

Análise da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro

Maria Paula Nunes¹, Angela Mehta², Paulo Hugo Aguiar³, Edivaldo Cia⁴, Maria Angélica Pizzinato⁴, Ederaldo José Chiavegato⁴, Yeshwant Ramchandra Mehta¹

¹IAPAR, C.P. 481, Londrina, PR; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia PqEB Av W/5 Norte Final, Brasília, DF; ³Fundação MT, C.P. 79, Rondonópolis, MT; ⁴IAC, C.P. 28, Campinas, SP. ⁵ESALQ/USP Av. Pádua Dias, 11 CP 9, Piracicaba - SP

Autor para correspondência: Yeshwant R. Mehta E-mail: ymehta@iapar.br

Data de chegada: 25/04/2006. Aceito para publicação em: 05/04/2007

1356

RESUMO

Nunes, M.P.; Mehta, A.; Aguiar, P.H.; Cia, E.; Pizzinato, M.A., Chiavegato, E.J.; Mehta, Y.R. Análise da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.105-109, 2009

A mancha angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), é uma doença de importância econômica e pode causar perdas apreciáveis no rendimento. A doença pode ser controlada por resistência varietal desde que haja conhecimento sobre a variabilidade das populações do patógeno. A variabilidade genética e a estabilidade patogênica entre os isolados deste patógeno não foram suficientemente estudadas, principalmente considerando a introdução de novas cultivares e a expansão da cultura. O objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética entre os 61 isolados de Xam, provenientes de diversas cultivares e

regiões do Brasil, através de ensaios moleculares. Análises de ERIC e REP-PCR demonstraram dois grupos distintos de Xam associados a região geográfica de origem. Não foram observadas diferenças nos perfis dos isolados através de PCR-RFLP da região 16S-23S rDNA. A região espaçadora 16S-23S rDNA de três linhagens de Xam foi analisada através de clonagem e sequenciamento e seis diferenças nas seqüências foram encontradas. A técnica de RAPD revelou um maior nível de polimorfismo, distinguindo 6 grupos de Xam a 85% de similaridade. Os resultados indicam a existência de variabilidade muito restrita entre os isolados analisados.

Palavras-chave adicionais: *Gossypium hirsutum*, mancha angular, análise molecular.

ABSTRACT

Nunes, M.P.; Mehta, A.; Aguiar, P.H.; Cia, E.; Pizzinato, M.A., Chiavegato, E.J.; Mehta, Y.R. Analysis of genetic diversity among the isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* of cotton. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.105-109, 2009

Angular leaf spot or black arm of cotton, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), is a disease of economic importance. The disease can be controlled by using resistant cultivars if the knowledge regarding the genetic variability of the pathogen population is available. The genetic variability and the pathogen stability among the isolates of this pathogen have not been sufficiently studied, especially considering the introduction of new cultivars and the expansion of areas under cotton cultivation. The objective of the present study was to identify genetic variability among 61 isolates of Xam collected from different cultivars

and geographic regions. Analysis of ERIC and REP-PCR revealed two distinct groups of Xam based on the geographic region of isolation. PCR-RFLP of 16S-23S rDNA did not reveal differences in the restriction profiles of the isolates. The 16S-23S rDNA region of three isolates of Xam was also analysed by cloning and sequencing and 6 differences in the sequences were observed. The RAPD technique revealed a higher level of polymorphism and distinguished 6 groups of Xam. The results indicate a very narrow genetic variability among Xam isolates used in this study.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, angular leaf spot, molecular analysis

A mancha angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), é uma doença de importância econômica e pode causar perdas apreciáveis no rendimento da cultura (3, 15). A doença vem aumentando gradativamente desde o início da década de 1990 e, em anos recentes, tornou-se uma das doenças mais importantes do algodoeiro no Brasil. A doença pode ser controlada através de resistência varietal, desde que o conhecimento sobre a variabilidade dentro das populações do patógeno esteja disponível. A variabilidade genética e a estabilidade patogênica entre os isolados deste patógeno não foram suficientemente estudadas, principalmente considerando a introdução de novas cultivares do algodoeiro e a expansão da cultura em novas áreas. A avaliação da variabilidade genética

dentro da população do patógeno baseada na análise de DNA pode auxiliar nos testes de germoplasma de ampla adaptabilidade para resistência contra todas as raças ou patótipos ocorrendo ao longo das regiões produtoras de algodão do país.

Técnicas moleculares, tais como rep-PCR, RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e PCR-RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") da região 16S-23S rDNA, têm sido predominantemente utilizadas para a análise da diversidade genética de diferentes microrganismos e têm distinguido com sucesso linhagens em nível específico e intra-específico (9). Rep-PCR é um método rápido e altamente reprodutível, que envolve amplificação por PCR utilizando *primers* que amplificam seqüências repetitivas conhecidas

como “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC) e elementos “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP). O estudo da região 16S-23S ribossomal é outra abordagem muito utilizada para a distinção de espécies e patovares (1, 5, 13) e devido a sua maior variabilidade em relação aos genes de rRNA, essa região tem sido preferencialmente analisada. Em *Xanthomonas*, espécies têm sido distinguidas utilizando esta abordagem (6). A técnica de RAPD é outra técnica muito utilizadas para estudos de variabilidade genética e tem sido aplicada na distinção de linhagens de diferentes grupos de procariontos (2, 8).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética entre 61 isolados de Xam, provenientes de diversas cultivares e regiões do Brasil, através de Rep-PCR, PCR-RFLP e sequenciamento da região espaçadora 16S-23S rDNA e RAPD.

MATERIALE MÉTODOS

Linhagens de Xam. Uma prospeção foi realizada nos campos comerciais de algodoeiro dos estados de Goiás (GO), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) e Paraná (PR), entre 1999 e 2002, abrangendo diversas cultivares e regiões, para garantir a maior representatividade possível da população do patógeno ocorrendo no Brasil. Amostras de folhas com sintomas típicos da mancha angular foram coletadas e utilizadas para isolamento e identificação. Um total de 61 isolados de Xam foram obtidos (Tabela 1). A patogenicidade destes isolados foi confirmada em casa de vegetação em três cultivares suscetíveis do algodoeiro (ITA 90, Saturno e IAPAR 71). A inoculação foi realizada em folhas utilizando-se o isolado 13603 em uma concentração de 10^6 UFC/ml com a técnica de palito (3).

Extração de DNA. Os isolados foram cultivados por 24 h em meio nutriente líquido e as células foram lavadas e suspendidas em tampão TAS (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0). Proteinase K (150 mg mL^{-1}) e SDS 1% foram adicionados e a suspensão bacteriana foi incubada a 50°C por 1 h. Após este período, foram adicionados 500 mL de fenol e a suspensão foi centrifugada por 5 min a $14.000 \times g$. O sobrenadante foi recuperado e após a adição de 500 mL de clorofórmio, os tubos foram centrifugados por 5 min a $14.000 \times g$. O sobrenadante foi dialisado em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,8) por 48 h. O DNA foi quantificado através de DyNa Quant 200 Fluorometer (GE Healthcare) e a qualidade confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Amostras de DNA foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) para uma concentração de 20 ng mL^{-1} e estocadas a -20°C . O RNA foi eliminado utilizando-se RNase ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

Análise de rep-PCR. Os *primers* ERIC e REP (9) foram utilizados para amplificar o DNA dos 61 isolados. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 mL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 200 mM de dNTP, 1,3 mL de BSA (1%), 50 picomoles de cada *primer*, 25 ng de DNA genômico e 1 U de *Taq* polymerase (GE Healthcare). A amplificação foi realizada termociclador MJ PTC 100 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA), nas seguintes condições: para ERIC-PCR: 7 min a 95°C , seguida de 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94°C , anelamento de 1 min a 52°C , extensão de 8 min a 65°C , e uma extensão final de 16 min a 65°C ; e para REP-PCR: 6 min a 95°C , seguida de 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94°C , anelamento de 1 min a 40°C , extensão de 8 min a 65°C , e uma extensão final de 16 min a 65°C . Os produtos

amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE, e corados com brometo de etídio. Os dados foram analisados considerando a presença e ausência das bandas. A matriz de distância foi construída através do método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”), utilizando o coeficiente de Jaccard, com o programa NTSYS-pc, versão 1.8 (14).

PCR-RFLP da região 16S-23S rDNA. A diversidade genética entre os isolados de Xam foi também estudada por PCR-RFLP da região 16S-23S rDNA, utilizando-se os *primers* FGPS 1490 5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3' e FGPS 132 5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG - 3', representando regiões conservadas de *Xanthomonas* spp (7). As condições de amplificação utilizando termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA), foram: um ciclo de 4 min a 94°C , seguido por 40 ciclos de 30 s a 94°C , 30 s a 65°C e 1 min a 72°C . Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II, *Hinf* I, *Hae* III, *Eco* RI e *Alu* I segundo as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas em gel de agarose (3%) contendo brometo de etídio. Todas as reações foram repetidas pelo menos uma vez para confirmar os resultados. O dendrograma de similaridade foi construído conforme descrito para Rep-PCR.

Sequenciamento. Os produtos amplificados da região 16S-23S rDNA de três isolados representando grupos distintos de ERIC/REP-PCR, foram clonados utilizando “p-GEM T-easy cloning kit” (Promega, Madison, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando “big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit” (Perkin Elmer), em um seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. As seqüências da região 16S-23S rDNA dos isolados 13403, 13362 e 11999 foram depositadas no GenBank sob os números de acesso AY527209, AY527210 e AY527211, respectivamente.

RAPD. Entre os 51 *primers* testados contra seis isolados escolhidos ao acaso, quatro revelaram um maior número de bandas e foram selecionados para os ensaios de RAPD. Os *primers* utilizados foram OP1-2 GGAGGAGAGG, OP1-3 CAGAAGCCCA, OP1-9 TGGAGAGCAG, OPX-3 TGGCGCAGTG. Amplificações foram realizadas conforme Mehta (10). As reações de amplificação foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose e visualizados em luz U.V. após coloração com brometo de etídio. Os dados foram analisados conforme descrito para Rep-PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade genética de 61 isolados de Xam foi avaliada através das técnicas de Rep-PCR, PCR-RFLP da região 16S-23S rDNA e RAPD. Na análise de rep-PCR, foram utilizados os *primers* ERIC e REP (9, 11, 12) que revelaram perfis complexos de bandas para cada isolado. Nas análises por ERIC-PCR, o número de bandas variou de cinco a oito e o tamanho de 0,2 a 2,0 kb (Figura 1A). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando os *primers* REP, que revelaram perfis de 5 a 7 bandas de 0,3 e 2,0 kb (Figura 1B). Um dendrograma foi construído utilizando os dados combinados de ERIC- e REP-PCR e um baixo nível de polimorfismo (<30%) foi detectado. A aproximadamente 85% de similaridade, 2 grupos principais de Xam foram revelados (Figura 2). O primeiro grupo foi formado pela maioria dos isolados provenientes do MT e de GO, enquanto que o segundo foi formado principalmente por isolados de SP. Três dos quatro isolados

Tabela 1. Origem dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* utilizados no presente trabalho.

Isolado	Código IAC	Código IAPAR	Isolado(IAPAR)	Cultivar	Origem(Local/Estado/Ano)	Patogenicidade**
1*		11999		IAC 20	Londrina/PR/1985	+
2		13355		ITA 90	Desconhecida./MT/2000	+
3		13360		ITA 96	Desconhecida./MT/2001	+
4*		13362		ITA 90	Desconhecida./MT/2001	+
5*		13403		IAC 20 (semente)	Desconhecido/SP/2001	+
6		13570		ITA 90	Itiquira/MT/2002	+
7		13572		Maquina	Costa Rica-MT	+
8		13600		Sicala 32	Ituverava/SP/2002	+
9		13601		Maquina	Miguelópolis/SP/2002	+
10		13603		Delta Opal	Ituverava/SP/2002	+
11		13605		Valentin	Desconhecida	+
12		13606		CNPA ITA 90	Votuporanga/SP/2002	+
13		13608		PR 99-64	Ituverava/SP/2002	+
14		13609		Epamig. Precoce	Ituverava/SP/2002	+
15		13831		ITA 90	Primavera do Leste/MT/2002	+
16		13832		ITA 90	Campo Verde/MT/2002	+
17		13833		ITA 90	Porterão/GO/2002	+
18		13835		ITA 90	Campo Verde/MT/2002	+
19		13836		ITA 90	Campo Verde/MT/2002	+
20		13837		Saturno	Campo Verde/MT/2002	+
21		13838		IAC-24	Serra de Petrovina/MT/2002	+
22		13839		ITA 90	Itiquira/MT/2002	+
23		13840		ITA 90	Serra de Petrovina/MT/2002	+
24		13841		ITA 90	Serra de Petrovina/MT/2002	+
25		13842		Maquina	Itiquira/MT/2002	+
26		13843		Maquina	Rondonópolis/MT/2002	+
27		13844		ITA 90	Itiquira/MT/2002	+
28		13848		Maquina	Itiquira/MT/2002	+
29		13851		ITA 90	Serra de Petrovina/MT/2002	+
30		13852		Makina	Serra de Petrovina/MT/2002	+
31		13853		Desconhecida	Itiquira/MT/2002	+
32		13856		Saturno	Rondonópolis/MT/2002	+
33		13858		Saturno	Rondonópolis/MT/2002	+
34		13861		ITA 90	Serra de Petrovina/MT/2002	+
35		15219		ITA 90	Santa Helena/GO/2002	+
36		15230		ITA 90	Deciolândia/MT	+
37		15231		ITA 90	Deciolândia/MT	+
38		15232		ITA 90	Deciolândia/MT	+
39		15233		ITA 90	Deciolândia/MT	+
40		15235		Maquina	Deciolândia/MT	+
41		15236		ITA 90	Deciolândia/MT	+
42	2260	15244		Desconhecida	Campinas/SP/1976	+
43	11619	15250		Desconhecida	Ituverava/SP/2000	+
44	11633	15251		Desconhecida	Miguelópolis/SP/2000	+
45	11571	15252		Desconhecida	Ituverava/SP/2000	+
46	11568	15253		Desconhecida	Miguelópolis/SP/2000	+
47	11582	15254		Desconhecida	Tatui/SP/2000	+
48	12074	15255		Desconhecida	Ribeirão Preto/SP/2000	+
49	12080	15256		Desconhecida	Tietê/SP/2000	+
50	12115	15257		Desconhecida	Mococa/SP/2001	+
51	12391	15259		Desconhecida	Votuporanga/SP/2002	+
52	12359	15260		Desconhecida	Leme/SP/2002	+
53	12392	15261		Desconhecida	Ituverava/SP/2002	+
54	12393	15262		Desconhecida	Ituverava/SP/2002	+
55	12397	15263		Desconhecida	Ituverava/SP/2002	+
56	12399	15264		Desconhecida	Miguelópolis/SP/2002	+
57	12400	15265		Desconhecida	Ituverava/SP/2002	+
58		8754R		IAC 20	Maringá, PR	+
59		8759R		IAC 17	Londrina/PR/2001	+
60		13560R		IAC 97/86	Londrina/PR/2001	+
61		13403R		IAC 20 (semente)	Desconhecida/SP/2001	+

*ITS clonado e seqüenciado; **A patogenicidade foi testada em plântulas de três cultivares suscetíveis (IAPAR 71, Saturno e ITA90); + = reação positiva

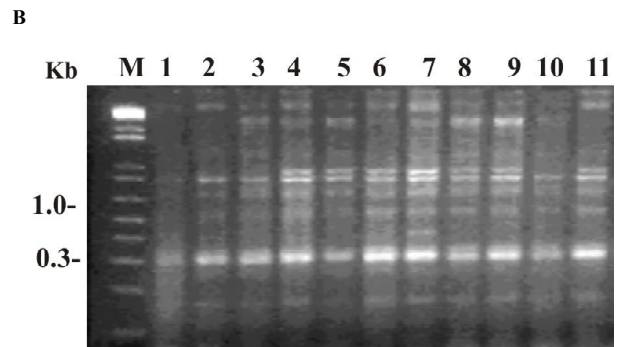
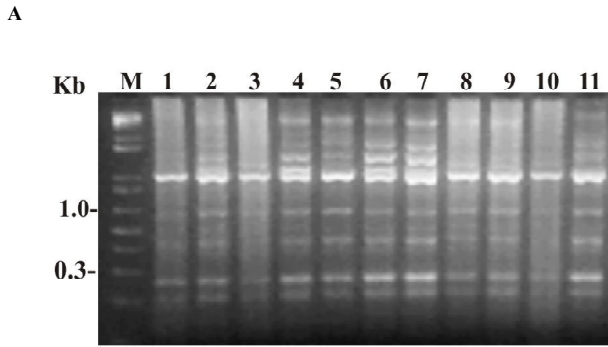


Figura 1. Amplificação por ERIC- (A) e REP-PCR (B) dos isolados 1 a 11 de Xam. M, ladder 1 kb (Invitrogen).

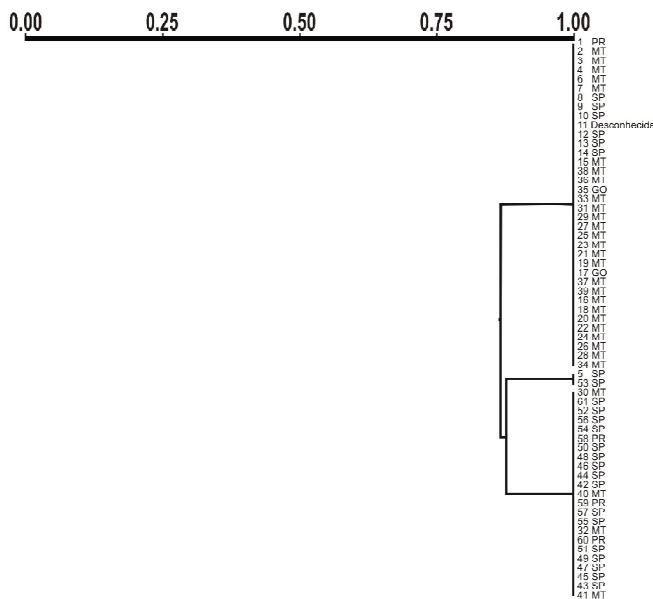


Figura 2. Dendrograma baseado na análise combinada dos primers ERIC1/ERIC2 e REP1/REP2, para 61 isolados de Xam.

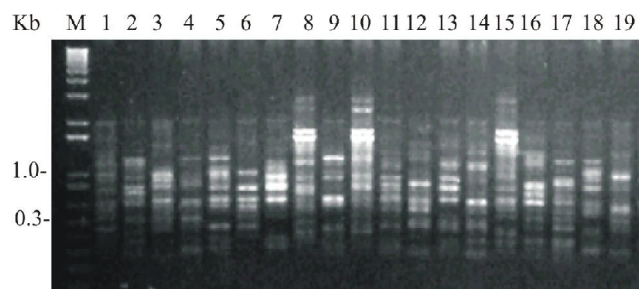


Figura 3. Amplificação por RAPD-PCR dos isolados 1 a 19 de Xam utilizando o primer OP1-3. M, ladder 1 kb (Invitrogen).

do PR apresentaram maior similaridade aos de SP, provavelmente devido à maior proximidade geográfica entre os dois Estados. Um baixo nível de polimorfismo tem sido encontrado na análise de diversidade intrapatovar de diferentes patovares de *Xanthomonas* (9), entretanto, a distinção de isolados baseada na região geográfica de isolamento tem sido relatada (9).

Os isolados de cada grupo revelado neste estudo apresentaram perfis idênticos de ERIC e REP-PCR. Resultados semelhantes foram obtidos para *X. campestris* pv. *vesicatoria* (9) e indicam uma estabilidade no perfil associado a região geográfica, dando suporte à utilização de ERIC- e REP-PCR como ferramenta de diagnóstico em patologia de plantas.

A região espaçadora 16S-23S rDNA foi também analisada nos 61 isolados de Xam e o produto de amplificação apresentou um tamanho de fragmento de aproximadamente 950 pb para todos os isolados. A região 16S-23S rDNA amplificada foi clivada com cinco enzimas de restrição, sendo que a enzima *Bgl* II não digeriu os fragmentos de nenhum isolado. Os perfis obtidos com as enzimas *Alu*I, *Dra*I, *Eco*R1 e *Hind* III, que clivaram a região espaçadora, não revelaram diferenças no padrão de restrição dos 61 isolados. Nas digestões com a enzima *Alu*I, foram observadas duas bandas de aproximadamente 300 pb,

uma banda de 220 pb e uma terceira de 100 pb. O perfil de restrição com *Eco*R1 revelou duas bandas, uma de 650 pb e a outra de 300 pb, enquanto que, com *Hind* III, foram observadas duas bandas de 600 pb e de aproximadamente 300 pb, e com *Dra* I duas bandas sendo uma de 850 pb e outra de 100 pb. Embora a região 16S-23S rDNA seja muito conservada para alguns patógenos e muito variável para outros, os resultados da análise da região espaçadora 16S-23S rDNA, indicam a existência da variabilidade muito estreita entre os isolados de Xam no Brasil.

A região 16S-23S rDNA de três linhagens de Xam (Tabela 1), representando os 2 grupos distintos revelados em Rep-PCR, foi também analisada através de clonagem e sequenciamento e algumas diferenças nas seqüências foram encontradas. Seqüências parciais da região 16S-23S rDNA de 420 pb foram obtidas e alinhadas utilizando o programa Clustal W. Diferenças em 6 bases foram observadas, representando uma variação total de aproximadamente 1,4%. Gonçalves & Rosato (6) analisaram as seqüências da região 16S-23S rDNA de 17 espécies de *Xanthomonas* e encontraram um nível de variação de 1% a 37%. Os resultados obtidos neste estudo mostram o alto nível de conservação da região 16S-23S rDNA entre os isolados analisados.

A técnica de RAPD representa uma outra alternativa para a distinção de isolados muito semelhantes (16) e portanto esta abordagem foi também utilizada para o estudo da diversidade genética dos 61 isolados de Xam. Entre os 14 produtos de amplificação gerados utilizando quatro primers, oito foram polimórficos. O número de bandas por perfil obtido variaram de 8 a 14 e os tamanhos de 0.1 a 2.0 Kb (Figura 3). Um dendrograma foi construído utilizando os dados combinados dos 4 primers (Figura 4). Foi observado que 75% dos isolados formaram um grupo com aproximadamente 85% de índice de similaridade. Os demais isolados formaram grupos distintos, sendo que um maior nível de polimorfismo foi obtido principalmente para os

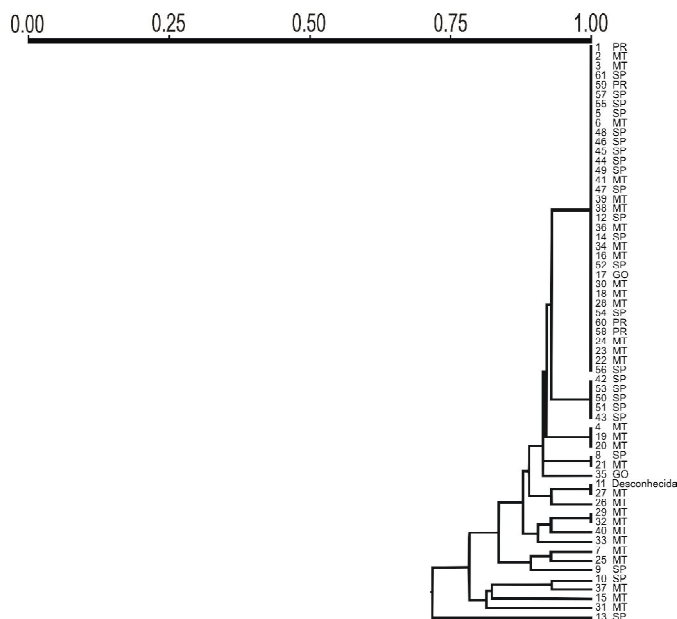


Figura 4. Dendrograma baseado na análise combinada dos dados obtidos utilizando os primers OP1-2, OP1-3, OP1-9 E OPX-3 de RAPD dos 61 isolados de Xam.

isolados de MT, com perfis únicos para vários isolados. A maioria dos isolados de SP apresentou perfil idêntico, indicando uma maior homogeneidade entre a população desta região. Embora um maior nível de polimorfismo tenha sido revelado em RAPD, não foi observado um agrupamento claro relacionado à região geográfica, como obtido em rep-PCR.

Os resultados permitem concluir que há uma variação restrita entre os isolados de Xam analisados, mesmo entre os mais antigos isolados ou aqueles provenientes de regiões geograficamente diferentes. A ocorrência de raças de Xam tem sido reportada (4) e o estudo da diversidade genética entre essas diferentes raças poderá revelar informações relevantes. Essas informações são de fundamental importância para a tomada de decisões quanto a necessidade de utilização de muitos isolados para inoculação de materiais genéticos dos programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes a este patógeno.

AGRADECIMENTOS

A presente investigação foi financiada pela FACUAL, MT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barry, T.G.; Colleran, G.; Glennon, M.; Dunican, L.; Gannon, F. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to

identify eubacteria. **PCR Methods Applications**, Nova Iorque, v. 1, p.51-56, 1991.

2. Cave, H.; Bingen, E.; Elion, J.; Denamur, E. Differentiation of *Escherichia coli* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Research Microbiology**, Paris, v. 145, p.141-150, 1994.

3. Cia, E.; Balmer, E.; Ferraz, C.A.M.; Gridi-Papp, I.L.; Paradelo Filho, O. Variabilidade de *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson, no Estado de São Paulo. **Anais Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba**, v. 30, p.457-463, 1973.

4. Cia, E.; Salgado, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: Manual de Fitopatologia 331-341 (Eds Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L.) São Paulo Agronomica Ceres.

5. Dolzani, L.; Tonin, E.; Lagatolla, C.; Monti-Bragadin, C. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **FEMS Microbiology Letters**, Escócia, v. 119, p. 167-174, 1994.

6. Gonçalves, E.R.; Rosato, Y.B. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p.355-361, 2002.

7. Honeycutt, R.J.; Sobral, B.W.S.; McClelland, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3229-3239, 1995.

8. Lawrence, L.M.; Harvey, J.; Gilmour, A. Development of a random amplified polymorphic DNA typing method for *Lysteria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 3117-3119, 1993.

9. Louws, F. J.; Fulbright, D. W.; Stephens, C. T.; Brujin, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2286-2295, 1994.

10. Mehta, Y.R. Molecular and pathogenic variability of *Drechslera* isolates from oats. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 590-596, 2001.

11. Mehta, Y.R.; Mehta, A.; Rosato, Y.B. ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton and tomato. **Current Microbiology**, Reading, v. 44, p. 323-328, 2002a.

12. Mehta, A.; Mehta, Y.R.; Rosato, Y.B. ERIC and REP primers amplify arbitrary repetitive regions in the genomes of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Escócia, v. 211, p. 51-55, 2002b.

13. Mehta, A.; Rosato, Y. B. Phylogenetic relationships of *Xylrella fastidiosa* strains from different hosts based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 311- 318, 2001.

14. Rohlf, F.J. **NTSYS-pc**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50. New York: Exeter, 1989.

15. Ruano, O.; Mohan, S.K. Nova raça de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smithy) Dye no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 439-442, 1982.

16. Wang, G.; Whittam, T.S.; Berg, C.M.; Berg, D.D. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, p. 5930-5933, 1993.