



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
Centro de Pesquisas do Cacau



BOLETIM TÉCNICO N° 196

OBTENÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA GENOTIPAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM GEL CORADO COM PRATA

*Karina Peres Gramacho
Ricardo Franco Cunha Moreira
Livia Santos Lima
Leila Santos Lima
Didier Clement*

2009

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Ministro: Reinhold Stephanes

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC

Diretor: Jay Wallace da Silva Mota

Superintendência Regional da Bahia (SUEBA)

Superintendente: Antônio Zózimo de Matos Costa

Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)

Chefe: Adonias de Castro Virgens Filho

Centro de Extensão (CENEX)

Chefe: Sergio Murilo Correia Menezes

Superintendência Regional da Amazônia Ocidental - SUPOC

Superintendente: Francisco das Chagas Sobrinho

Superintendência Regional da Amazônia Oriental - SUPOR

Superintendente: Raymundo da Silva Mello Júnior

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Centro de Pesquisas do Cacau

ISSN 0100-0845

**OBTENÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA GENOTIPAGEM
E ANÁLISE GENÉTICA DE *Moniliophthora*
perniciosa EM GEL CORADO COM PRATA**

***Karina Peres Gramacho
Ricardo Franco Cunha Moreira
Livia Santos Lima
Leila Santos Lima
Didier Clement***

BOLETIM TÉCNICO N° 196

Ilhéus - Bahia

2009

OBTENÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA GENOTIPAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM GEL CORADO COM PRATA

Karina Peres Gramacho¹, Ricardo Franco Cunha Moreira², Livia Santos Lima³, Leila Santos Lima⁴, Didier Clement⁵

RESUMO

Microssatélites constituem marcadores genéticos altamente informativos para estudos genéticos devido a sua natureza codominante, multialélica e pela ampla distribuição no genoma. Marcadores microssatélites (SSR) foram obtidos para *Moniliophthora perniciosa* a partir de seqüências de DNA genômico contidas no banco de dados deste fitopatógeno. Sessenta e quatro microssatélites com repetições de dois, três e quatro nucleotídeos foram amplificados utilizando-se *primers* especificamente desenhados para amplificar as regiões que flanqueiam os microssatélites, visualizados em gel de agarose 3% e posteriormente corados com nitrato de prata em gel de poliacrilamida 6%. Dos 64 pares de *primers* desenhados, 28 geraram produtos de amplificação, sendo que 12 *locos* foram polimórficos. Os microssatélites com repetições de tetranucleotídeos apresentaram o mais alto nível de polimorfismo. A média de heterozigosidade variou de 0,02 a 0,5. Quando isolados de *M. perniciosa* de diferentes biótipos foram utilizados, encontrou-se três SSR altamente polimórficos. A maioria dos pares de *primers* gerou produtos de amplificação a partir de DNA genômico de *Moniliophthora roreri*, outro importante patógeno do cacau, indicando uma possível transferibilidade e utilidade dos *primers* em estudos genéticos deste fitopatógeno. A utilização de marcadores microssatélites em *M. perniciosa* abre uma ampla perspectiva para a geração de dados precisos sobre estrutura e variabilidade genética, fluxo gênico e paternidade em populações e isolados deste fitopatógeno, assim como para outros microrganismos.

Palavras-chave: *Moniliophthora roreri*, vassoura-de-bruxa, marcadores moleculares

¹Eng^a. Agr^a., PhD, CEPLAC/CEPEC/SEFIT/Laboratório de Fitopatologia Molecular;

²Eng^o. Agr^o., Dr., Bolsista FAPESB; ³Eng^a. Agr^a., MSc., Doutoranda, UESC;

⁴Bolsista FAPESB, AT3; ⁵CIRAD/CEPEC

ABSTRACT

Obtention of microsatellite for genotyping and genetic of *Moniliophthora perniciosa* in silver stained gels

Microsatellite markers (SSR) constitute highly informative genetic markers for genetics studies due to their co-dominant and multiallelic nature and to their ample distribution in the genome. Microsatellites markers were developed to *M. perniciosa* from sequences of DNA contained in the database of fitopatógeno. Sixty four microsatellites with two, three and four repeats were amplified using primers specifically designed to amplify the regions flanking the microsatellites, viewed in 3% agarose gel and then stained with silver nitrate, polyacrylamide gel 6%. Of the 64 pairs of primers designed, 28 generated products of amplification, being that 12 locos had been polymorphic. The microsatellites with repetitions of tetranucleotides had presented the highest level of polymorphism. Average heterozygosity ranged from 0,02 to 0,50. When *M. perniciosa* isolated of different biotypes they had been used to found three SSR markers highly polymorphic. The majority of the primers generated products of amplification from genomic DNA of *Moniliophthora roreri*, another important pathogen of the cacao, indicating a possible transferability and utility these primers in genetic studies of this pathogen. The *M. perniciosa* SSR markers give ample perspectives regarding the acquisition of precise data concerning genetic structure and variability, gene flow and paternity in population and isolates of this pathogen, as well as for other microorganisms.

Key words: *Moniliophthora roreri*, witches' broom, molecular markers

INTRODUÇÃO

Microsatélites são seqüências simples de DNA repetidas em tandem e dispersas por todo o genoma eucarioto (HAMADA et al., 1982). Também conhecidas como SSR, estas repetições formam *locos* altamente polimórficos, constituindo-se numa das classes de marcadores moleculares mais informativos e polimórficos disponíveis atualmente.

As regiões contendo SSR são amplificadas individualmente pela técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) utilizando um par de *primers* específicos, com 20 a 30 pares de bases complementares a seqüências únicas que flanqueiam os microsatélites.

O polimorfismo observado a partir das seqüências amplificadas deve-se a presença de diferentes números de seqüências simples repetidas e distribuídas uniformemente ao acaso. Desse modo, cada *loco* genético de um microsatélite é altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Os diferentes tamanhos dos segmentos amplificados representam alelos diferentes em cada *loco* (Figura 1). As seqüências amplificadas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução para que possam ser individualizados os segmentos que diferem por poucos pares de bases. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio, nitrato de prata ou através de autoradiografia quando são utilizados *primers* marcados radioativamente ou por fluorescência na reação de PCR.

Marcadores SSR são ferramentas potencialmente valiosas para estudar a variação genética dentro de *loci*. Caracterizam-se por ser co-dominantes, o que permite a visualização de ambos os alelos de *locos* de indivíduos diplóides heterozigotos, facilmente detectáveis por PCR. O multialelismo e a co-dominância fazem com que os microsatélites sejam marcadores moleculares com elevado conteúdo de informação de polimorfismo, podendo ser usados para estudos de ligação e mapeamento genético além da identificação e

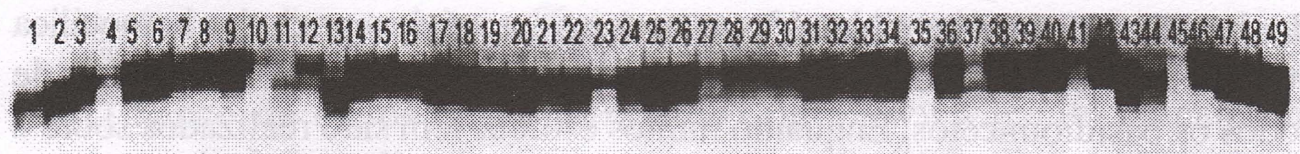


Figura 1 - Marcadores microsatélites de isolados de *Moniliophthora perniciosa* e *M. roreri* provenientes do Continente Americano obtidos com o primer msCEPEC-Cp22.

discriminação de genótipos e estudo de genética de populações. Outra característica importante dos microssatélites é a alta reprodutibilidade. Os pares de *primers*, normalmente, são específicos para uma espécie, de modo que os marcadores podem ser obtidos a partir de amostras evitando os problemas potenciais associados com os marcadores não específicos em amostras contaminadas.

ISOLADOS

O protocolo de desenvolvimento e de marcadores SSR para uma determinada espécie é muito trabalhoso e oneroso envolvendo etapas de construção de uma biblioteca genômica para o organismo de interesse, seleção dos clones que contenham microssatélites utilizando-se sondas sintéticas complementares aos elementos repetidos mais comuns no organismo, sequenciamento desses clones e construção de pares de *primers* específicos para seqüências únicas cuidadosamente selecionadas de cada lado dos microssatélites.

A construção de bibliotecas e *screening* é o modo mais comum para desenvolvimento de marcadores SSRs, para uma determinada espécie, mas os investimentos de tempo e dinheiro podem tornar este processo dispendioso. Atualmente, várias espécies possuem bancos de dados de sequenciamento, os quais fornecem muitas seqüências que podem conter SSR. Tais seqüências podem ser analisadas para o desenho de *primers* específicos.

Em microrganismos, os marcadores microssatélites foram desenvolvidos para alguns fitopatógenos de grande importância econômica, tais como *Phialophora gregata* (HARRINGTON et al., 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* (ATALLAH et al., 2004) e *Erysiphe necator* (CORTESI et al., 2004). Todos estes trabalhos demonstraram que *locos* SSR são marcadores altamente informativos permitindo a realização de vários estudos genéticos.

Moniliophthora (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & MOURA, 2005), agente causador da vassoura-de-bruxa, pertencente ao grupo dos basidiomicetos, é hemibiotrófico e tem uma estratégia reprodutiva homotática (GRIFFITH & HEDGER, 1994), característica presente em apenas 1% de todos os basidiomicetos. Enquanto muitos estudos têm sido realizados sobre a estrutura da população de fungos fitopatogênicos (McDONALD, 1997), o conhecimento da estrutura da população de *M. perniciosa* é escasso e a maioria

dos trabalhos tem focalizado principalmente no entendimento da origem do fungo na Bahia (ANDEBRHAN et al., 1999; GOMES et al., 2000; ARRUDA et al., 2003). A doença foi reportada na Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1989), causando uma tremenda queda na produção de cacau. A severidade da doença é mais alta do que em outras regiões devido a uma combinação de vários fatores favoráveis à doença, como uma grande área contínua (600 mil hectares) cultivada com cacaueiros com variedades altamente suscetíveis e com um clima favorável ao desenvolvimento do fungo.

Este trabalho foi realizado com o intuito de estabelecer uma plataforma de detecção de SSR em gel corado com prata para aplicações futuras em estudos de diversidade e mapeamento genético e desenvolver marcadores microssatélites específicos para o estudo de populações de *M. pernicioso*.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção de isolados e extração de DNA

Tecidos doentes de cacaueiro (vassouras vegetativas) foram esterilizados e incubados em meio seletivo durante 3-8 dias. A morfologia das culturas derivadas foi observada cuidadosamente para confirmar as suas identidades. Posteriormente, todas as culturas foram crescidas em Malte 50% durante 12 dias para extração de DNA. O micélio foi filtrado através do papel filtro Whatman nº. 1, lavado duas vezes com tampão TE (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA, pH 8.0) e liofilizado para posterior uso. O DNA total foi extraído como descrito por ZOLAN & PUKILA (1986). O DNA foi quantificado por eletroforese e espectrofotometria. As amostras de DNA foram diluídas com água Mili Q esterilizada, ajustada a 10 ng/mL e armazenada a 21 °C. Amostras que apresentaram degradação de DNA em géis de eletroforese foram descartadas e a extração de DNA foi repetida. O RNA foi eliminado adicionando-se 3 mL de RNase (10 mg/mL).

Construção dos *primers*

O banco de dados de *M. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>) foi analisado para a presença de SSR. Pares de *primers* complementares às regiões flanqueando as seqüências de microssatélites foram

desenhados usando o programa de computador PRIMER 3 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) ou oligo 4.0. *Primers* foram desenhados de modo a resultar em produtos de PCR com três faixas de tamanhos diferentes. Um total de sessenta e quatro microssatélites com repetições de di-tri e tetra nucleotídeos foi identificado. *Primers* específicos foram desenhados e utilizados para amplificação de DNA genômico de 16 isolados de *M. pernicioso* e 4 isolados de *M. roreri* (Tabela 1). A temperatura de anelamento dos *primers* foi otimizada em gel de agarose 3% e posteriormente em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata.

Tabela 1 - Origem e distribuição de isolados de *Moniliophthora pernicioso* e *M. roreri* usados neste estudo.

Origem	Fungo	Hospedeiro	Isolados
Brasil, Sul da Bahia	<i>M. pernicioso</i>	Cacau	10
Brasil, região Norte	<i>M. pernicioso</i>	Cacau	6
Equador	<i>M. roreri</i>	Cacau	2
Peru	<i>M. roreri</i>	Cacau	2

Amplificação do DNA via PCR

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo 50 ng de DNA molde, 0.2 μ M de cada *primer*, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 1X de reação tampão KCl e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech ou PeqLeb). As amplificações foram conduzidas em um Eppendorf Mastercycler Gradient, com “Touch Down” PCR inicial com desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguidos por 10 ciclos de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, anelamento do primer a 60 °C e decréscimo de 1 °C a cada ciclo, e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e 30 ciclos iniciados com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final de 4 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram, primeiramente, separados em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídio. Os pares de *primers* que geraram produtos de amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida a 5%, corado com prata.

Os primeiros testes de polimorfismo foram desenvolvidos no CIRAD/França com primers marcados com p^{32} . Dez pares de *primers* foram marcados radioativamente e checados em gel de acrilamida. O PCR radioativo foi feito como segue: 5 μ L *primer* inicial na concentração 2 pmol foi marcado usando 10 μ L p^{32} - ATP, 2 μ L de tampão T4 kinase, e 3 μ L de T4 DNA kinase que foram levados para o volume final de 30 μ L com água estéril deionizada e destilada. Os conteúdos foram misturados e incubados a 37 °C por 1h. A reação foi interrompida para a incubação a 70 °C por 10 min. Para a reação de PCR radioativo, 3 μ L de *primer* radioativo e 5 μ L de *primer* não radioativo (junto, 4 μ M) foram usados seguindo o protocolo de PCR. A eletroforese dos produtos radioativos foi realizada em géis desnaturantes de poliacrilamida a 5%. Os géis foram secos a 80 °C por 1,5 h e radiografados após 3 dias.

Eletroforese e análise de *locos* microssatélites

Os 64 *locos* amplificados foram analisados em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Os produtos de PCR foram diluídos na proporção 1:2 com o tampão de carregamento (ver Anexo). Esta mistura foi desnaturada a 95 °C por 4 min. A eletroforese de 3 mL da mistura foi conduzida em gel desnaturante (7 M de uréia) de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X pH 8.3 (89 mM de Tris-HCl; 89 mM de ácido bórico; 2 mM de EDTA) em cuba de sequenciamento vertical BIORAD. Inicialmente uma pré-eletroforese de 1h foi efetuada para alcançar a temperatura de 55 °C, seguida de eletroforese de aproximadamente 2 h. Produtos de PCR foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6% em uréia 7M e tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA). A visualização dos produtos foi feita com nitrato de prata segundo metodologia adaptada de CRESTE et al. (2001). Estimativas preliminares dos tamanhos dos alelos em pares de bases foram feitas comparando-se com os padrões de peso molecular de 10 pares de bases (Invitrogen).

Observações sobre as soluções e metodologia de detecção de polimorfismo corado com prata constam no Anexo.

Caracterização genética dos *locos* microssatélites

A variabilidade genética foi estimada analisando as diferentes frequências alélicas nos diferentes níveis hierárquicos estudados, população e subpopulações usando o programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999) estimou-se o número médio de alelos (A), e frequência alélica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na amplificação de DNA genômico de 16 isolados de *M. pernicioso* verificou-se que dos 64 pares de *primers* desenhados e testados, 28 geraram produtos de amplificação, sendo que 12 *locos* foram polimórficos. Quase todos os alelos encontrados diferiram no tamanho por três pares de bases ou múltiplos de dois pares de bases. Houve um caso onde três alelos sucessivos diferiram por apenas um par de bases (Tabela 2).

De um modo geral, os microssatélites de tetranucleotídeos repetidos apresentaram maior nível de polimorfismo do que as regiões de repetições de três e dois nucleotídeos. A média de heterozigosidade variou de 0.02 a 0.5. Os pares de *primers* também foram testados para checar a real aplicabilidade desses *primers* para amplificar DNA. Foram identificados três *locos* bastante polimórficos para distinguir isolados de diferentes biótipos, e um quarto que diferenciou os isolados mais patogênicos. Todos os 12 *locos* foram amplificados para *Moniliophthora roreri*, mostrando a possibilidade de utilização do mesmo *primer* e mesma condição de amplificação, facilitando o uso potencial em estudos de filogenia e variação genética na espécie. Estes resultados também colaboram com o fato *M. roreri* e *M. pernicioso* compartilham um ancestral comum, como já apontado por EVANS (1981), EVANS et al. (2003), GRIFFITH et al. (2003), PHILLIPS-MORA (2003) e AIME e PHILLIPS-MORA (2005). Confirmando a transferibilidade e utilidade destes *primers* para uso em estudos de genética de populações de *M. roreri*.

Embora tenha sido verificada a eficácia do processo de coloração de prata para detectar polimorfismos nos *loci* microssatélites, a detecção automática de alelos microssatélites com *primers* marcados com corantes fluorescentes seria mais uma possibilidade a ser avaliada e otimizada.

Considerando o polimorfismo gerado, partes dos *primers* analisados neste trabalho mostraram-se úteis aos estudos genéticos de *M. pernicioso* e *M. roreri*. Os mesmos estão sendo utilizados para mapear a estrutura populacional de *M. pernicioso* na região sudeste da Bahia. Vale ressaltar, por fim, que, até o momento, não se conhecia nenhum *loco* microssatélite descrito para os gêneros *M. pernicioso* e *M. roreri*.

Tabela 2 - Loci microsatélites polimórficos e suas características.

Locus (acesso nº)	Nome	Sequência (5' - 3')	Motivo	Ta (°C)	Tamanho (pb)	Nº alelos	Frequência alélica
AM183147	Mscepec Cp14	F CAGCTCGTACGGATCAACAA R TACCGATGGTGTGAGGTCAA	[AGAT] ₅	48	233-239	2	0,94
AM183148	Mscepec Cp15	F AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT R TGTCGAGCACTAGCATGTGA	[GAT] ₉ [GAA] ₈	48	177-200	6	0,19
AM183149	Mscepec Cp16	F CGCACTTTGGCTGATGTAAAA R GTCCCAGAGGGAAAGAGGAT	[ATG] ₁₀	48	212-221	2	0,21
AM183150	Mscepec Cp19	F TCCCACAACCCCAAAGATAG R CCCCTTCAAGGTCGTATCCT	[GAT] ₈	48	197-200	2	0,45
AM183152	Mscepec Cp22	F GAAGCGCAGATCTTTCTTGC R TCGCTTCACACCTTACTCTGC	[CTT] ₆	48	198-201	2	0,46
AM183153	Mscepec Cp23	F ACCTCCTCATATGGCGTCAC R GCGGTTGGTGACTCTTGATT	[TCAG] ₁₀	48	202-206	2	0,65
AM183154	Mscepec Cp29	F GTATACTCGCTTCAGGCATCG R GAACCCAATACCTCCACCT	[GGC] ₇	48	203-209	3	0,54
AM183156	Mscepec Cp44	F GGCTGTAGGGCATCAAG R AAAACCAGACAAATGAAAC	[AGAT] ₅	51	252-264	3	0,35
AM183157	Mscepec Cp45	F ATGACCAGACAAATGAAAC R CAAAGAGAAATCACAGAGC	[AGAT] ₅	51	234-268	4	0,40
AM183159	Mscepec Cp47	F CAACATCAATCCCACGAC R GAAGGCTGCGGAAGTAA	[CGT] ₈	51	169-172	2	0,24
AM183160	Mscepec Cp50	F AATGAGCACGGAAGTCTG R TTGGATTGTTCTGGGGTA	[GTG] ₇	48	227-230	2	0,21
AM183162	Mscepec Cp64	F GCAACAAATCTCCTTCGTC R AAAAAAACCAACCATCCAT	[TGG] ₆	48	308-311	3	0,30

LITERATURA CITADA

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(5):1012-1022.
- ARRUDA, M. C. C. de. et al. 2003. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and host. *Mycological Research* 107(1):25-37.
- ANDEBRHAN T.; ALMEIDA, L. C. de; NAKAYAMA, L. H. I. 1999. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia brasileira. *Agrotrópica* (Brasil) 10(2):49-60.
- ATALLAH, Z. K. et al. 2004. High Genetic Diversity, Phenotypic Uniformity, and Evidence of Outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. *Phytopathology* 94: 737-742.
- BELKHIR, K. et al. (1999) GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- CORTESI, P.; OTTAVIANI, MARIE-PAULE.; MILGROOM, M. G. 2004. Spatial and Genetic Analysis of a Flag Shoot Subpopulation of *Erysiphe necator* in Italy. *Phytopathology* 94: 544-550.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, F. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.
- EVANS, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. London, UK: Commonwealth Mycological Institute. *Phytopathological papers* n° 24, p.44,
- EVANS, H.C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology* 52: 476-485.
- GOMES, L. M. C. et al. 2000. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 33, Belém, Pará. *Fitopatologia Brasileira*, n.25 (Suplemento), p.377.

- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. 1994. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72: 278-289.
- GRIFFITH, G. W. et al. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany* 41(3): 423-435.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A. 1982. A novel repeat element with Z-DNA- forming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes. *Proceedings of the National Academy Science*, v. 79, p.6465-6469.
- HARRINGTON, T. C. et al. 2003. Characterization and distribution of two races of *Phialophora gregata* in the North-Central United States. *Phytopathology* 93 (7): 901-912.
- McDONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453.
- PEREIRA, J. L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica (Brasil)* 1(1):79-81.
- PHILLIPS-MORA, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomy affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Thesis PhD. United Kingdom. University of Reading, 349p.
- ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J. 1986. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.

ANEXOS

Protocolo para obtenção de marcadores microssatélites em géis de poliacrilamida corado com Nitrato de prata

Adaptado de CRESTE et al., **Plant Molecular Biology Reporter**, (v. 19, p.299–306, 2001).

Preparo das placas de vidro

1. Lavagem

a. Lavar as placas de vidro, a placa maior (REPEL) e a menor (BIND) com detergente e em seguida com água destilada. Secar e aplicar acetona.

b. Após a corrida de eletroforese a placa BIND deve ser deixada em uma solução de NaOH 2 N para desprender o gel (se foi utilizada) e em seguida deve ser lavada da mesma forma que a descrita acima.

2. Aplicação do gel

a. Espalhar a solução estoque de BIND na placa menor em bancada separada.

b. Secar por 5 min.

c. Espalhar Rain-X* (Pentel ou Sigmacot) (1 mL da solução) suavemente sobre a placa maior para facilitar o desprendimento do gel.

d. Secar por 5 min.

e. Espalhar Rain X suavemente sobre o pente e espaçadores.

*O Rain X foi usado como substituto do Repel e pode ser facilmente encontrado em casas de produtos para carro.

3. Montagem das Placas

a. Colocar os espaçadores na lateral da placa REPEL

b. Colocar em cima da placa REPEL a placa BIND, o lado que foi aplicado a solução.

c. Prender as placas com grampos, três de cada lado, de modo que seja ajustado, para a colocação do pente, após o gel.

Preparo do gel

1. Gel

Preparo do gel (6% de poliacrilamida; 7 M de uréia) para:

- 60/70 mL da solução poliacrilamida
- 250 μ L de APS 10%
- 83 μ L de TEMED ou duas gotas
- Misturar rapidamente em agitação
- Aplicar o gel nas placas
- Colocar o pente de forma que não crie bolhas
- Esperar 2 h para polimerização do gel

2. Pré-corrida

- a. Após a polimerização, retirar os grampos,
- b. Retirar cuidadosamente o pente e limpar o local, onde será aplicada a reação.
- c. Correr o gel com o pente a 60 W (42 mA; 1500 V) por 90 min até que a temperatura alcance 55 °C em TBE 1X (89 mM Tris; 2 mM EDTA; 89 mM ácido bórico)
- d. Adicionar 10 μ L de tampão de carregamento para 20 μ L de reação de amplificação (PCR) (proporção 1 (tampão):2)
- e. Denaturar as amostras por 3 min a 94 °C no termociclador. Imediatamente após a denaturação colocar as amostras no gelo.
- f. Aplicar 4 μ L das amostras no gel tão rápido quanto possível. Dependendo do tamanho do pente, pode ser aplicada maior quantidade de amostra.
- g. Correr o gel a 60 W por 80 -100 min a 50-55 °C, até que a primeira banda azul saia da placa.

3. Coloração com prata

- a. Desprender as placas gentilmente, retirar pente e espaçadores e colocar a placa BIND com o gel voltado para cima em um recipiente
- b. Aplicar 1000 mL da Solução Fixadora por 1 hora, agitando gentilmente
- c. Lavar o gel com água destilada por 1 minuto

- d. Aplicar 1000 mL da solução Pré-tratamento por 3 min, agitando gentilmente;
- e. Lavar o gel com água destilada por 1 minuto
- f. Impregnar o gel com 1000 mL da solução Nitrato de prata 0.2%, por 30 min, agitando gentilmente;
- g. Lavar o gel com água destilada por 1 minuto;
- h. Revelar o gel adicionando 540 μ L de formaldeído dentro do recipiente em que está à placa MENOR e em seguida adicionar a Solução Reveladora que deve estar pronta na geladeira. Agitar gentilmente até que as bandas apareçam com intensidade desejável
- i. Retirar a placa da Solução Reveladora e interromper o desenvolvimento da coloração adicionando 1000 ml da solução stop (950 ml de H_2O + 50 ml do ácido acético) por 10 min, agitando gentilmente.
- j. Lavar o gel com água destilada.
- k. Secar ao ambiente por 3 dias.
- l. Fotografar ou escanear

* As soluções de coloração, exceto a reveladora, podem ser utilizadas 3 vezes.

Soluções estoque para SSR prata *M. perniciosus*

Solução estoque de POLIACRILAMIDA

Preparo de acrilamida a 30%

-29 g de acrilamida a 1 g de bisacrilamida em 100 mL de água ultrapura.

Preparo de solução poliacrilamida

- a. 100 mL da solução de acrilamida a 30%
- b. 100 mL de TBE 5X (445 mM Tris-base; 445 mM ácido bórico; 10 mM EDTA)
- c. 210 g de uréia*
- d. Completar para um volume final de 500 mL
- e. Filtrar em papel filtro e estocar a 4 °C em frasco marrom

*Primeiro dissolver a uréia em água

Soluções estoque para Coloração

1. Solução Fixadora (1000 mL)

- 10 mL de ácido acético
- 100 mL de álcool 100%
- 890 mL de água

2. Solução Pré-tratamento (1000 mL)

- 15 mL de ácido nítrico
- 985 mL de água

3. Solução Nitrato de prata 0.2% (AgNO_3)

- 2 g de prata
- 1 L de água
- usar frasco âmbar
- ALTAMENTE TÓXICO

4. Solução Reveladora

- 30 g de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)
- 540 μL formaldeído 37% (Adicionar somente na hora da coloração)
- 1 L de água
- usar frasco âmbar
- por na geladeira
- o aumento do formaldeído intensifica a coloração das bandas

5. Solução Stop

- 50 mL de ácido acético
- 950 mL de água

Soluções estoque

1. Tampão de carregamento (100 mL)

- 95 mL de formamida
- 2 mL EDTA 0.5 M
- 90 mg Azul de bromofenol
- 90 mg xilenocianol FF

- aliquotar em tubos eppendorf
- por em geladeira

2. NaOH 4 N

- 40 g NaOH
- 1000 mL de H₂O

3. TE pH 8.5 (Para 1L)

- 50mL Tris-Cl 1M (Concentração final 50mM)
- 140mL NaCl 5M (0,7 M final)
- 100mL EDTA 0,5M (10mM final)
- Completar com H₂O para 1L

4. Ladder gel prata

- 10 μ L Ladder 10 pb
- 90 μ L TE pH 8.5
- 100 μ L tampão de carregamento com formamida
- aliquotar em tubos eppendorf e por em geladeira

5. TBE 10 X (1 L)

- Tris Base 108 g
- Ácido bórico 55 g
- EDTA 16.6 g
- Completar para 1000ml H₂O MilliQ
- Filtrar e armazenar em frasco âmbar TA

6. APS 10%

- 0.1 g de persulfato de amônia
- 1 mL água
- aliquotar e colocar no freezer

7. Solução estoque BIND –

- 4 μ L de metacriloxi-propil-trimetoxisilane (PlusOne Bind Silane),
- 1 mL de etanol ácido (0.5% de ácido acético em 95% de etanol)
- Armazenar em frasco âmbar TA

8. Formaldeído 37%

- 370 μL formaldeído
- 630 μL água MilliQ autoclavada

9. Etanol ácido (1 mL)

- 995 μL etanol
- 5 μL ácido acético

