

Boletim de Pesquisa 47
e Desenvolvimento ISSN
Novembro, 2003

**Diversidade genética em *Drechslera avenae*
e
Stemphylium solani utilizando ERIC- e REP-PCR**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**Conselho de Administração**

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe -Geral

Clra de Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 47**

**Diversidade genética em *Drechslera avenae*
e
Stemphylium solani utilizando ERIC- e REP-PCR**

Angela Mehta

Yeshwant R. Mehta

Yoko B. Rosato

Brasília, DF
Novembro - 2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Maurício Machaim Franco

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Maria Alice Bianchi

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Arthur da Silva Mariante

Maria Fátima Batista

Supervisor Editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Altevir de Carvalho Freitas

Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

M 498 Mehta, Angela.

Diversidade genética em *Drechslera avenae* e *Stemphylium solani* utilizando ERIC- e REP-PCR / Angela Mehta, Yeshwant R. Mehta, Yoko B. Rosato. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

16 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, 1676-1340; 47)

1. *Drechslera avenae* 2. *Stemphylium solani* 3. ERIC- 4. REP-PCR I. Mehta, Yeshwan R. II. Rosato, Yoko B. III. Título IV. Série.

CDD 579.5

Sumário

Resumo	5
Introdução	6
Materiais e Métodos	7
Resultados e Discussão	9
Referências Bibliográficas	12

Resumo

A técnica de ERIC e REP-PCR tem sido muito utilizada para acessar a diversidade genética em bactérias, e tem distinguido isolados geneticamente semelhantes. Em fungos, esta abordagem também tem sido empregada, entretanto, a homologia e seqüência dos fragmentos amplificados nestes organismos não são conhecidos. No presente estudo, as relações de homologia entre os fragmentos amplificados através dos primers ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e REP (Repetitive Extragenic Palindromic) em *Drechslera avenae* e *Stemphylium solani*, foram investigadas através de hibridização seguida de sequenciamento de DNA. O objetivo deste estudo foi caracterizar os produtos de amplificação obtidos por ERIC e REP-PCR e verificar a homologia entre eles. Os padrões de bandas obtidos foram transferidos para membranas de náilon e um total de 16 fragmentos, sendo quatro de ERIC e quatro de REP de cada fungo, utilizados como sonda. A hibridização e o sequenciamento revelaram um baixo nível de similaridade entre os fragmentos, indicando que as regiões amplificadas por estes primers não são repetitivas e que os primers anelam em regiões aleatórias nos genomas de *D. avenae* and *S. solani*.

Palavras chave: *Drechslera avenae*, *Stemphylium solani*, ERIC- e REP-PCR, diversidade genética

1. Introdução

Várias técnicas baseadas em PCR como RAPD e rep-PCR tem sido cada vez mais utilizadas para acessar a diversidade genética de microrganismos. ERIC e REP-PCR são métodos rápidos e altamente reprodutíveis, que envolvem amplificação por PCR utilizando primers que amplificam seqüências repetitivas conhecidas como “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC) e elementos “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP). Essas seqüências repetitivas foram inicialmente descritas em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Stern et al., 1984; Versalovic et al., 1991) e têm sido muito utilizadas para a caracterização de bactérias fitopatogênicas (Lows et al., 1999). Estes primers têm sido empregados para estudos de diversidade genética em fungos, e têm distinguido isolados geneticamente semelhantes. Entretanto, a homologia e seqüência dos fragmentos amplificados em fungos não são conhecidas. Os elementos ERIC e REP não foram descritos em fungos (Gillings & Holley, 1997) e portanto, a caracterização dos produtos amplificados é necessária para a compreensão da diversidade genética encontrada entre os isolados e espécies de fungos. O presente estudo foi conduzido para caracterizar os elementos amplificados em fungos utilizando os primers ERIC e REP, uma vez que estas técnicas representam uma importante ferramenta para estudos de diversidade genética nestes organismos.

Isolados de *Drechslera avenae* e *Stemphylium solani* associados com helmintosporiose da aveia branca (*Avena sativa*) e mancha preta do algodão (*Gossypium hirsutum*), respectivamente, foram previamente caracterizados utilizando ERIC e REP-PCR (Mehta, 2001). Neste trabalho, estudos foram realizadas para caracterizar as regiões amplificadas pelos primers ERIC e REP nos genomas de *D. avenae* e *S. solani* e para compreender as relações de homologia entre os produtos amplificados.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados de *D. avenae* e *S. solani*

Vinte e quatro isolados monospóricos de *D. avenae* e 33 de *S. solani* (28 de algodão e 5 de tomate) foram utilizados neste estudo (Tabela 1 e Tabela 2). Um isolado de *Alternaria macrospora* foi também incluído para comparação, uma vez que a mancha preta do algodão foi erroneamente identificada como *Alternaria* pois os sintomas causados por *S. solani* e *A. macrospora* são semelhantes. Todos os isolados foram obtidos da coleção de culturas do IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná, PR).

2.2. Extração de DNA

As culturas de fungos foram cultivadas no escuro em batata dextrose em um shaker por quatro dias a 21° C. Micélio foi filtrado em papel Whatman No. 1, lavado duas vezes em tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) e o DNA total foi extraído conforme Raeder & Broda [6]. O DNA foi quantificado pelo DyNa Quant 200 Fluorometer (Pharmacia) e o RNA foi eliminado através de RNase (10 µg mL⁻¹).

2.3. ERIC- e REP-PCR

Os primers ERIC1R/ERIC2 e REP1R-I/REP2-I foram utilizados para amplificar o DNA de todos os isolados dos fungos. As seqüências dos primers foram ERIC1R - 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGTTCAC-3'; ERIC2 - 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'; REP1R-I 5'-IIICGICGICATCIGGC-3'; REP2-I - 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1.3 µl de BSA (albumina sérica bovina 1%), 50 pmoles de cada primer, 100 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* polymerase (Pharmacia, USA). As amplificações foram realizadas em um Termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, MA, USA) de acordo com

Louws et al. (1994) e os produtos de PCR (25 μ l) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1.8% e corados com brometo de etídio.

2.4. Hibridização

Os produtos amplificados de todos os isolados utilizando os primers ERIC e REP foram transferidos para membranas de náilon e utilizados para hibridização ("Southern Blot"). Quatro fragmentos de ERIC (E200, E1200, E800 e E600) e quatro de REP (R2500, R1200, R800 e R500) do isolado de *D. avenae* No. 15 foram excisados do gel de agarose, marcados com digoxigenina (DNA labeling kit, Boehringer-Mannheim) e utilizados como sonda. O mesmo procedimento foi realizado para quatro fragmentos de ERIC (E2500, E1200, E900 e E700) e quatro de REP (R2300, R1300, R1200 e R600) amplificados do isolado de *S. solani* No. 28. Um tampão de hibridização contendo 50% formamida, 5X SSC (0.15 M Na Citrate; 1.5 M NaCl, pH 7.0), N-laurylsarcosine (0.1%), SDS (0.02%) e solução bloqueadora (2%) foi utilizado e as hibridizações realizadas a 42° C overnight. As membranas foram lavadas a 68° C em uma solução contendo 0.1 X SSC e 0.1% SDS. As bandas foram reveladas utilizando o substrato quimioluminescente CSPD (Boehringer-Mannheim) e o sinal foi visualizado através de exposição em um filme de raio-X (Kodak).

2.5. Sequenciamento dos fragmentos de ERIC e REP amplificados

Quatro fragmentos de ERIC e quatro de REP, sendo dois de *D. avenae* e dois de *S. solani*, foram clonados utilizando pGEM T-easy cloning kit (Promega). As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume total de 10 μ l contendo 800 ng de DNA, 5 pmoles de primer (M13 forward ou M13 reverse), 3 μ l de ABI PRISM big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer). As reações foram conduzidas com uma desnaturação inicial de 2 min a 95° C, seguida de 25 ciclos de 12 s a 95° C, 6 s a 50° C e 4 min a 60° C. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático (ABI PRISM™ 377, Perkin Elmer) e a busca da

homologia das seqüências foi realizada utilizando o programa BLAST (Altschul et al., 1990).

3. Resultados e Discussão

A amplificação dos 24 isolados de *D. avenae* utilizando os primers ERIC e REP revelou um total de 23 produtos de PCR. O número de bandas variou de 8 a 12 por isolado e os tamanhos de 200 a 4000 pb (Fig. 1). Quatro bandas de ERIC (E2000, E1200, E800 e E600) e quatro de REP (R2500, R1200, R800 e R500) foram selecionadas para serem utilizadas como sondas. As hibridizações revelaram um alto grau de homologia apenas aos fragmentos que correspondiam às sondas de ERIC e REP utilizadas (Fig. 1). Um baixo nível de homologia com outros fragmentos foi detectado quando os fragmentos E1200, R2500, R800 e R500 foram utilizados como sonda. Nenhum sinal de hibridização foi detectado para as bandas dos isolados No. 6 e No. 12, que revelaram perfis únicos de ERIC e REP.

A amplificação dos 34 isolados de *S. solani* utilizando os primers ERIC e REP revelaram um total de 42 produtos de PCR e o número de bandas variou de 6 a 11 por isolado e o tamanho de 200 a 5000 pb (Fig. 2). Quatro fragmentos de ERIC (E2500, E1200, E900 e E700) e quatro de REP (R2300, R1300, R1200 e R600) foram utilizados como sonda. Como em *D. avenae*, um alto nível de homologia foi obtido apenas para os fragmentos correspondentes às sondas de ERIC e REP utilizadas (Fig. 2). Um baixo grau de homologia com outros fragmentos foi também observado em algumas hibridizações, utilizando as sonda E1200, E900, E700, R2300 e R1300. Os fragmentos amplificados dos isolados No. 1 e No. 2 mostraram um baixo grau de homologia com E900 e E700, entretanto, nenhuma homologia foi observada com as outras sondas utilizadas. Estes isolados foram também diferenciados através de RAPD-PCR e PCR-RFLP de rDNA (Mehta, 2001). *A. macrospora*, conforme esperado, não mostrou homologia com as sondas de ERIC ou REP utilizadas.

Devido a ausência de homologia entre os fragmentos gerados pelos primers ERIC e REP nos dois patógenos, alguns fragmentos foram sequenciados na tentativa de se identificar os produtos amplificados. Os fragmentos E1300, E600, R1100 e

R500 de *D. avenae* e E1200, E700, R1200 e R950 de *S. solani* foram clonados e parcialmente sequenciados. As seqüências dos fragmentos E1300d, E1300r, E600d, R1100d, R1100r, R500r, E1200d, E1200r, E700, R1200d, R1200r, R950d e R950r foram depositadas no Genbank com os números de acesso: AF416136, AF416137, AF4116138, AF4161133, AF416134, AF416135, AF416127, AF416128, AF416126, AF416129, AF416130, AF416131 e AF416132, respectivamente, sendo que d indica o sequenciamento utilizando o primer M13 direto e r, o primer M13 reverso. O fragmento de REP R500 de *D. avenae* e R1200 de *S. solani* apresentaram a seqüência do primer REP1R-I nas duas extremidades enquanto que os outros fragmentos de ERIC e REP apresentaram os dois primers (ERIC1R/ERIC2 e REP1R-I/REP2-I, respectivamente). Estes resultados mostram que os primers REP podem anelar de forma semelhante aos primers utilizados na técnica de RAPD, onde apenas um primer é necessário para a amplificação de regiões randômicas no genoma.

Buscas de similaridade nos bancos de dados foram realizadas na tentativa de se identificar as regiões sendo amplificadas com os primers ERIC e REP, entretanto similaridade significativa não foi observada. Até o presente momento, poucas seqüências de fungos estão disponíveis para comparação. Os genomas de várias espécies de fungos estão sendo sequenciados e uma vez terminados, os dados gerados poderão indicar se os fragmentos amplificados codificam produtos funcionais.

A ausência de similaridade entre os fragmentos indica que os primers devem estar anelando em regiões randômicas nos genomas destes fungos. Como a temperatura de anelamento é crítico em reações de PCR, temperaturas de anelamento mais altas (pelo menos 10°C mais alto que nas condições padrão) foram testados na amplificação de alguns isolados de *D. avenae* e *S. solani* utilizando os primers ERIC e REP. Apenas algumas bandas foram amplificadas quando ERIC-PCR foi realizado a temperaturas mais restritivas de 65° C (Fig. 3) indicando que erros no anelamento dos primers deve ser um evento comum. Resultados semelhantes foram obtidos por Gillings & Holley (1997). Estes autores compararam diferentes temperaturas de anelamento utilizando os primers ERIC e reportaram que mesmo em *E. coli* várias bandas não foram amplificadas em temperaturas de anelamento mais

altas. Quando uma temperatura de anelamento mais alta (50° C), foi utilizada em REP-PCR com isolados de *D. avenae* e *S. solani*, resultados semelhantes foram obtidos (Fig 3), indicando que erros no anelamento dos primers deve também ocorrer, como na amplificação utilizando os primers ERIC.

Embora erros no pareamento de primers pareçam ocorrer em ERIC e REP-PCR utilizando temperaturas de anelamento padrão, como ocorre em RAPD-PCR, os padrões revelados pelos primers ERIC e REP são altamente reprodutíveis, o que não é sempre obtido em RAPD. É possível que a maior reprodutibilidade seja decorrente do maior tamanho dos primers utilizados em ERIC e REP-PCR (20-22 mer contra 10 mer dos primers utilizados em RAPD).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os primers ERIC e REP amplificam regiões aleatórias nos genomas de *D. avenae* e *S. solani*, assim como ocorre na técnica de RAPD, e nenhuma relação foi encontrada entre as regiões amplificadas. Além disso, contrastando com a amplificação em bactérias, as regiões alvo para amplificação nestes fungos parece ser não codificante e não repetitiva. Entretanto, ERIC e REP-PCR é um método altamente reprodutível para a caracterização de espécies fúngicas e bacterianas. A técnica de ERIC e REP-PCR tem se mostrado útil para acessar a diversidade genética de isolados de diferentes hospedeiros e/ou localizações geográficas distintas (Mehta, 2002) e representa uma alternativa válida à técnica de RAPD permitindo fingerprinting de genomas com a utilização de poucos primers.

Agradecimentos

Prof. C. Kurozawa, UNESP, SP e Prof. C.A. Lopes, CNPAF-EMBRAPA, Brasília, por alguns isolados de *S. solani* de tomate. T.K.K. Tame, J.A. Oliveira, A. Souza, O. J. Souza, E.H. Ota, A. e J. R. Gea, pela assistência técnica.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p.17-21, 1997.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 85, p. 528-536, 1994.

LOWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.

MEHTA, Y. R. Genetic diversity among isolates of *Stemphylium solani* from cotton. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 703-709, 2001.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. ERIC and REP banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer region of *Stemphylium solani* of cotton. **Current Microbiology**, v. 44, p.323-328, 2002.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 6503-6508, 1985.

STERN, M. J.; AMES, G. F.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p.1015-1026, 1984

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

Tabela 1. Isolados de *Drechslera* spp. utilizados no presente estudo.

Isolado	Origem		Severidade da doença em casa de vegetação
	Localidade/Ano	Sintomas em campo*	
1	Palotina/1998	Mancha preta	3
2	Mauá/1998	Mancha preta	3
3	Mauá/1998	Mancha preta	3
4	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
5	Mauá/1998	Mancha preta	3
6	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
7	Mauá/1998	Mancha preta	2
8	Mauá/1998	Mancha preta	2
9	Mauá/1998	Mancha preta	3
10	São José/1998	Helmintosporiose	3
11	Sabáudia/1996	Mancha preta	3
12	Sabáudia/1996	Mancha preta	3
13	Mauá/1998	Mancha preta	3
14	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
15	Mauá/1998	Helmintosporiose	2
16	Mauá/1998	Mancha preta	2
17	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
18	Mauá/1998	Helmintosporiose	1
19	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
20	Castro/1996	Helmintosporiose	3
21	Mauá/1998	Helmintosporiose	3
22	Faxinal/1998	Helmintosporiose	3
23	Guarapuava/1997	Sementes infectadas	3
24	Passo Fundo, RS/1996	Helmintosporiose	1

*Mancha preta é caracterizada por lesões elípticas ou circulares com centro esbranquiçado, e com a margem marrom-escura, 2-3 cm em diâmetro, raramente >5 cm; helmintosporiose

é caracterizada por manchas elípticas de tamanho variável e sem a margem definida,

as vezes aparecendo como estrias longas de cor de palha.

**Inoculação artificial foi realizada em cv. suscetível IAC 7. A severidade da doença foi avaliada utilizando uma escala visual da porcentagem da área foliar infectada (AFI) entre 0-99

(1=pequenas pontuações negras<5% AFI; 2=lesões elípticas com ou sem clorose, AFI 6-25%;

3=lesões elípticas com clorose, AFI >26%). Isolados 1,2,3,9,12 e 16 produziram sintomas da mancha preta. Sintomas produzidos pelos demais isolados não foram distintivos.

Tabela 2. Isolados de *Stemphylium solani* utilizados no presente estudo

Isolado	Patogenicidade ^a	Hospedeiro	Origem	
			Localização/Estado	Cultivar
1	1	Tomate	Botucatu-SP	Desconhecida
2	3	Tomate	Botucatu-SP	Desconhecida
3	4	Algodão	Londrina-PR	Breeder's line
4	4	Algodão	São Pedro-PR	IAPAR-71
5	5	Algodão	Iracema d'Oeste-PR	IAPAR-71
6	4	Algodão	São Pedro-PR	IAC 20
7	5	Algodão	Ouro Verde d'Oeste-PR	IAPAR-71
8	4	Algodão	Desconhecido	Desconhecida
9	4	Algodão	Desconhecido	Desconhecida
10	4	Algodão	Maringá-PR	IAC 22
11	4	Algodão	Maringá-PR	IAPAR-71
12	3	Algodão	Maringá-PR	OC92-183
13	4	Algodão	Maringá-PR	PR 92-122
14	4	Algodão	Maringá-PR	IAC 20
15	5	Algodão	Desconhecido	Desconhecida
16	4	Algodão	Desconhecido	Desconhecida
17	4	Algodão	Londrina-PR	Breeder's line
18	3	Algodão	Londrina-PR	Breeder's line
19	4	Algodão	Formosa d'Oeste-PR	IAPAR-71
20	4	Algodão	Goioeré-PR	IAC 22
21	4	Algodão	Goioeré-PR	IAC 20
22	5	Algodão	Goioeré-PR	PR 92-122
23	4	Algodão	Juranda-PR	IAC 20
24	4	Algodão	Janinópolis-PR	Desconhecida
25	5	Algodão	Banderantes d'Oeste-PR	Desconhecida
26	4	Algodão	Jesuíta-PR	IAPAR-71
27	5	Algodão	Nova Aurora-PR	Desconhecida
28	5	Algodão	Terra Nova d'Oeste-PR	IAPAR-71
29	4	Algodão	GO	Desconhecida
30	4	Algodão	MT	ITA 91322
31 (CNP4)	0	Tomate	GO	Desconhecida
32 (CNP10)	0	Tomate	GO	Desconhecida
33 (CNP11)	1	Tomate	GO	Desconhecida
34	5	Algodão	MT (<i>Alternaria macrospora</i>)	CODETEC 401

^aA escala de severidade da doença entre 0 e 5 foi utilizada, onde: 0=sem sintomas da doença; 1=pequenas pontuações <5% da área foliar infectada (AFI); 2=manchas pequenas de coloração marrom sem clorose; 3=lesões necroticas com clorose, 26-50% AFI; 4=lesões necróticas, com clorose, coalescendo 51-75% AFI; 5=lesões grandes coalescendo com clorose, >75% AFI, folhas dessecadas e/ou morte das folhas. A patogenicidade foi testada em casa de vegetação na cultivar de algodão suscetível IAPAR-71.

Fig. 1. Produtos de amplificação de isolados de *D. avenae* utilizando os primers ERIC e REP e hibridizações com as sondas E2000, E1200, E800, E600, R2500, R1200, R800 e R500, conforme indicado. M, DNA ladder 1 kb (Gibco-BRL); m, DNA ladder 100 pb (Gibco-BRL).

Fig. 2. Produtos de amplificação de isolados de *S. solani* utilizando os primers ERIC e REP e hibridizações com as sondas E2500, E1200, E900, E700, R2300, R1300, R1200 e R600, conforme indicado. M, DNA ladder 1 kb (Gibco-BRL); m, DNA ladder 100 pb (Gibco-BRL).

Fig. 3. ERIC- e REP-PCR realizados utilizando temperaturas de anelamento de 65 °C e 50 °C, respectivamente. 6 e 14, isolados de *D. avenae*; 2 e 8, isolados de *S. solani*.