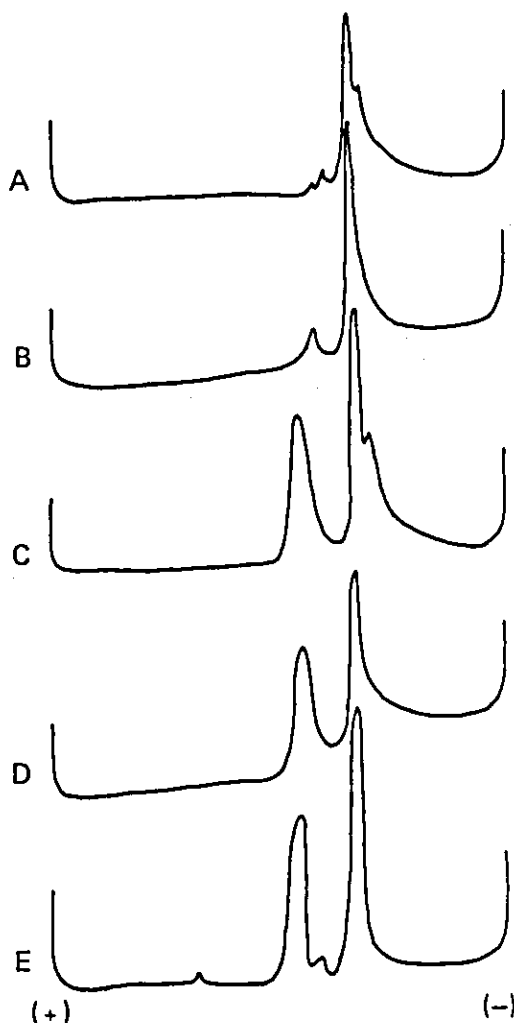


FIG. 5 (A a E). Perfis densitométricos (A, B, C, D e E) de desidrogenase da glucose-6-fosfato, de três patovares de *X. campestris*, segundo os quais os isolados foram reunidos em: grupo A - *X. campestris* pv. *campestris* (PDDCE - 8); grupo B - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1195 e NCPPB - 101); grupo C - *X. campestris* pv. *manihotis* (ENA - 2646, ENA - 2647, ENA - 2648, ENA - 2652 e NCPPB - 1834); grupo D - *X. campestris* pv. *cassavae* (CIAT - 1165) e *X. campestris* pv. *manihotis* (ENA - 2649, ENA - 2650, ENA - 2651 e CIAT - 1105) e grupo E - *X. campestris* pv. *manihotis* (ICPB - 125 e CIAT - 1193).

tos dos de fosfatase ácida, indicando a presença de fosfatases específicas que operam dependendo da faixa de pH. Outrossim, El-Sharkawy & Huisingh

TABELA 7. Distribuição das bandas de desidrogenase da glucose-6-fosfato pertencentes aos isolados de três patovares de *X. campestris*, por intervalo de 0,024 unidades de  $E_f$ .

Patovares de <i>X. campestris</i>	Faixa de $E_f$						
	a	b	c	d	e	f	g
	0,300	0,325	0,350	0,400	0,425	0,450	0,675
	0,324	0,349	0,375	0,424	0,449	0,474	0,699
<i>campestris</i>							
PDDCE - 8		☐	☐	☐	☐		
<i>cassavae</i>							
CIAT - 1195			☐		☐		
NCPPB - 101			☐		☐		
CIAT - 1165		☐				☐	
<i>manihotis</i>							
ICPB - 125		☑		☐		☑	☐
NCPPB - 1834	☐	☑				☑	
CIAT - 1193		☑		☐		☑	☐
CIAT - 1105		☑				☑	
ENA - 2646	☐	☑				☑	
ENA - 2647	☐	☑				☑	
ENA - 2648	☐	☑				☑	
ENA - 2649		☑				☑	
ENA - 2650		☑				☑	
ENA - 2651		☑				☑	
ENA - 2652	☐	☑				☑	

☑ = Bandas comuns aos isolados de uma das patovares de mandioca.

(1971b) encontraram, em três espécies de *Xanthomonas* e dezessete patovares de *X. campestris*, padrões idênticos de fosfatases ácida e alcalina, o que difere dos isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis*, aqui estudados.

As patovares de *X. campestris* patogênicas à mandioca mostraram bandas múltiplas e bastante ativas de desidrogenase da glucose-6-fosfato, conforme foi observado por El-Sharkawy & Huisingh (1971b) em outras espécies e patovares de *Xanthomonas*. A variabilidade no padrão de desidrogenase da glucose-6-fosfato em *X. campestris* pv. *cassavae* foi correlacionada diretamente com a distribuição geográfica, distinguindo-se os isolados de continentes diferentes. A similaridade entre o isolado colombiano (CIAT-1165) de *X. campestris* pv. *cassavae* e três isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* demonstrou a existência em ambas de um mesmo sistema de desidrogenase da glucose-6-fosfato. Além disso, os isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* apresentaram outros dois padrões,

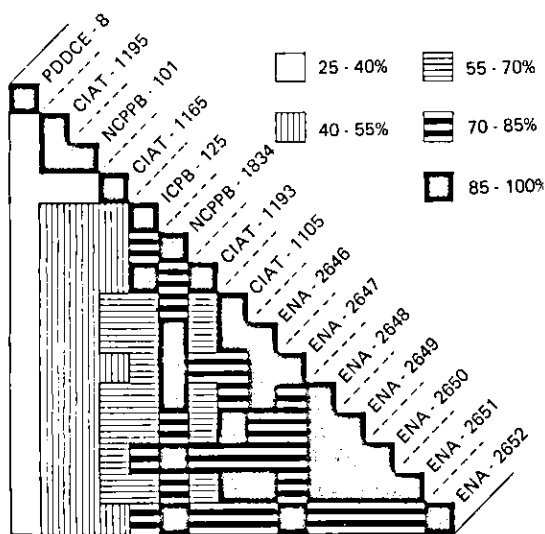


FIG. 6. Matriz de similaridade montada com base na média das percentagens de bandas comuns de proteína total, esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato, obtidas quando se compararam pares de isolados de três patovares de *X. campestris*.

sem nenhuma correlação com o grau de patogenicidade ou local de origem dos mesmos.

Com base nos perfis de esterase, fosfatase ácida e desidrogenase da glucose-6-fosfato, os isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* de procedência africana apresentaram padrões bastantes similares e diferentes do isolado procedente da Colômbia. Esta homogeneidade entre os isolados da África confirmados de Maraite & Weyns (1978), que demonstraram não haver diferenças entre vinte isolados do continente africano, inclusive dos isolados CIAT-1195 e NCPPB-101, através de testes fisiológicos, nutricionais e de patogenicidade.

Lozano & Sequeira (1973) agruparam quinze isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* (dois do Brasil, doze da Colômbia e um da Venezuela) em dois serótipos e sugerem a possibilidade de uma correlação entre serótipos e origem dos isolados, baseando-se na probabilidade de que os isolados colombianos, pertencentes aos mesmo serótipo de um dos dois isolados brasileiros, tenham sido introduzidos do Brasil. Esta possibilidade não se evidencia nas observações com esterase, fosfatases, desidrogenase da glucose-6-fosfato e proteína total, que não permitiram reunir os isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* de origem comum.

Os isolados ICPB-125 e NCPPB-1834 de *X. campestris* pv. *manihotis*, subculturas da cepa original ENA-300, isolada no Rio de Janeiro, apresentaram-se diferentes no que diz respeito à patogenicidade e nos perfis de esterase e desidrogenase da glucose-6-fosfato. Estas cepas, cedidas por H. Maraite, da Universidade Católica de Lovaina (Bélgica), em coleção há mais de sete anos, provavelmente, durante cultivos sucessivos sofreram mutações ou seleção de genótipos diferentes a partir da população contida na cultura original.

Maraite & Weyns (1978) afirmaram que *X. campestris* pv. *cassavae*, aparentemente, estava restrito ao leste da África, e que a sua ausência na América do Sul implicaria ter origem diferentes de *X. campestris* pv. *manihotis*, com distribuição ampla em áreas neotropicais.

Independentemente de confirmação ou não da hipótese de Maraite & Weyns (1978), a verdade é que os perfis de proteína total e dos enzimas analisados mostraram que os isolados africanos de *X. campestris* pv. *cassavae* são bastante distintos

dos isolados de *X. campestris* pv. *manihotis*, o que concorda com a proposição feita (Maraite & Weyns 1978) para se manter separadas as duas patovares de *X. campestris* patogênicos à mandioca.

Além disso, os padrões de isoenzimas e de proteína total do isolado sul-americano de *X. campestris* pv. *cassavae* revelaram uma maior proximidade deste com a maioria, e identidade com alguns isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* (Fig. 6).

Esses dados sugerem que o isolado sul-americano de *X. campestris* pv. *cassavae* seria uma estirpe amarela de *X. campestris* pv. *manihotis*, semelhante àquelas relatadas para *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Robbs et al. 1974) e *X. campestris* pv. *ricini* (Sabet 1959).

### CONCLUSÕES

1. Os perfis de proteína solúvel, esterase, fosfatase ácida e alcalina e desidrogenase da glucose-6-fosfato, integrados em coeficientes de similaridade, demonstraram uniformidade genética tanto entre os isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* como dentro das entirpes africanas de *X. campestris* pv. *cassavae*.

2. O isolado colombiano de *X. campestris* pv. *cassavae* comportou-se mais como uma estirpe amarela de *X. campestris* pv. *manihotis* indicando ser filogeneticamente diferente das estirpes africanas da patovar *cassavae*.

3. Os padrões de fosfatase ácida serviram para separar isolados de *X. campestris* pv. *manihotis* de diferentes graus de patogenicidade.

### REFERÊNCIAS

- AKIBA, F.; RIBEIRO, R.L.D.; CASTRO, L.A.B.; ROBBS, C.F.; KIMURA, O. & SUDO, S. Resistência na variedade de beringela "Nihon Nassu", à "murcha-bacteriana" (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Sm.). Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 2(1): 17-21, 1972.
- BAPTIST, J.N., SHAW, C.R. & MANDEL, M. Comparative zone electrophoresis of enzymes of *Pseudomonas solanacearum* and *Pseudomonas cepacia*. J. Bacteriol., 108:799-803, 1971.
- BONDAR, G. Uma nova moléstia bacteriana das hastes da mandioca. Chác. e Quint., 5:15-8, 1912.
- CAMERON, H.R. & PALMER, B.C. Gel electrophoresis as a tool in diagnosing *Pseudomonas* isolates. In:

- GEESTERANUS, H.P.M. ed. *Proceeding of the Third International Congress on Plant Pathogenic Bacteria*. Wageningen, 1971. p.121-3.
- CENTRO INTERAMERICANO DE AGRICULTURA TROPICAL, Cali, Colombia. *Afublo bacterial de la yuca (ABY)*. CIAT. Informe Anual 1976, p.B 29-32, 1976.
- CENTRO INTERAMERICANO DE AGRICULTURA TROPICAL, Cali, Colombia. *Cassava Bacterial blight*. CIAT. Informe Anual 1978, p.A 26-8, 1978.
- CHRAMBACH, A.; REISFELD, R.A.; WYCKOFF, M. & ZACCARI, J. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Bioch.*, 20:150-4, 1967.
- CLARK, A.G. Starch gel electrophoresis of catalase and esterase isoenzymes from some *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, 35(4): 553-8, 1972.
- DANIELS, J.F.; BOHER, B. & KOHLER, F. Les maladies bacteriennes du manioc en République Populaire du Congo et en Empire Centrafricain: épidémiologie. In: MARAITE, H. & MEYER, J.A., eds. *Proceeding of an International Symposium Diseases of Tropical Food Crops*. Belgium, 1978. p.131-40.
- DAS, P.K.; BASU, M. & CHATTERJEE, G.C. Isoenzyme patterns of several hydrolytic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24:121-7, 1978.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404-27, 1964.
- DRUMMOND, O.A. & HIPÓLITO, O. Notas sobre a bacteriose da mandioca. *Bol. Esc. Sup. Agric. M. Gerais, Viçosa*, 4:86-124, 1941.
- DYE, D.W. & LELLIOTT, R.A. Genus II: *Xanthomonas* Dowson 1939. In: BUCKMAN, R.E. & GIBBONS, N.E., eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8. ed. Baltimore, USA, Williams & Wilkins Co, 1974. p.243-9.
- EL-SHARKAWY, T.A. & HUISINGH, D. Identification of *Xanthomonas* species by acrylamide-gel disc electrophoresis of soluble bacterial proteins. *Phytopathology*, 58:1049, 1968.
- EL-SHARKAWY, T.A. & HUISINGH, D. Electrophoretic analysis of esterases and other soluble proteins from representatives of phytopathogenic bacteria genera. *J. Gen. Microbiol.*, 68:149-54, 1971a.
- EL-SHARKAWY, T.A. & HUISINGH, D. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *J. Gen. Microbiol.*, 68:155-65, 1971b.
- GILL, H.S. & KHARE, M.N. Disc electrophoresis of sonic extracts of five phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 58:1051-2, 1968.
- HOITINK, H.A.J., HAGEDORN, D.J. & ELIZABETH, M. Survival, transmission, and taxonomy of *Pseudomonas syringae* van Hall, the causal organism of bacterial brown spot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Can. J. Microbiol.*, 14:437-41, 1968.
- HUISINGH, D. & DURBIN, R.D. Acrylamide gel electrophoresis of proteins from *Agrobacterium* species. *Phytopathology*, 55:1062, 1965.
- HUISINGH, D. & DURBIN, R.D. Physical and physiological methods for differentiating among *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens*, and *A. radiobacter*. *Phytopathology*, 57:922-3, 1967.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-79, 1970.
- KADO, C.I.; SCHAAD, N.W. & HESKETT, M.G. Comparative gel electrophoresis studies of ribosomal proteins of *Erwinia* species and members of the Enterobacteriaceae. *Phytopathology*, 62(9):1077-82, 1972.
- KIMURA, O.; ROBBS, C.F.; AKIBA, F. & TERANISHI, J. A identificação de um novo grupo de *Xanthomonas vesicatoria* (Doideg) Dowson infectando a beringela (*Solanum melongena* L.). *R. Soc. Bras. Fitopatol.*, 9:3, 1976.
- LEU, L.S. & CHEN, C.T. Bacterial wilt of cassava (*Manihot utilissima* Pohl.) caused by *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr. *Plant Prot. Bull., Taiwan*, 14:17-26, 1972.
- LOZANO, J.C. & SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: I. Etiology. *Phytopathology*, 64:74-82, 1973.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, H.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- MARAITE, H. & MEYER, J.A. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. *Pans*, 21:27-37, 1975.
- MARAITE, H. & WEYNS, J. Distinctive physiological, biochemical and pathology characteristics of *Xanthomonas manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. In: MARAITE, H. & MEYER, J.A., eds. *Proceeding of an International Symposium. Diseases of Tropical Food Crops*. Belgium, 1978. p.103-17.
- MOSTADE, J.M. & BUTARE, I. Symptomatology et épidémiologie de la necrose bacterienne du manioc causée par *Xanthomonas cassavae* au Rwand. In: MARAITE, H. & MEYER, J.A., eds. *Proceeding of an International Symposium. Diseases of Tropical Food Crops*. Belgium, 1978. p.95-101.
- MOUSTAFA, F.A. & WHITTENBURY, R. A comparison of some phytopathogenic and nonphytopathogenic *Pseudomonas*. *Phytopathol. Z.*, 67:63-72, 1970.
- NORMANHA, E.S. A mandioca no Brasil e no mundo. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. I Curso Intensivo Nacional de Mandioca. Cruz das Almas, 1976. v.1, p.9-21.

- PALMER, B.C. & CAMERON, H.R. Comparison of plant-pathogenic *Pseudomonas* by disc-gel electrophoresis. *Phytopathology*, 61:984-6, 1971.
- PEREIRA, A.L.G.; ZAGATTO, A.G. & FIGUEIREDO, M.B. Preservação e virulência de bactérias mantidas em água destilada. *O Biológico*, 36:311-4, 1970.
- PHILLIPS, T.P. Cassava utilization and potential markets. Ottawa, Int. Devel. Res. Centr., 1974. 50p.
- ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D.; KIMURA, O. & AKIBA, F. Variações em *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet & Bondar) Starr. *R. Soc. Bras. Fitopatol.*, 5:67-75, 1972.
- ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. & KIMURA, O. Sobre a posição sistemática de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel et al. 1948, agente causal da "mancha-bacteriana" das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.). *Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro*, 4(1):11-4, 1974.
- SABET, K.A. Studies in the bacterial diseases of Sudan crops. Bacterial leaf blight disease of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Ann. Appl. Biol.*, 47:49-56, 1959.
- SCHAAD, W.C. Comparative immunology of ribosomes and disc gel electrophoresis of ribosomal proteins from *Erwinia*, *Pectobacteria*, and other members of the family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24(1):42-53, 1974.
- SHEKHAWAT, G.S. & RUDOLPH, K. Protein and hydrolytic enzymes patterns of three soft rot *Erwinia*s, obtained by disc-gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathol. Z.*, 93:348-58, 1978.
- SMITH, J.M. & POWELL, D. A disc electrophoresis comparison of protein patterns of *Erwinia amylovora* with other bacteria, including associated yellow forms. *Phytopathology*, 58:972-5, 1968.
- STOLP, H.S.; STARR, M.P. & BAIGENT, N.L. Problems in speciation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3:231-64, 1965.
- TOMINAGA, T.; ACHMAD, N.H.; NISHIYAMA, K. & EZUKA, A. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet and Bondar) Starr, the cause of cassava bacterial blight in Indonesia. Bogor, Contr. Centr. Res. Inst. Agric., 1978. 16p.
- WIEHE, P.O. & DOWSON, W.J. A bacterial disease of cassava (*Manihot utilissima*) in Nyasaland. *Emp. J. Exp. Agric.*, 21:140-3, 1953.
- WILLIAMS, R.J.; AGBOOLA, S.D. & SCHNEIDER, R. W. Bacterial wilt of cassava in Nigéria. *Plant Dis. Rept.*, 57:824-7, 1973.
- YOUNG, J.M.; DYE, D.M.; BRADBURY, J.F.; PANAGOPOULUS, C.G. & ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z.J. Agric. Res.*, 21:153-77, 1978.