

MOEMA LOPES RAMOS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO FUNGO  
PREDADOR DE NEMATÓIDES *Arthrobotrys* spp. POR  
MARCADORES RAPD E PCR-RFLP DO rDNA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000

A Deus.

Aos meus pais.

Ao Gustavo.

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade oferecida para realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela orientação, pela confiança, pelo incentivo, pela compreensão, pelo carinho, pelos seus sábios conselhos e por ser uma grande educadora.

Ao professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, pelo auxílio sempre que necessário, pela colaboração, pelos conselhos, pelos estímulos, pela compreensão e pela amizade.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pela confiança, pelo incentivo e pela amizade.

Ao professor Jackson Víctor de Araújo, pela orientação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, pelo convívio e auxílio em todos os momentos.

Aos funcionários José Geraldo de Oliveira (Tuim) e Waldir Soares Ferreira, do Laboratório de Parasitologia Veterinária, pelo apoio e colaboração técnica.

Aos estudantes de iniciação científica, Fabrícia e Ricardo, pela colaboração nesse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da UFV.

Aos colegas e funcionários do BIOAGRO.

Aos colegas de curso, especialmente Regina, Roueda, e Marcelo, pela amizade, pelo agradável convívio e auxílio em todos os momentos.

Às amigas Maria Helena, Alessandra, Denise e Tayse, pelo companheirismo, pela convivência e pela compreensão.

Aos colegas, Júpter e Tânia, pela amizade e pelo grande auxílio prestado nesse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos que tornaram esta etapa da vida mais agradável.

Aos amigos do Juca do Gás, sempre presentes nos momentos de descontração.

Ao meu querido e inseparável Kaiser.

À minha família.

## BIOGRAFIA

Moema Lopes Ramos, filha de Maria Célia Lopes Ramos e José Mota Ramos, nasceu em 25 de março de 1974, em Carangola, Minas Gerais.

Em julho de 1997, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1998, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária nessa mesma Instituição.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Origem e obtenção dos isolados .....	17
3.2. Manutenção da cultura-estoque .....	17
3.3. Obteção de massa micelial .....	18
3.4. Extração de DNA total .....	19
3.5. RAPD .....	19
3.6. Amplificação por PCR e análise por RFLP .....	21
3.7. Análise de DNA, por eletroforese, em gel de agarose .....	22
3.8. Análise dos dados .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## RESUMO

RAMOS, Moema Lopes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2000. **Diversidade genética de isolados do fungo predador de nematóides *Arthrobotrys* spp. por marcadores moleculares RAPD e PCR-RFLP do rDNA.** Orientador: Jackson Víctor de Araújo. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

A diversidade genética de seis isolados *Arthrobotrys conoides*, três isolados *A. oligospora* e sete isolados *A. robusta* foi avaliada por meio de RAPD. A amplificação resultou em um total de 107 fragmentos de DNA polimórficos, utilizando 11 oligonucleotídeos. As distâncias genéticas variaram de 9 a 83%, quando analisadas em conjunto, demonstrando grande diversidade genética nos isolados dessas três espécies. Por meio dessas análises, pôde-se diferenciar os isolados A51 (*A. robusta*) e A78 (*A. conoides*) das suas respectivas espécies. Além desses, o isolado A183 (*A. oligospora*) também se diferenciou de sua espécie agrupando-se com isolados de *A. robusta*. A variação dentro da região ITS do rDNA de seis isolados *A. conoides* e sete isolados *A. robusta* foi analisada por PCR seguida pela análise do polimorfismo de comprimento de restrição (RFLP). Essa região amplificada inclui o espaçador interno transcrito (ITS), que possui um baixo grau de conservação. Dois isolados fúngicos, A51 e A78, apresentaram polimorfismo de tamanho dentro de suas respectivas espécies. Os produtos da amplificação da região ITS foram hidrolisados com diferentes endonucleases de restrição.

Análises de agrupamento, baseadas nos fragmentos de DNA de restrição, separaram os isolados em três distintos grupos: o Grupo 1, que contém os isolados pertencentes à espécie *A. conoides*, exceto o isolado A78; o Grupo 2, que contém os isolados da espécie *A. robusta*, exceto o isolado A51; e o Grupo 3, formado pelos isolados A78 e A51, sugerindo uma nova análise na sua classificação.

## ABSTRACT

RAMOS, Moema Lopes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2000.  
**Genetic diversity of nematophagous predacious fungi *Arthrobotrys* spp. by RAPD and rDNA PCR-RFLP molecular markers.** Advisor: Jackson Víctor de Araújo. Committee members: Elza Fernandes Araújo and Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

The genetic diversity of six isolates of *Arthrobotrys conoides*, three of *A. oligospora*, and seven of *A. robusta* was evaluated by RAPD. Total DNA amplification using 11 oligonucleotides resulted in 107 distinct polymorphic DNA fragments. The genetic distances varied from 9 to 38%, showing high genetic diversity among the isolates of the three species. By means of RAPD analysis, the isolates A51 (*A. robusta*) and A78 (*A. conoides*) could be differentiated from their respective species. Besides A51 and A78, the isolate A183 (*A. oligospora*) also differentiated from its species, grouping with the isolates of *A. robusta*. Variation within the rDNA ITS region of six isolates of *A. robusta* was analyzed by PCR, followed by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP). The amplified region included the internal transcribed spacer (ITS), which possesses a low degree of conservation. Two fungal isolates presented length polymorphism within their respective species. Amplification products of the ITS region were cleaved with different restriction endonucleases. Cluster analysis based on restriction fragments divided the isolates into three groups: Group 1, containing the *A. conoides* isolates, except

A78; Group 2, containing the *A robusta* isolates, except A51; and Group 3, formed by A78 and A51, suggesting that their classification should be revised.

## 1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 200 espécies de fungos que pertencem à classe Deuteromycetes e são nematófagos.

O primeiro fungo nematófago a ser isolado e descrito foi o *Arthrobotrys oligospora* Fres., por Fresenius, em 1850 que, na época, não notou a capacidade predatória, o que somente foi observado por Zopf, em 1888 (GRAY, 1988).

Conhecia-se pouco a respeito desses fungos, até que DRECHSLER (1937) publicou um extenso trabalho, com observações detalhadas sobre espécies já classificadas e descrições de 15 novas espécies. Posteriormente, COOKE e GODFREY (1964) reuniram, em uma única obra de classificação, elementos para identificar fungos nematófagos. Segundo essa chave, a partir dessa obra, quase todos os fungos predadores estão que até 1964, pertenciam aos gêneros *Arthrobotrys* Corda, *Dactylaria* Saccardo, *Dactylella* Grove e *Trichothecium* Link tornam-se Hyphomycetes. Depois, vários outros gêneros foram descritos tais como: *Didymozoopphaga* Soprunov e Galiulina, *Genicularia* Rifai e Cooke, *Candelabrella* Rifai e Cooke, *Dactylariopsis* Mekhtieva e *Dunddingtonia* Cooke (GRAY, 1987).

NORDBRING-HERTZ (1988) afirmou que fungos nematófagos vêm atraindo a atenção dos pesquisadores desde que a sua função como

predadores de nematóides foi reconhecida. Isto ocorre, em grande parte, por causa da captura drástica de nematóides, que pode ser facilmente demonstrada quando uma placa de Petri, com espalhamento de solo de origem apropriada, é observada sob microscópio estereoscópico.

Pesquisas alternativas, empregadas no controle das helmintoses bovinas, têm buscado o desenvolvimento de vacinas, a produção de animais geneticamente resistentes e o controle biológico por meio do uso de fungos nematófagos, sendo esta última uma das mais promissoras. Além disso, sabe-se que, esses fungos, são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois reduzem efetivamente sua população em laboratório e possuem eficácia comprovada em outros nematóides presentes na pastagem (WALLER e LARSEN, 1993).

De acordo com VAN OORSCHOT (1985), o gênero *Arthrobotrys* apresenta 27 espécies e pertence ao grupo de fungos predadores. Eles são classificados com base na dimensão e no formato dos conídios e conidióforos, nas ramificações e, ou, na proliferação dos conidióforos e nos tipos de órgãos de captura (armadilhas). Espécies desse gênero são facilmente cultivadas em meios artificiais, e numerosos isolados são mantidos em diversos laboratórios do mundo. A identificação de *Arthrobotrys* segue, atualmente, as chaves de COOKE e GODFREY (1964), HAARD (1968) e VAN OORSCHOT (1985).

A classificação de fungos predadores, com base em caracteres morfológicos, às vezes, exige uma decisão subjetiva do especialista. O formato e a cor do micélio, dentre outras, que não têm limites bem definidos, requerem experiência e alta capacidade de discernimento, principalmente, quando se tem em mãos um isolado que não se enquadra do padrão típico da espécie. Além disso, a dimensão dos conídios, e a ramificação dos conidióforos, dentre outras, podem sofrer variações de acordo com as condições de cultivo, tornando-se, muitas vezes, características insuficientes para uma identificação precisa de espécies taxonomicamente próximas (COOKE e GODFREY, 1964). Por causa dessas dificuldades, certos pesquisadores vêm empregando métodos alternativos, tais como análise de proteínas solúveis e de isoenzimas

e dos marcadores em nível de DNA (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”, ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição; RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA” ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) para dirimir dúvidas e validar o uso de caracteres morfológicos (GALLEGY, 1983; ALFENAS et al., 1984; ALFENAS, 1986; TREVORS e VAN ELSAS, 1989; LUNGE et al., 1992).

Os marcadores RAPD têm sido utilizados em análises de população, de genealogia e na obtenção de mapas genéticos saturados, em um curto período de tempo (CAETANO-ANOLLÉS, 1993).

A amplificação do DNA ribossômico (rDNA) por reação em cadeia da polimerase (PCR), acoplada ao polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP), tem sido considerada útil na distinção das espécies de isolados de fungos (LOBUGLIO et al., 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética entre isolados do gênero *Arthrobotrys* por meio da utilização de marcadores RAPD e PCR-RFLP da região ITS do rDNA.

Por causa dessas dificuldades, vários pesquisadores vêm empregando métodos alternativos, tais como análise de proteínas, de isoenzimas e marcadores em nível de DNA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo VAN GUNDY (1985) e JATALA (1986), organismos como fungos, bactérias, protozoários, tardígrados e ácaros, entre outros, têm sido identificados como antagonistas de nematóides. De todos esses habitantes do solo, os fungos são os que têm recebido maior atenção. Tal fato se deve, basicamente, à grande abundância desses organismos no solo e à facilidade para manipulação em trabalhos de laboratório, de casa de vegetação e de campo (JATALA, 1986).

Fungos nematófagos são amplamente encontrados na natureza. Estão presentes nas plantas, no esterco e no solo (HASHMI e CONNAN, 1989). Numerosos levantamentos de dados têm mostrado que diferentes espécies de fungos nematófagos têm ampla distribuição geográfica (DRECHSLER, 1950; ESTEY e OLTROF, 1965; GRAY, 1983 e 1984). Quase todos os fungos predadores estão incluídos em Hyphomycetes (FERRAZ e SANTOS, 1995). Eles atacam nematóides vivos e os utilizam como fonte de nutrientes (NORDBRING-HERTZ, 1988). A sua capacidade de predação de nematóides é conhecida há quase um século e sua biologia tem sido intensamente estudada, principalmente como controlador biológico de nematóides parasitas de plantas; no entanto, há poucos estudos a respeito de sua atuação sobre nematóides parasitas de animais (NANSEN et al., 1988).

Os fungos nematófagos compreendem diferentes tipos de organismos, que podem ser considerados como predadores, endoparasitas e parasitas de fêmeas, cistos ou ovos. Os fungos predadores formam estruturas de captura de diferentes tipos, como aquelas que capturam nematóides por meio de anéis constritores ou não-constritores, redes adesivas, nódulos adesivos ou outras estruturas de hifas. Os endoparasitas são aqueles que infectam os nematóides com o auxílio de seus esporos e existem principalmente dentro do nematóide (NORDBRING-HERTZ, 1988). Segundo a autora, em fungos predadores, a transição de uma fase saprofítica de crescimento para uma fase de predação, quando armadilhas são formadas, é influenciada por fatores bióticos e abióticos.

Os fungos nematófagos raramente produzem órgão de captura em cultura pura, mas, em 24 horas produzirão armadilhas, abundantemente, se nematóides lhe forem adicionados (GRAY, 1987). BELDER (1994) relatou que algumas espécies de fungos nematófagos diferem no grau de resposta a extratos de nematóide e que isolados diferentes de uma única espécie podem mostrar uma gama de respostas a estes estímulos, em termos de formação de armadilhas. O autor concluiu que a formação de armadilha não é uma simples resposta a estímulos exógenos, mas uma resposta mais complexa às necessidades do fungo. A diferenciação da hifa pode ocorrer dentro de 24 horas, e numerosas estruturas de captura podem ser formadas (PRAMER, 1964).

Os nematóides geralmente são atraídos pelos fungos, e essa atração é aumentada se as armadilhas estão presentes no micélio (NORDBRING-HERTZ, 1988). Nesse momento, a cutícula do nematóide é lesada no ponto de contato promovendo a penetração da hifa (GRAY, 1988). Em seguida, a hifa torna-se digestiva dentro do hospedeiro, causando a morte do nematóide (VEENHUIS et al., 1985).

O gênero *Arthrobotrys* foi descrito por Corda, em 1839, (DRECHSLER, 1937), com base na espécie tipo *Arthrobotrys superba* Corda. DRECHSLER (1937), estudando essa espécie, confirmou a observação de Zopf (1888) sobre

a formação de redes que capturavam os nematóides. SOPRUNOV (1958) descreveu quatro espécies de fungos e caracterizou as armadilhas produzidas por eles na Rússia. COOKE e GODFREY (1964) apresentaram uma chave contendo características das espécies de *Arthrobotrys* produzidas em cultura pura e em cultura com nematóides, onde são formados os órgãos de captura. Estudos taxonômicos de gênero, realizados por HAARD (1968), agruparam as espécies de *Arthrobotrys arthrobotryoides* (Berl.) Lindau; *Arthrobotrys cladodes* (Drechsler); *Arthrobotrys conoides* (Drechsler); *Arthrobotrys dolioformis* (Soprúnov e Galiulina) ex Soprúnov; *Arthrobotrys oligospora* Fresenius; *Arthrobotrys oviformis* (Soprúnov e Galiulina); *A. robusta* (Duddington) e *A. superba*, dentre as formadoras de redes tridimensionais. Verificou-se também, que *A. musiformis* (Drechsler) era formadora de redes bidimensionais e *Arthrobotrys anchonia* Drechsler e *Arthrobotrys dactyloides* (Drechsler), formadoras de anéis constritores. SCHENCK et al. (1977) transferiram muitas espécies de *Dactylaria* Sacc para o gênero *Arthrobotrys*, considerando que o número de septos nos conídios não era suficiente para mantê-las em taxas diferentes.

As redes tridimensionais são as mais comuns das estruturas de captura, sendo encontradas em várias espécies do gênero *Arthrobotrys*. Após a captura, independentemente da armadilha utilizada, o fungo penetra e se desenvolve no interior do nematóide, consumindo o seu conteúdo e lançando para o meio externo as suas estruturas vegetativas (BARRON, 1977; GRAY, 1987).

VAN OORSCHOT (1985) reavaliou o gênero reconhecendo 27 diferentes espécies e cinco variedades, com base no formato dos conídios, na dimensão dos conídios e conidióforos, na ramificação e/ou proliferação dos conidióforos e nos tipos de órgãos de captura. A complexidade do gênero *Arthrobotrys* foi citada por MANKAU (1980), o qual comparou sua variação e complexidade com gênero *Penicillium*.

No Brasil, os estudos com fungos nematófagos iniciaram na década de 60. BARZA RAMOS e UPADHAYAY (1966), FREIRE e BRIDGE (1985), SILVA

e CAMPOS (1991a) encontraram diferentes espécies fúngicas em seus trabalhos. MITSUI e SHARMA (1991) detectaram, em solos sob vegetação de cerrado do Distrito Federal, espécies predadoras pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylella* e *Monacrosporium*. NAVES e CAMPOS (1991) encontraram *A. conoides* e *A. musiformis* em diferentes localidades do Sul de Minas Gerais. DIAS (1992), ao trabalhar com amostras provenientes de diversos estados brasileiros, detectou *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. robusta*, e *M. thaumasia*.

GOMES (1998), em seu estudo para avaliar a viabilidade de um isolado de *Arthrobotrys robusta*, no controle biológico de nematóides parasitos gastrointestinais bovinos, relatou a eficácia desse isolado na pastagem, por meio do controle da infestação no bolo fecal.

CASTRO (1998) comparou vários ensaios laboratoriais com alguns fatores ligados à habilidade de predação do isolado A138 de *Arthrobotrys musiformis*, em relação a alguns fitonematóides do gênero *Meloidogyne*, e sua eficiência para esse propósito foi demonstrada. Nesse estudo, verificou-se a eficiência desse isolado no controle biológico dos fitonematóides.

LIMA (1996), em sua tese de doutorado, relatou, pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de *Arthrobotrys superba*, *A. oligospora var. microspora*, *Arthrobotrys brochopaga* e descreveu uma nova espécie, *Arthrobotrys ampuliformis*. Identificou, ainda, isolados das espécies *A. oligospora var. oligospora*, *A. robusta*, *A. musiformis*, *A. conoides* e *A. oviformis*, as quais já haviam sido detectadas em solos brasileiros.

Segundo WALLER e LARSEN (1993), os fungos são passíveis de serem manipulados geneticamente. A fusão de suas cepas é desejada porque é neste momento que elas transmitem características entre si. Portanto, aqueles agentes selecionados nos programas de controle biológico, podem servir de material inicial para o desenvolvimento dos biocontroladores ideais isolados, embora possuam muitas características geneticamente complexas (STASZ, 1990).

O estudo genético de qualquer organismo requer a existência de caracteres ou marcadores precisos e facilmente detectáveis. Os marcadores morfológicos, apesar de úteis em estudos de laboratório, são raros e pouco observados em populações naturais de fungos, pois compreendem poucos alelos possuindo efeitos fenotípicos frequentes e adversos, além de serem afetados, muitas vezes, pelo ambiente. Por causa disso, atualmente, os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta de auxílio na caracterização da diversidade genética, nos estudos de fisiologia e ecologia de fungos (MICHELMORE e HULBERT, 1987).

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. Portanto, os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões dos mapas genéticos. Entretanto, o pequeno número de marcadores distintos, de mesma linhagem, reduzia a probabilidade de encontrar correlações significativas de caracteres de importância econômica entre esses marcadores, por meio do estudo as populações segregantes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Em contrapartida, marcadores moleculares, com base na seqüência de nucleotídeos do DNA, representam importante ferramenta para a identificação de microrganismos (ERLAND et al., 1994).

As isoenzimas podem ser utilizadas como marcadores. Entretanto, apresentam algumas desvantagens porque, além de produzirem várias bandas de uma mesma enzima, exercem influência na idade do micélio utilizado para análise, entre outras (MICHELMORE e HULBERT, 1987). Verificou-se, então, que utilizando isoenzimas em linhagens comerciais, foi possível identificar uma limitada variabilidade genética do fungo comestível *Agaricus brunnescens* (ROYSE e MAY, 1982). Técnicas com sete sistemas isoenzimáticos têm sido usadas para caracterização de *A. bitorquis* (ROUX e LABARERE, 1990).

Segundo ARAÚJO (1996), análises com isoenzimas foram consistentes para a identificação de *Arthrotrrys*. Testaram-se as espécies *A.*

*conoides*, *A. robusta* e *A. musiformis*. Das 15 enzimas utilizadas, nove foram suficientes para distinguir diferentes espécies de *Arthrobotrys*. Os ensaios mostraram-se promissores como formas alternativas para estudos de taxonomia e caracterização das espécies de *Arthrobotrys*. Em concordância com PEARSSON et al. (1996), ao empregar PCR-RFLP (“Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism” ou reação em cadeia de polimerase-polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição) em *Arthrobotrys*, os ensaios de isoenzimas podem ser também aplicados na verificação de isolados que apresentam dificuldades na identificação.

ARAÚJO et al. (1997) analisaram o perfil isoenzimático de quatro isolados de *Arthrobotrys* e verificaram que dois isolados difeririam em seus padrões de  $\alpha$ -esterase; entretanto, nenhuma diferença foi observada nas outras 12 enzimas testadas. A correta identificação e caracterização de espécies deste gênero trará conhecimentos específicos sobre o emprego de espécies distintas ou isolados da mesma espécie, no biocontrole.

MICHELMORE e HULBERT (1987), verificaram os marcadores moleculares com base no DNA apresentam vantagens distintas sobre todos os outros, são as seguintes:

a) possibilidade de detecção de um número praticamente ilimitado de marcas;

b) ausência de variações por causa do estágio de desenvolvimento do organismo e, ou, do tipo de tecido utilizado, pois as análises se baseiam no próprio DNA e não nos produtos gênicos; e

c) não influência das condições do ambiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Nesse sentido, marcadores em nível de DNA representam uma ferramenta auxiliar na determinação da diversidade genética de fungos.

Dentre os marcadores moleculares de DNA, existem aqueles que se baseiam na tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) (SAIKI et al.,

1985; MULLIS e FALOONA, 1987). A facilidade, a rapidez, a versatilidade e a sensibilidade dessa técnica tornaram-na de grande utilidade em estudos genéticos-moleculares quando se envolve grande número de indivíduos. A reação de PCR é uma metodologia que promove a síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, a partir de uma pequena quantidade de um molde de ácido nucléico (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988), na presença da enzima DNA polimerase, com pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores, que vão delimitar a seqüência de DNA a ser amplificada.

Um grande avanço na área dos marcadores moleculares, fundamentados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade de conhecimento prévio da seqüência. Essa técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisas nos Estados Unidos. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA” ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Nesse trabalho clássico, o primeiro grupo descreveu a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. WELSH e MCCLELLAND (1990), por sua vez, propuseram uma denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (“Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction” ou iniciadores arbitrários para a reação de polimerização em cadeia), uma vez que possuem seqüência arbitrária. Mas, tecnicamente, sua amplificação não ocorre ao acaso e sim, em lugares específicos do genoma. O experimento desse segundo grupo foi essencialmente a geração de “fingerprints”, isto é, de impressões digitais genômicas simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de grande poder de resolução, junto a iniciadores um pouco mais longos. Com um atraso de alguns meses na publicação, mas de forma independente, um terceiro grupo também desenvolveu o mesmo método. O nome DAF (“DNA Amplification

Fingerprinting” ou impressões digitais do DNA amplificado) foi proposto por esse grupo para detectar diferenças genéticas entre organismos (CAETANO-ANÓLLES et al, 1991).

Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR, utilizando iniciadores de seqüência arbitrária, abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

A técnica de RAPD é uma metodologia rápida. Para aplicá-la, não é necessário obter sondas definidas para cada espécie, utiliza-se apenas iniciadores aleatórios. As análises requerem quantidades muito pequenas de DNA e dispensam o uso de radioisótopos, reduzindo o custo e aumentando a segurança (FOSTER et al., 1993). Além de facilitar e acelerar estudos em espécies tradicionais, essa técnica possibilitou a análise genética em espécies anteriormente não contempladas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Diferentes dos marcadores RFLP, os marcadores RAPD são dominantes na maioria dos casos. Em um estudo para obtenção do mapa genético de *Neurospora crassa*, 84 marcadores RAPD foram dominantes e somente quatro foram co-dominantes (WILLIAMS et al., 1990). Como esses marcadores identificam as diferenças entre isolados pelo polimorfismo dos fragmentos de DNA amplificado, cada fragmento representa um “locus” específico no genoma (GUTHRIE et al., 1992).

Padrões de DNA polimórfico amplificados ao acaso (RAPD) promovem marcadores genéticos neutros os quais podem ser utilizados em análises filogenéticas de plantas e animais (TINKER, FORTIN e MATHER, 1993; TIBARYRENC et al., 1993). Em fungos, esses marcadores têm sido usados principalmente em nível intra-específico, como por exemplo para comparar as linhagens 1 e 2 de *Fusarium solani* f. sp. *curcubitae* (CROWHURST et al., 1991).

GOSSELIN et al. (1996), por meio de RAPD analisaram 43 isolados de *Chondrostereum purpureum*, originados de 14 hospedeiros diferentes e obtidos em distintas regiões de floresta no Canadá. Nesse trabalho, eles

descreveram a aplicação dessa técnica para determinar a natureza e a extensão da diversidade genética, entre isolados de regiões geográficas distintas, obtidas por meio de dados do polimorfismo provenientes da amplificação do DNA nesses isolados. Não foram encontrados marcadores específicos para as espécies hospedeiras nem para suas respectivas origens geográficas.

Os marcadores RAPD vêm sendo utilizados para agrupar fungos ectomicorrízicos isolados de *Eucalyptus* nas seguintes categorias subespecíficas: uma, para analisar variações dentro e entre populações; outra, para distinção de caracteres segregantes nos núcleos estudados, individualmente, em análises assexuais e sexuais, e uma outra, para mapeamento genômico, localizando caracteres ligados a marcadores para facilitar análises de genes específicos (TOMMERUP, 1992).

JUNGHANS et al. (1998) analisaram a diversidade genética do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* com base em análises de RAPD. Foram identificados dois grupos de isolados que tinham relação com sua procedência: no primeiro grupo, com exceção de um, todos os outros eram do Brasil; no segundo, estavam os isolados dos Estados Unidos da América e da França, exceto dois.

Na maioria dos eucariotos, o DNA ribossômico (rDNA) tem sido utilizado extensivamente em estudos filogenéticos de fungos. O rDNA apresenta-se como arranjo repetitivo em cópias múltiplas dos três maiores genes que codificam os diferentes tipos de rRNA, separados ou não por espaçadores transcritos. A ordem dos genes parece ser conservada em todos os organismos, com exceção daquele que codifica o RNA 5S que pode ou não estar localizado dentro dessa unidade repetitiva. O número de cópias de rDNA varia entre as espécies, e pode haver 60 a 220 cópias por genoma haplóide de um fungo (PIPE et al., 1995). O rRNA é sintetizado formando um único RNA precursor, subseqüentemente processado nos rRNAs 17S, 5,8S e 25S (SAGHAI-MAROOF et al., 1984) (Figura 1).

















Figura 1 - Diagrama dos genes que codificam o RNA ribossômico. As setas indicam o local de anelamento dos oligonucleotídeos.

Em fungos, assim como em outros organismos, as regiões espaçadoras (ITS – espaçador interno transcrito - e IGS – espaçador intergênico transcrito) são variáveis, ou seja, pouco conservadas, enquanto as regiões que codificam o rDNA 17S e o rDNA 25S permanecem conservadas entre os organismos (BRUNS et al., 1991).

A amplificação do DNA ribossômico (rDNA) por reação em cadeia da polimerase (PCR), associada ao polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), pode ser utilizada em estudos taxonômicos de fungos, tornando-se ferramenta útil na distinção dos isolados desses organismos, em nível de espécie e gênero (EGGER e FORTIN 1990; GARDES et al. 1990; LOBUGLIO et al. 1991) (Figura 2).

Segundo BRUNS et al. (1991), o método RAPD permite analisar diversidades genéticas em nível de população e de espécie, sendo considerado um marcador intra-específico. No entanto, os marcadores PCR-RFLP, na região do rDNA, permitem fazer análises em nível populacional, específico e de gênero, sendo, nesse caso, um marcador interespecífico (Figura 2).

Análises de RFLP do DNA, que codifica o RNA ribossômico (rDNA), e do DNA mitocondrial (mtDNA), para o seqüenciamento de algumas regiões do rDNA, são as técnicas moleculares atualmente, mais usadas para se estudar variações intra e interespecíficas (BROWN et al., 1994).

<b>Método</b>	<b>População</b>	<b>Espécie</b>	<b>Gênero</b>	<b>Família e ordem</b>	<b>Classe e divisão</b>	<b>Reino</b>
Hibridização DNA total						
RAPD						
<b>RFLP</b>						
Clones anônimos						
mtDNA						
rDNA						
<b>Mapeamento</b>						
Clones anônimos						
mtDNA						
rDNA espaçadores						
rDNA (mit ou nuc.)						
<b>Seqüenciamento</b>						
ITS						
Genes rDNA mitoc.						
Genes rDNA nuc.						
<b>Genes de proteínas</b>						
Moderadamente conservada						
Conservada						

BRUNS et al. (1991)

Figura 2 - Principais métodos moleculares da análise de diversidade genética e taxonomia molecular.

O porquê dessa versatilidade sistemática do rDNA explica-se pelos numerosos padrões de evolução entre suas diferentes regiões, pela capacidade de gerar várias cópias por genoma, e por ser um modelo de evolução conservada entre as cópias repetidas dos genes que codificam o rRNA em espécies diferentes (HILLS e DIXON, 1991).

Segundo AMICUCCI et al. (1996), as regiões ITS e IGS contêm seqüências não codificadoras. Verificaram, também, que a região ITS possui duas seqüências não codificadoras no DNA, situadas entre outras altamente conservadas dos genes dos rRNAs 17S, 5.8S e 25S. A região ITS é amplificada via PCR e a análise genética interespecífica é feita via RFLP.

MARTIN et al. (1991), demonstraram que algumas seqüências de DNA podem caracterizar o gênero ou mesmo a classe de um isolado, de uma espécie, ou outras de grupos maiores. Isto permite a avaliação da variabilidade genética em populações naturais de fungos, a identificação de espécies e isolados, utilizando polimorfismo de DNA e um acompanhamento dos fungos introduzidos no ambiente para determinar sua sobrevivência, seu crescimento e sua disseminação no solo.

GOMES et al. (1999) verificaram, por análise de PCR-RFLP, que isolados de *Pisolithus tinctorius*, originados de hemisférios geográficos diferentes, agrupavam-se de acordo com suas origens, com exceção de um para o qual foi proposta uma nova classificação.

A técnica de análise por PCR-RFLP da região ITS do rDNA requer pequenas quantidades de DNA. Sua amplificação é fácil. Começa-se a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores complementares em seqüências conservadas do rDNA, podendo ser utilizadas em diferentes níveis de taxonomia (KARÉN et al., 1997).

O polimorfismo dos fragmentos hidrolisados do rDNA de 87 isolados de *Rhizoctonia solani* mostrou-se consistente com a classificação intra-específica usual, com base na anastomose de hifas obtidas por VILGALYS e GONZALES (1990). A similaridade dos padrões de restrição, dentro dos grupos intra-

específicos, constitui uma forte evidência da homogeneidade genética dos mesmos.

HERION et al. (1994) observaram que onze isolados de *Tuber* de origens geográficas diferentes apresentaram baixa variação entre regiões ITS. Por esse motivo, concluíram que estas poderiam estar correlacionadas filogeneticamente já que dois isolados apresentaram padrões diferentes, quando exibiram regiões de alta diversidade genética, não correlacionadas entre si.

Em estudos intra e interespecíficos, com que os resultados da análise filogenética, utilizando RFLP e RAPD, foram comparados, observou-se que os dendrogramas, obtidos com base em cada tipo de marcador eram semelhantes em nível intra-específico, mas dissimilares em nível interespecífico (THORMANN et al., 1994).

PEARSSON et al. (1996) caracterizaram espécies de *Arthrobotrys* pela análise o polimorfismo do rDNA, em seis isolados diferentes, utilizando quatro endonucleases. Em um isolado, foi observado polimorfismo e nos outros cinco observou-se um mesmo padrão de restrição da região ITS. Para o isolado que diferiu dos outros, foi sugerido que ele pertencesse a outra espécie.

AHRÉN et al. (1998) fazendo análise filogenética, com base nas seqüências do rDNA 17S de quinze espécies de fungos nematófagos, verificaram que o padrão filogenético não foi concordante com a morfologia dos conídios. Os resultados do agrupamento foram divididos em três linhas: espécies formadas de anéis constritores, espécies não parasitas e espécies com várias estruturas adesivas para infecção de nematóides.

Segundo BAKKER et al. (1995), as seqüências de bases da região ITS do rDNA têm sido utilizadas em estudos filogenéticos, na categoria de espécies e níveis intra-específicos, porque sofrem pouca pressão evolutiva, sendo possível esperar que evoluam a uma velocidade diferente das outras seqüências.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### **3.1. Origem e obtenção dos isolados**

Os 16 isolados do fungo predador do gênero *Arthrobotrys*, utilizados nesse trabalho, são oriundos de sete estados brasileiros e foram obtidos da coleção do Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Naturais do Brasil, muitos deles de culturas vegetais, foram obtidos pelo método de espalhamento de solo de DUDDINGTON (1955), modificado por SANTOS et al. (1991). A procedência dos isolados e suas respectivas culturas, encontram-se no Quadro 1.

#### **3.2 Manutenção da cultura-estoque**

As culturas-estoques dos isolados de *Arthrobotrys* foram cultivadas por sete dias em meio batata-dextrose-ágar 2% (BDA), a 25°C. Após esse tempo, discos de cultura, contendo micélio, foram retirados das bordas da colônia e transferidos para tubos de ensaio com BDA, mantidos a 4°C, no escuro.

Quadro 1 - Espécies de *Arthrobotrys*, origem e detecção em amostras de solo de diferentes culturas

Espécie	Isolado	Origem/ano	Cultura vegetal
<i>A. conoides</i>	A 32	Jaguapitã/ SP (1990)	não determinada
<i>A. conoides</i>	A 40	Jaguapitã/ SP (1990)	não determinada
<i>A. conoides</i>	A 74	Dourados/MS (1991)	milho
<i>A. conoides</i>	A 78	V. do Rio Branco/MG (1990)	arroz
<i>A. conoides</i>	A 241	Papanduva/SC (1993)	alho
<i>A. conoides</i>	A 266	Curitibanos/SC (1993)	alho
<i>A. oligospora</i>	A 72	Dourados/MS (1991)	soja
<i>A. oligospora</i>	A 125	Rondonópolis/MT (1991)	seringueira
<i>A. oligospora</i>	A 183	Cajuri/MG (1992)	citrus
<i>A. robusta</i>	A 31	Jaguapitã/ SP (1990)	não determinada
<i>A. robusta</i>	A 35	Atalaia/PR (1990)	não determinada
<i>A. robusta</i>	A 38	Viçosa/MG (1990)	milho
<i>A. robusta</i>	A 51	Matipó/MG (1991)	feijão
<i>A. robusta</i>	A 75	Dourados/MS (1991)	café
<i>A. robusta</i>	A 134	Ipeúma/SP (1992)	milho
<i>A. robusta</i>	A 265	Flores da Cunha/RS (1993)	alho

### 3.3. Obtenção de massa micelial

Discos de cultura foram repicados para placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura BDA. Nessas placas, os fungos cresceram por sete dias, a 25°C, no escuro. Posteriormente, esses discos, contendo micélio, foram removidos da periferia da cultura e colocados no meio líquido de KADO e HESKET (1970) (10,0 g de sacarose; 8,0 g de caseína ácida hidrolisada; 4,0 g de extrato de levedura; 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em água destilada q.s.p. 1.000 mL), sob agitação por sete dias a 25°C.

### **3.4. Extração de DNA total**

A extração de DNA total dos micélios foi feita em pequena escala, conforme SPECH et al. (1982), com modificações. O micélio foi filtrado em peneira, lavado com água destilada e seco em papel absorvente e gaze. Aproximadamente 1,0 g de micélio foi macerado com N<sub>2</sub> líquido, em almofariz. Em seguida o pó resultante desse processo foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1M pH 7,5; EDTA 500mM pH 8,0; SDS 10%; água MilliQ q.s.p 1.000mL) pré-aquecido a 70°C. Os tubos foram incubados a 70°C por 30 minutos. Após a incubação, acrescentam-se em cada tubo, acondicionado num banho de gelo, por 30 minutos, 350µL de acetato de potássio (5 M). Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo de centrífuga, em seguida, adicionaram-se 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1), misturou-se suavemente por 5 minutos e fez-se 10 minutos de a 12.000 g. Transferiu-se, então, a fase aquosa para um outro tubo, acrescentando igual volume de isopropanol gelado. Misturou-se, novamente, e manteve-se a -20°C, no mínimo por 2 horas ou durante a noite. Nova centrifugação se seguiu por 30 minutos a 12.000 g, sendo, o sobrenadante, descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70%, gelado, e a seguir foi seco por 10 minutos, a vácuo, e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0), acrescido de 2 µL de RNase (concentração final para 10 µg/µL) e incubado a 37°C por 60 minutos. A concentração do DNA total foi estimada a partir da comparação com padrões de DNA de concentração conhecida em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em luz ultra violeta (UV).

### **3.5. RAPD**

Reações da amplificação do DNA total foram feitas utilizando onze oligonucleotídeos aleatórios (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA),

relacionados no Quadro 2. Cada 25  $\mu$ L de reação da amplificação continha Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM; 100  $\mu$ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0,4  $\mu$ M do oligonucleotídeo aleatório; uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 20 ng de DNA total.

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC - 100, MJ Research, Inc.) programado para 40 ciclos. Cada ciclo consistiu-se de três passos: o primeiro de desnaturação, por 15 segundos a 94°C, o segundo, de anelamento, por 30 segundos a 35°C, e o terceiro de extensão, por um minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de sete minutos a 72°C, com a redução da temperatura para 4°C, até a retirada das amostras. Para cada oligonucleotídeo usado, foi feito um controle negativo, no qual o DNA era substituído por TE.

Quadro 2 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados com as respectivas seqüências de bases

Oligonucleotídeos código da operon®	Seqüência 5' → 3'
OPE02	GGTGCGGGAA
OPE04	GTGACATGCC
OPE05	TCAGGGAGGT
OPE06	AAGACCCCTC
OPE09	CTTCACCCGA
OPE10	CACCAGGTGA
OPE13	CCCGATTCCG
OPFO8	GGGATATCGG
OPF10	GGAAGCTTGG
OPF13	GGCTGCAGAA
OPF18	TTCCCGGGTT

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3  $\mu$ L de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL) e corridas em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Ao término das corridas, as imagens dos géis foram digitalizadas sob luz UV, em um sistema de fotodocumentação “Eagle Eye™ II” Stratagene®.

### 3.6. Amplificação por PCR e análise por RFLP

O par de oligonucleotídeos iniciadores, utilizados para amplificação da região ITS (ITS1/ITS4) do rDNA, foram descritos por WHITE et al. (1990) e sintetizados pela Gibco-BRL/Life Technologies, Inc. A seqüência para ITS1 é 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e para ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. A reação de amplificação foi feita em 25 $\mu$ L contendo: 10 ng de DNA, 40 pmoles de cada oligonucleotídeo (ITS1 e ITS4), Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. As amostras de DNA foram amplificadas em um termociclador (PTC - 100, MJ Research, Inc.), programado para 40 ciclos, cada qual consistindo em um passo de desnaturação por 1 min a 94°C, um outro passo de anelamento por 1 min a 50 °C e um último, de extensão, por 1 min e 30 s a 72°C. Depois dos 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C. Reações-controles, nas quais não se adicionaram DNA também foram feitas. Após a amplificação das amostras de DNA, os produtos foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 2%, com brometo de etídio, imersos em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) ou precipitados para análise por RFLP. A precipitação do DNA foi feita pela adição de uma concentração final de 2.5 M de acetato de amônio e 2.5 volumes de etanol absoluto. As amostras foram armazenadas por duas horas a -20°C e centrifugadas a 12.000 g por 30 min. O sedimento foi lavado com 70% (v/v) de etanol ressuspendido em 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O milliQ e digerido com enzimas de

restrição, *Cla* I, *Eco* RI, e *Hinf* I, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%. Depois esses fragmentos foram visualizados nesse mesmo gel, acrescido de brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em seguida, as imagens dos géis foram fotografadas sob luz ultravioleta, com câmera Polaroid MP4 ou digitalizadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye<sup>TM</sup> II, Stratagene®).

### **3.7. Análise de DNA, por eletroforese, em gel de agarose**

O DNA foi analisado por eletroforese, em gel de agarose 0,8 %, numa cuba horizontal com uma corrente de 55 miliamperes, por 5 horas. Para isso, a agarose foi dissolvida em tampão TEB (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M, pH 8,0), no forno microondas. Após o resfriamento, a uma temperatura de aproximadamente 45°C, adicionou-se brometo de etídeo, para uma concentração final de 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A solução foi vertida em uma placa de acrílico com um pente com dentes de 0,5 cm de largura e 0,15 cm de espessura, separados entre si por 0,3 cm.

Após a polime do gel, foram adicionados às amostras, 3  $\mu\text{L}$  de tampão (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 60%) para que se pudesse avaliar a migração dos fragmentos de DNA durante a corrida. Depois da eletroforese, os géis são analisados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em máquina Polaroid modelo MP-4, ou suas imagens pode ser digitalizadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye<sup>TM</sup> II, Stratagene®).

### **3.8. Análise dos dados**

Tanto para os dados de RAPD quanto para os de PCR-RFLP, as fotografias foram analisadas codificando 1 para presença e 0 para ausência de bandas nas diferentes amostras. A presença ou ausência de uma determinada banda de mesmo tamanho, em todos os genótipos comparados,

caracteriza similaridade; e a presença em um, e a ausência em outro, dissimilaridade. No programa, em que os dados foram analisados, a distância genética foi calculada aos pares, utilizando o coeficiente de Nei e Li (NEI e LI, 1979), segundo a fórmula:

$$S_{ij} = 1 - 2N_{ij} / (N_i + N_j),$$

em que

- $S_{ij}$  é a distância genética entre os dois genótipos comparados;
- $N_{ij}$  é o número de bandas monomórficas entre os dois genótipos; e
- $N_i$  e  $N_j$  é o número de bandas nos genótipos  $i$  e  $j$ , respectivamente.

O cálculo das distâncias genéticas foi feito a partir do programa genes descrito por CRUZ (1997) e foram usadas para agrupar os isolados pelo método UPGMA (“unweighted pair-group method using arithmetic means”), avaliados pelo programa STATISTICA 5.0 para Windows.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA total dos 16 isolados (Quadro 1) foi amplificados utilizando 11 oligonucleotídeos de seqüência aleatória. Fragmentos de DNA de vários tamanhos foram sintetizados na presença de todos os oligonucleotídeos testados. Os resultados da amplificação, com um desses oligonucleotídeos estão na Figura 3.

Num exame mais apurado dos 11 oligonucleotídeos, foram obtidos 107 fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, com uma média de 9,7 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo, para os 16 isolados em estudo. Todos os fragmentos de DNA, analisados por eletroforese em gel de agarose, foram polimórficos, ou seja, estavam ausentes ou presentes em pelo menos um desses isolados. O número de fragmentos de DNA, relativo a cada oligonucleotídeo, variou de 7 a 13 (Quadro 3).

Com base na presença e na ausência de fragmentos amplificados de DNA, considerando os sete isolados de *A. robusta*, verificou-se que a variação dos valores das distâncias genéticas, entre esses isolados, foi 16%, nos pares A35 e A38, e 79%, em A35 e A51. A média das distâncias genéticas para todos os isolados foi 53%, enquanto a de cada um deles, considerando os sete, variou de 48 a 64% (Quadro 4). Esses dados mostram um alto grau de diversidade genética entre os isolados de *A. robusta*. A análise do dendrograma (Figura 5),

Quadro 3 - Relação dos oligonucleotídeos, das respectivas seqüências de bases e do número dos fragmentos polimórficos analisados

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Nº de fragmentos polimórficos
OPE02	GGTGCGGGAA	13
OPE04	GTGACATGCC	13
OPE05	TCAGGGAGGT	11
OPE06	AAGACCCCTC	10
OPE09	CTTCACCCGA	10
OPE10	CACCAGGTGA	8
OPE13	CCCGATTCCG	11
OPF08	GGGATATCGG	11
OPF10	GGAAGCTTGG	11
OPF13	GGCTGCAGAA	10
OPF18	TTCCCGGGTT	7

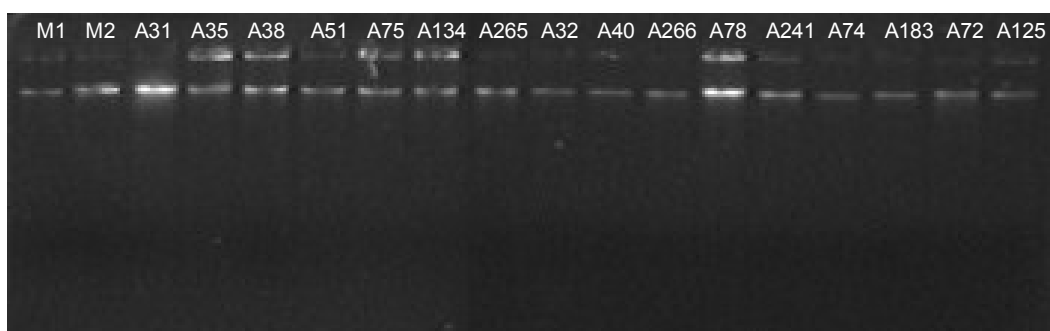


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total das amostras dos isolados fúngicos. As denominações das canaletas correspondem à identificação do Quadro 1. (M1 e M2) DNA de lambda, nas concentrações 20 e 50 ng/ $\mu$ L, respectivamente.

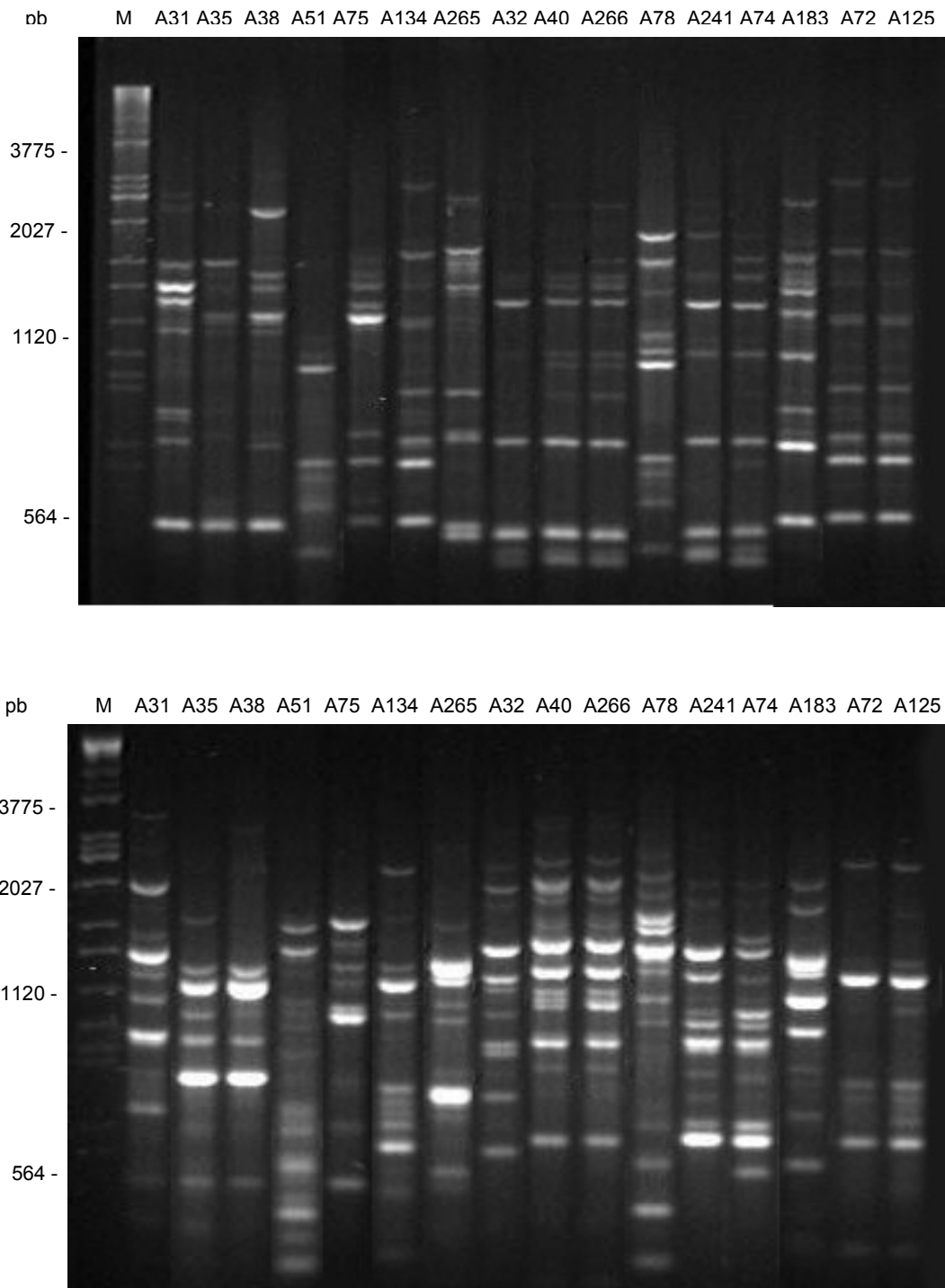


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de DNA amplificado dos isolados de *A. robusta*, *A. conoides* e *A. oligospora* utilizando oligonucleotídeos iniciadores OPE04 (A) e OPF13 (B). As denominações das canaletas correspondem à identificação do Quadro 1. (M) DNA de lambda, hidrolizado com *Hind* III/*Eco* RI.

construído a partir da matriz de distância genética, indicou não ser possível estabelecer uma correlação entre os cinco subgrupos de isolados, considerando o ano e o local da coleta. O isolado A51 constituiu um subgrupo distinto, com uma média de distância genética de 64% em relação aos demais. Isso pode estar relacionado a uma identificação incorreta desse isolado como *A. robusta*. O valor elevado das distâncias genéticas (Quadro 5), entre isolados, sugere que eles possuam uma alta diversidade genética intra-específica.

MAHUKU et al. (1998), usando marcadores RAPD, analisaram a diversidade genética de isolados do *Microdochium nivale* e verificaram um alto grau de distância genética entre as populações. Por meio da análise do dendrograma, observaram que isolados da população três eram geneticamente distantes das outras. Concluíram que essa divergência poderia ser um indicativo de especiação.

Análises semelhantes às de *A. robusta* foram realizadas com os isolados de *A. conoides*, coletados em quatro estados (Quadro 1). Os valores das distâncias genéticas, obtidos para os seis isolados de *A. conoides*, variaram entre 9% nos pares A40 e A 266, e 69%, nos pares A32 e A78 (Quadro 6). Já a média dessas distâncias variou entre 33% e 55% (Quadro 7). A análise do dendrograma dessa espécie (Figura 6) permitiu agregar os isolados A32, A40, A74, A241 e A266 em um sub-grupo e o A78 em um outro sub-grupo. Essa alta distância genética, observada entre o isolado A78 e os demais, pode estar relacionada com o fato de que ele não esteja corretamente identificado como *A. conoides*. Presume-se que ele deva pertencer a uma outra espécie não considerada nesse estudo.

Confrontando os valores das distâncias genéticas, dos três isolados de *A. oligospora*, observou-se uma variação de 17% nos pares A125 e A72, e 62% em A183 e A72 (Quadro 8), com uma média de variação entre 23% e 38% (Quadro 9). Nos isolados, geograficamente mais próximos, a média foi menor. De acordo com o dendrograma, construído a partir dos dados do Quadro 9, formaram-se dois subgrupos: um, com os isolados A125 e A72 e um

Quadro 4 - Média das distâncias genéticas (%) obtidas para cada isolado de *Arthrobotrys robusta* em relação aos demais. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

Isolados	Distância genética (%)
A51 -	64
A75 -	55
A134 -	54
A31 -	53
A265 -	50
A35 -	49
A38 -	48

Quadro 5 - Matriz de distância genética entre os isolados de *Arthrobotrys robusta*. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

	A31	A265	A51	A35	A38	A134	A75
A31	0,0000						
A265	0,4848	0,0000					
A51	0,7391	0,7143	0,0000				
A35	0,6765	0,5897	0,7931	0,0000			
A38	0,5833	0,6585	0,7742	0,1667	0,0000		
A134	0,6857	0,4750	0,7667	0,5854	0,6279	0,0000	
A75	0,6000	0,6190	0,7391	0,6563	0,5882	0,6615	0,0000

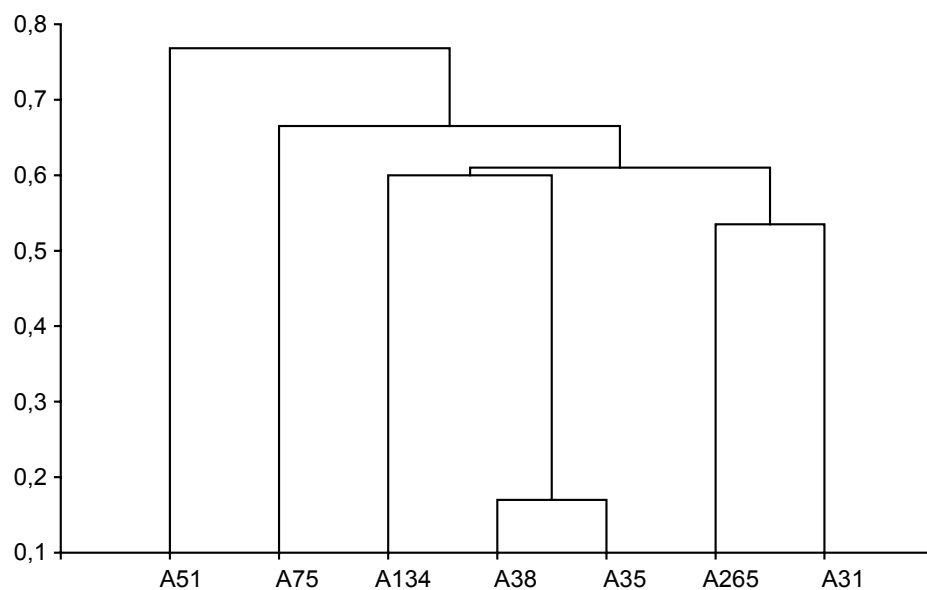


Figura 5 - Dendrograma dos isolados de *A. robusta*, obtido pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas do Quadro 5.

Quadro 6 - Matriz de distância genética entre os isolados de *Arthrobotrys conoides*. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

	A40	A266	A78	A241	A74	A32
A40	0,0000					
A266	0,0989	0,0000				
A78	0,6667	0,6049	0,0000			
A241	0,3902	0,4353	0,6389	0,0000		
A74	0,2840	0,3095	0,6338	0,3067	0,0000	
A32	0,2289	0,2326	0,6986	0,3766	0,3158	0,0000

Quadro 7 - Média das distâncias genéticas (%), obtidas para cada isolado de *A. conoides*, em relação aos demais. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

Isolados	Distância genética (%)
A78	55
A241	39
A74	35
A32	33
A40	33
A266	33

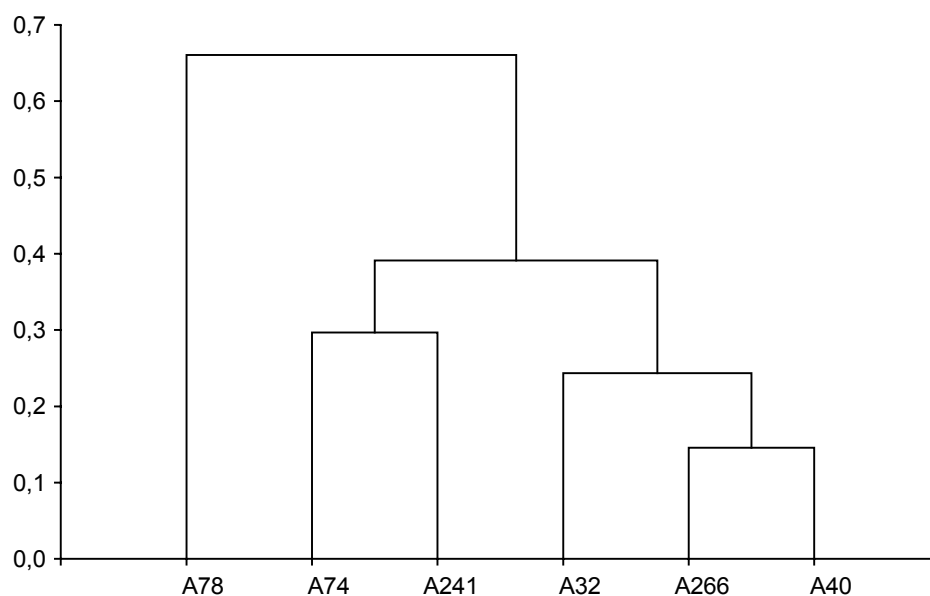


Figura 6 - Dendrograma de isolados de *A. conoides*, obtido com base nas distâncias genéticas do Quadro 6, pelo método UPGMA.

Quadro 8 - Matriz de distância genética entre os isolados de *Arthrobotrys oligospora*. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

	A183	A72	A125
A183	0,0000		
A72	0,6279	0,0000	
A125	0,5366	0,1707	0,0000

Quadro 9 - Média das distâncias genéticas (%), obtidas para cada isolado de *A. oligospora*, em relação aos demais. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

Isolado	Distância genética (%)
A183	38
A72	26
A125	23

outro, com o A183, que apresentou distância genética alta em comparação aos outros dois (Figura 7). É provável que esse último esteja com a sua classificação incorreta.

Em nosso estudo, confirmou-se que os 11 oligonucleotídeos testados por RAPD mostraram polimorfismo para todos os isolados das três espécies. Os dados da matriz de distância genética, construída para os 16 isolados (Quadro 10), foram analisados nos programas Genes e Statistica 5.0 para Windows, na qual foi feita uma análise de agrupamento que permitiu a construção de uma dendrograma para agrupar esses isolados de acordo com a distância genética específica de cada um, pelo método de ligações simples.

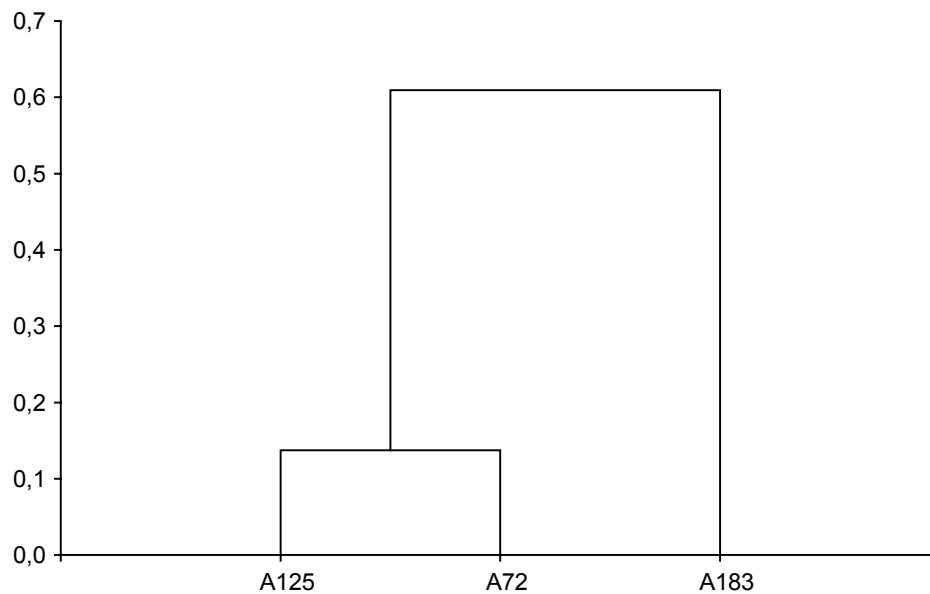


Figura 7 - Dendrograma dos isolados de *A. oligospora*, obtido com base nas distâncias genéticas do Quadro 8, pelo método UPGMA.

Por esse método, o dendrograma, ao ser construído, separa, esses isolados em grupos, tomando 100% como a maior distância entre os dois principais grupos. Estes divididos em vários subgrupos, têm suas distâncias sempre determinadas pela maior distância entre os indivíduos que os compõem.

Investigando as três espécies por esse método constatou-se que, o dendrograma, ao ser construído, separou os isolados em grupos. Verificou-se que a maior distância encontrada foi 83%, entre os isolados A51 e A40, de espécies distintas e a menor, 10%, entre os isolados A40 e A266, da mesma espécie. Quando A51 foi comparado a outros da sua espécie, apresentou uma alta distância genética, com média em torno de 75%. Julgamos que essa média alta possa ter promovido erro na sua classificação. O isolado A78 também apresentou uma alta distância genética quando comparado às outras três espécies. Em relação à sua espécie, ele apresentou uma média de 77% de distância genética. A média de 60% de distância genética, apresentada por

Quadro 10 - Matriz de distância genética entre os isolados de *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides* e *A. robusta*. Os isolados correspondem a identificação do Quadro 1

	A31	A183	A40	A266	A265	A78	A241	A51	A74	A35	A38	A32	A134	A72	A125
A183	0,4930	0,0000													
A40	0,6944	0,4943	0,0000												
A266	0,6267	0,4222	0,0989	0,0000											
A265	0,4848	0,4568	0,6629	0,6235	0,0000										
A78	0,7419	0,5584	0,6667	0,6049	0,7222	0,0000									
A241	0,7273	0,6790	0,3902	0,4353	0,6842	0,6389	0,0000								
A51	0,7391	0,6066	0,8387	0,7231	0,7143	0,4231	0,7857	0,0000							
A74	0,6308	0,5500	0,2840	0,3095	0,6800	0,6338	0,3067	0,7091	0,0000						
A35	0,6765	0,4940	0,7381	0,7241	0,5897	0,6757	0,7179	0,7931	0,6883	0,0000					
A38	0,5833	0,4943	0,7045	0,6923	0,6585	0,6410	0,7317	0,7742	0,7284	0,1667	0,0000				
A32	0,7313	0,5854	0,2289	0,2326	0,6883	0,6986	0,3766	0,8246	0,3158	0,7468	0,7831	0,0000			
A134	0,6857	0,6235	0,6512	0,6404	0,4750	0,6316	0,6500	0,7667	0,6456	0,5854	0,6279	0,5062	0,0000		
A72	0,6338	0,6279	0,6552	0,6444	0,5062	0,6364	0,6790	0,7705	0,6750	0,6145	0,5862	0,5366	0,0588	0,0000	
A125	0,6418	0,5366	0,6867	0,6047	0,5584	0,5890	0,6883	0,6491	0,7105	0,5949	0,5422	0,5897	0,2099	0,1707	0,0000
,475	0,6000	0,4493	0,5882	0,4648	0,6190	0,7377	0,6333	0,7391	0,5738	0,6563	0,5882	0,5238	0,6615	0,6471	0,5238

A183 também foi relativamente elevada 60%, em comparação com os demais da sua espécie.

Os isolados foram divididos em vários subgrupos. Nesse processo, a maior distância que cada indivíduo apresentasse é que determinaria a distância genética entre eles (Figura 8). O uso dos marcadores RAPD demonstrou uma variação intra-específica alta. Os isolados da espécie *A. conoides* se agruparam em um subgrupo com a exceção de A78. Observou-se que os isolados A51 e A78 se agruparam entre si, demonstrando estarem geneticamente mais distantes dos demais. Os isolados da espécie *A. oligospora* também se agruparam em um outro subgrupo, com a exceção de A183, que se agrupou com os de *A. robusta*. Já estes, de *A. robusta*, não se agruparam em um subgrupo específico, como aqueles das outras espécies, porém mantiveram-se próximos.

GROTH et al. (1995) sugeriram que a diversidade genética existente em uma população de *Uromyces appendiculatus* pode ser causada pela migração, seleção e recombinação sexual dos indivíduos. A existência e a frequência da reprodução sexual nesse gênero não é conhecida na natureza, uma vez que este fungo está classificado como um Deuteromycetes.

Qualquer um dos polimorfismos, observados durante a análise de RAPD, pode ter ocorrido por eventos, tais como, substituição, inversão ou deleção de pares de base, no sítio de anelamento do oligonucleotídeo. O polimorfismo é detectado nos isolados de diferentes localidades, independentemente da distância geográfica (MEIJER, et al., 1994).

Visto que os isolados, A78 e A51, apresentaram distâncias genéticas muito diferentes, quando comparados a isolados de suas respectivas espécies, foi feita uma matriz de distância genética entre essas duas espécies (Quadro 11). A partir dos dados da matriz, foi construído um dendrograma, no qual verificou-se a formação de três subgrupos distintos (Figura 9). No primeiro, agruparam-se os isolados de *A. conoides*, exceto o A78; no segundo, foram agrupados os isolados da espécie *A. robusta*, com exceção do A51; e no terceiro, os isolados A51 e A78.

Quadro 11 - Matriz de distância genética entre os isolados de *Arthrobotrys conoides* e *A. robusta*. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

	A31	A40	A266	A265	A78	A241	A51	A74	A35	A38	A32	A134
A40	0,6944	0,0000										
A266	0,6267	0,0989	0,0000									
A265	0,4848	0,6829	0,6235	0,0000								
A78	0,7419	0,6667	0,6049	0,7222	0,0000							
A241	0,7273	0,3902	0,4353	0,6842	0,6389	0,0000						
A51	0,7391	0,8387	0,7231	0,7143	0,4231	0,7857	0,0000					
A74	0,6308	0,2840	0,3095	0,6800	0,6338	0,3067	0,7091	0,0000				
A35	0,6765	0,7381	0,7241	0,5897	0,6757	0,7179	0,7931	0,6883	0,0000			
A38	0,5833	0,7045	0,6923	0,6585	0,6410	0,7317	0,7742	0,7284	0,1667	0,0000		
A32	0,7313	0,2289	0,2326	0,6883	0,6986	0,3766	0,8246	0,3158	0,7468	0,7831	0,0000	
A134	0,6857	0,6512	0,6404	0,4750	0,6316	0,6500	0,7667	0,6456	0,5854	0,6279	0,5062	0,0000
A75	0,6000	0,5882	0,4648	0,6190	0,7377	0,6333	0,7391	0,5738	0,6563	0,5882	0,5238	0,6615

Nas pesquisas sobre fungos, RAPD tem sido utilizado para análises filogenéticas em nível intra-específico (Figura 2). JUNGHANS et al. (1998) observaram uma grande diversidade genética entre 20 isolados de *Pisolithus tinctorius*, quando estes foram analisados por RAPD-PCR, e agrupados de acordo com sua procedência.

van der VLUGT-BERGMANS et al. (1993) analisaram vários isolados de *Botrytis cinerea* por RAPD e verificaram um alto grau de diversidade genética entre eles, porém, não foi encontrada nenhuma correlação entre suas plantas hospedeiras ou suas respectivas origens geográficas.

A região ITS do rDNA, que inclui o 5,8S rDNA, foi amplificada por PCR, nos fungos nematófagos, em seis isolados de *A. conoides* e em sete de *A. robusta*. O tamanho do produto da amplificação variou de 580 a 700pb aproximadamente, e em cada um deles foi amplificado apenas um fragmento de DNA (Figura 10). Houve polimorfismo de tamanho na região ITS do isolado A78 da espécie *A. conoides* e do A51, da espécie *A. robusta*, ambos com aproximadamente 580 pb (Figura 10), antes de se fazer hidrólise com enzimas de restrição.

Para determinação do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, os produtos de amplificação da região ITS foram hidrolisados com as enzimas de restrição *Cla* I, *Eco* RI e *Hinf* I. A Figura 11 mostra o padrão de fragmentos de DNA obtidos com a enzima *Hinf* I. A hidrólise do DNA, com essas enzimas, resultou em fragmentos de tamanhos diferentes, indicando polimorfismo para todas as enzimas utilizadas (Quadro 12). O DNA total de cinco isolados de *A. conoides* e de seis de *A. robusta*, originários de diversas regiões do Brasil, produziram padrões idênticos de PCR-RFLP, quando se utilizaram diferentes três enzimas de restrição, dentro de cada espécie.

Os fragmentos de restrição do DNA obtidos com todas as endonucleases de restrição, foram utilizados para determinar as distâncias genéticas entre os genótipos analisados. Conforme os padrões de restrição, foi construída uma matriz de distância genética para os isolados de *A. conoides* e de *A. robusta*. As distâncias genéticas variaram de 0 e 100% (Quadro 13).

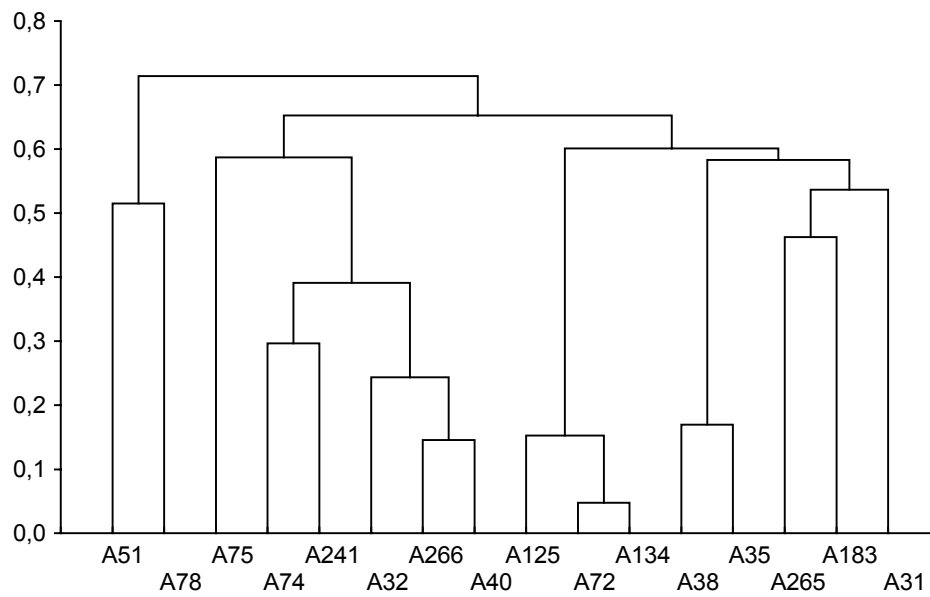


Figura 8 - Dendrograma construído pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas dos isolados de *A. robusta*, *A. conoides* e *A. oligospora*, apresentadas no Quadro 10.

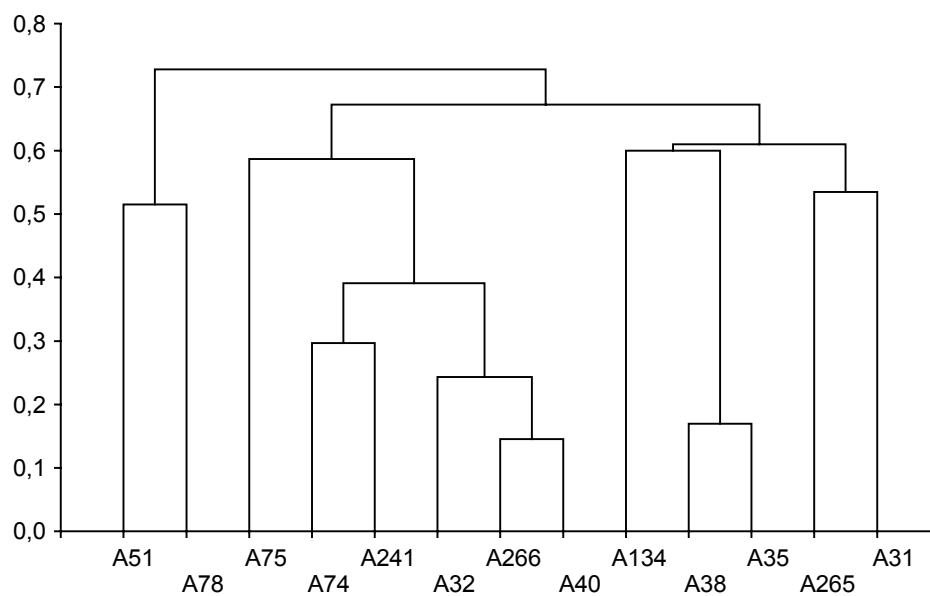


Figura 9 - Dendrograma construído pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas dos isolados de *A. robusta* e *A. conoides*, apresentadas no Quadro 11.

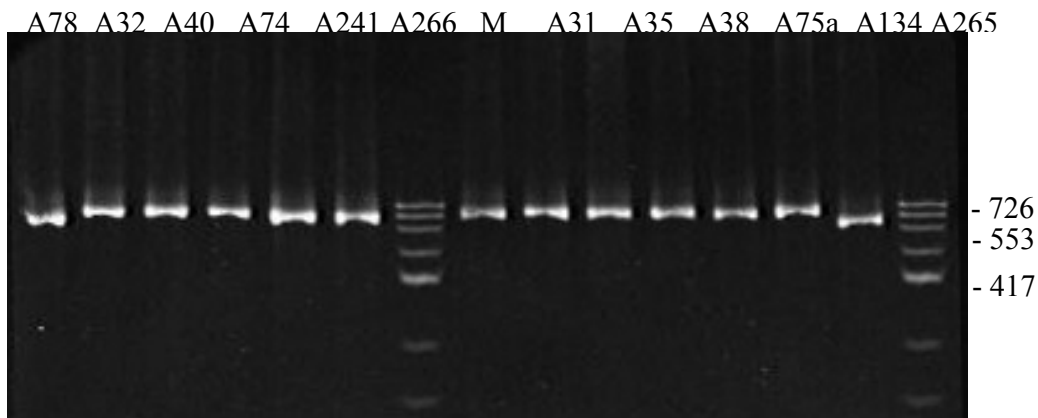


Figura 10 - Gel de eletroforese em agarose 2% da região ITS do rDNA dos seis isolados de *Arthrotrrys conoides*, e dos sete de *A. robusta*, amplificada por PCR. As denominações das canaletas correspondem às identificações do Quadro 1. (M) DNA de  $\phi$ X 174 hidrolisado com *Hinf* I.

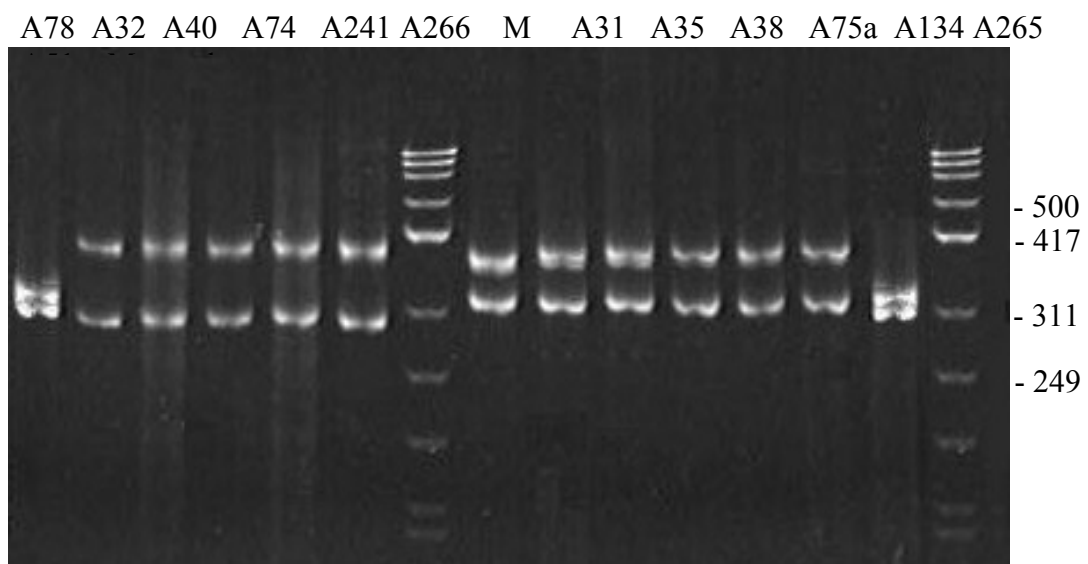


Figura 11 - Gel de eletroforese em agarose 2% da região ITS do rDNA dos seis isolados de *Arthrotrrys conoides*, e dos sete de *A. robusta*, amplificada por PCR e hidrolisada com a enzima de restrição *Hinf* I. As denominações das canaletas correspondem às identificações do Quadro 1. (M) DNA do fago  $\phi$ X174, hidrolisado com *Hinf* I.

Quadro 12 - Tamanho dos fragmentos de DNA (pb), hidrolisados com as enzimas de restrição *Cla* I, *Eco* RI e *Hinf* I da região ITS do rDNA, de diferentes isolados dos fungos nematófagos. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

Isolados	Enzimas de restrição					
	<i>Cla</i> I		<i>Eco</i> RI		<i>Hinf</i> I	
A32	350	290	330	280	360	300
A40	350	290	320	280	370	300
A74	350	290	320	280	370	300
A78	340	230	270	270	320	290
A241	350	290	330	280	370	320
A266	350	290	330	280	370	320
A31	350	290	340	300	370	320
A35	350	290	350	300	380	320
A38	350	290	340	300	390	320
A51	320	220	280	280	320	300
A75	350	290	340	300	390	320
A134	350	290	340	300	390	320
A265	350	290	360	320	390	320

Quadro 13 - Matriz da distância genética entre os seis isolados de *Arthrobotrys conoides* e os sete de *A. robusta*. O cálculo da matriz fundamentou-se nos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA, hidrolisados com diferentes enzimas de restrição. Os isolados correspondem à identificação do Quadro 1

	A32	A40	A74	A78	A241	A266	A31	A35	A38	A51	A75	A134
A40	0	0										
A74	0	0	0									
A78	1	1	1	0								
A241	0	0	0	1	0							
A266	0	0	0	1	0	0						
A31	1	1	1	1	1	1	0					
A35	1	1	1	1	1	1	0	0				
A38	1	1	1	1	1	1	0	0	0			
A51	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0		
A75	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
A134	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
A265	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0

A análise do dendrograma (Figura 12) construído a partir da matriz de distância genética para os isolados de *A. robusta*, indicou, como já era esperado, um agrupamento de acordo com sua espécie, com exceção do isolado A51.

O isolado A78 se destacou perante os outros da sua espécie ao se fazer análise do dendrograma, construído a partir da matriz de distância genética. verificou-se que o agrupamento de cinco isolados de *A. conoides* mantiveram os caracteres de sua espécie, e o outro, formado pelo A78 apresentou padrão de restrição diferente em todas as enzimas testadas, quando comparado aos outros cinco.

O dendrograma (Figura 12), construído a partir dos dados da matriz de distância genética para as espécies de *A. conoides* e *A. robusta*, da região ITS do rDNA, definiu a formação de três grupos. O primeiro grupo foi formado pelos isolados de *A. conoides*, com exceção do A 78; o segundo, formou-se pelos isolados de *A. robusta*, com exceção do A 51; A51 e A78 agruparam-se, formando o terceiro grupo. Isto pode ter ocorrido por causa de um polimorfismo dentro das unidades de repetição do rDNA. Neste caso, pode ter havido um erro de classificação dos isolados A51 e A78, uma vez que estes não se agruparam às suas respectivas espécies.

A hidrólise da região ITS (Figura 11), com as três enzimas de restrição testadas, demonstrou um padrão de restrição diferente para os isolados A51 e A78, embora cada um pertença a espécies diferentes. Na análise do dendrograma, observou-se que ambos formaram um grupo, com caracteres sugerindo de uma espécie, distinta das outras duas estudadas nesse trabalho. Estes resultados demonstraram uma alta variação interespecífica da região ITS.

PEARSON et al. (1996) estudaram a caracterização de seis isolados de *Arthrobotrys oligospora*. A identificação de cada um foi feita de acordo com a sua morfologia, usando com marcadores em nível de DNA (PCR-RFLP de rDNA). Cinco isolados apresentaram um padrão de restrição idêntico. O sexto apresentou um similar, mas não idêntico aos isolados de *A. superba*. Sua

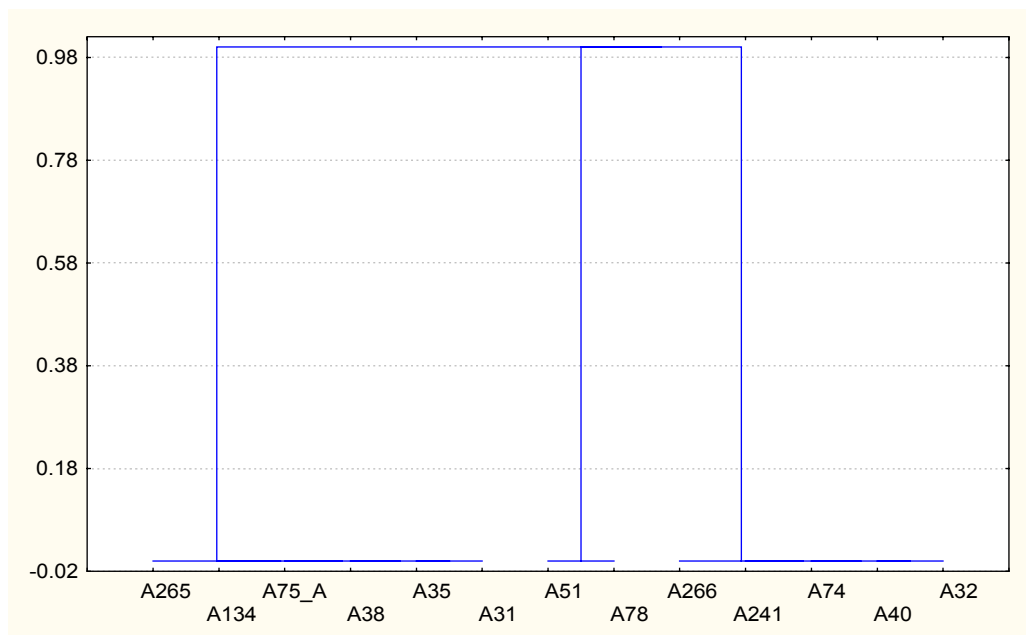


Figura 12 - Dendrograma da região ITS dos isolados de *A. conoides* e *A. robusta* com base no Quadro 13, pelo método UPGMA.

correta identificação e caracterização não foram realizadas nesse trabalho.

AHRÉN et al. (1998) fizeram análise filogenética com base nas seqüências do rDNA de quinze espécies de fungos nematófagos, e verificaram que o padrão filogenético não estava de acordo com a morfologia dos conídios. Dividiram, portanto, os resultados do agrupamento, em três linhas: espécies com anéis constritores, espécies não parasitas, e espécies com várias estruturas adesivas passíveis de infecção por nematóides.

GOMES et al. (1999) analisaram por PCR-RFLP do rDNA, 19 isolados de *Pisolithus* spp. de origens geográfica diferentes. Depois, amplificaram e hidrolisaram a região ITS do rDNA com várias enzimas de restrição. Através da análise de agrupamento desses isolados, observaram formação de três grupos: grupo um, com isolados do hemisfério norte, exceto o isolado Pt1; grupo dois, com isolados do no Brasil, e o grupo três, com o isolado Pt1.

Análises adicionais da região IGS, do rDNA 17S e do 25S, resultaram na formação de grupos similares aos formados pela amplificação e restrição do ITS, sugerindo que a taxonomia desse fungo ectomicorrízico deva ser revista.

Nesse estudo, analisou-se a diversidade genética dos isolados de fungos nematófagos por RAPD-PCR e por PCR-RFLP da região ITS, do rDNA. Conforme a Figura 2 (BRUNS et al 1991), análises genéticas com marcadores RAPD permitem agrupar indivíduos que pertencem a uma mesma população e espécie. De acordo com os resultados desse trabalho, foi possível agrupar com exceção de A51, A78 e A183, todos os isolados pertencentes a *A. conoides*, *A. oligospora* e *A. robusta* dentro de suas respectivas espécies. Já as análises por PCR-RFLP do rDNA, permitem uma análise interespecífica. O agrupamento dos isolados dentro de suas respectivas espécies e a exclusão de A51 e A78.

Sugerimos, então, que por apresentarem diferentes padrões de polimorfismos, quando comparados com suas respectivas espécies, esses três isolados, A51, A78 e A183, devam ter suas classificações revistas.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética em isolados do fungo *Arthrobotrys conoides*, *A. oligospora* e *A. robusta*, utilizaram-se as técnicas de RAPD e PCR-RFLP da região ITS do rDNA. Foram analisados seis isolados de *A. conoides*, três de *A. oligospora*, e sete de *A. robusta* por RAPD; seis isolados de *A. conoides* e sete de *A. robusta*, por PCR-RFLP do rDNA.

Os micélios fúngicos foram cultivados por uma semana, para uma posterior extração de DNA total. Este foi amplificado, utilizando 11 oligonucleotídeos de seqüência aleatória; os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 1,2%. Amplificaram-se 107 fragmentos de DNA, todos polimórficos. O número de bandas de DNA, por oligonucleotídeo, variou de sete a 13.

As distâncias genéticas entre os pares de isolados foram calculadas, com base nos dados de presença e ausência das 107 bandas analisadas para os 16 em estudo. As distâncias genéticas entre os pares de isolados. As distâncias obtidas ficaram em uma faixa de 9 a 83%, quando os isolados das três espécies foram analisados em conjunto. Elaborou-se um dendrograma para agrupar os isolados de acordo com as suas distâncias genéticas. Observou-se, a partir do dendrograma, a formação de quatro agrupamentos: o primeiro, com isolados da espécie *A. conoides*; o segundo, com os de *A.*

*oligospora*; e o terceiro, com os de *A. robusta*. O quarto foi formado por um isolado de *A. conoides* (A78) e o quinto, por um de *A. robusta* (A51). Ambos diferiram de suas espécies e o isolado A183, identificado como *A. oligospora*, agrupou-se com os de *A. robusta*. Foi feito, também, separadamente, um dendrograma para cada uma das três espécies, a fim de verificar suas diversidades genéticas intra-específicas.

A técnica de RAPD mostrou-se confiável, rápida, reprodutível e de fácil execução. Seus marcadores demonstraram eficiência para detecção de polimorfismo genético interespecífico e intra-específico, quando os apreenderam entre os isolados de *Arthrobotrys* spp, durante a amplificação de fragmentos polimórficos de DNA.

A variação dentro da região ITS do DNA ribossômico (rDNA) de sete isolados de *A. robusta* e seis de *A. conoides* foi analisada por PCR, seguida da análise do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Os produtos de amplificação da região ITS foram hidrolisados com três endonucleases de restrição. As análises de agrupamento, com base nos fragmentos de DNA de restrição, separaram os isolados em três grupos distintos: um, formado por cinco isolados da espécie *A. conoides*; outro, por seis da espécie *A. robusta* e um outro, pelos dois, A51 e A78 de espécie não definida. Esses dados sugerem a revisão da classificação desses isolados que certamente devem pertencer a uma outra espécie não analisada nesse estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.275, 1986.
- ALFENAS, A. C., JENG, R., HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.1756-1762, 1984.
- AMICUCCI, A., ROSSI, I., POTENZA, L., ZAMBONELLI, A., AGOSTINI, D., PALMA, F., STOCCHI, V. Identification of ectomycorrhizal from *Tuber* species by RFLP analysis of ITS region. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 821-825, 1996.
- ARAÚJO, J.V. **Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do gênero *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos.** Belo Horizonte: UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 1996. 110p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ARAÚJO, J.V., JUNGHANS, T.G., ALFENAS, A.C. et al. Isoenzyme analysis of *Arthrobotrys*, a nematode-trapping fungus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.30, p.1149-1152, 1997.
- AHRÉN, D., URSING, B.M., TUNLID, A. Phylogeny of nematode-trapping fungi based on 18S rDNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v.158, p.- 179-184, 1998.
- BAKKER, F.T., OLSEN, J.L., STAM, W.T. Evolution of nuclear rDNA sequence in the *Cladophora albida/sericea* Clade (Chlorophyta). **Journal of Molecular Evolution**, v40, p.640-651, 1995.

- BARRON, G.L. (Ed.) **The nematode-destroying fungi**. Canadá: Canadian Biological Publications, 1977. 140p.
- BARZA RAMOS, T.M., UPADHAYAY, H.P. Fungos dos solos do nordeste do Brasil 4. **Atas do Instituto de Micologia**, v.3, p.328-355, 1966.
- BELDER, E. den **Trapping of root-knot nematodes by the adesive hyphae-forming fungus *Arthrobotrys oligospora***. Wageningen: Agricultural University Wageningen, 1994. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Agricultural University Wageningen, 1994.
- BONDE, M.R, PETERSON, G.L., MAAS, J.L. Isozyme comparions for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Phytopathology**, v.81, p.1523-1528, 1991.
- BROWN, A.E., MUTHUMEENAKSHI, S., SWINBURNE, T.R. et al. Detection of the source of infection of apple trees by *Cylindrocarpon heteronema* using DNA polimorphims. **Plant Pathology**, v 43, p.338-343, 1994.
- BRUNS, T.D., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J, GRESSHOFF, P.M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biol. technology**, v.9, p.553-557, 1991.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. **PCR Methods Applíc.**, v.3, p.85-94. 1993.
- CASTRO, J.M.C. **Influência de alguns fatores na predação de fitonematóides por um isolado de *Arthrobotrys musiformis***. Viçosa, MG: UFV, 1998. 58p. Dissertação em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- COOKE, R.C., GODFREY, B.E.S. A key of nematode-destroying fungi. **Transation British Mycological Society**, Cambridge, v.47, p.61-74, 1964.
- CROWHURST, R.N., HAWTHORNE, B.T., RIKKERINK, E.A.,TEMPLETON, M.D.Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *curcubitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v.20, p.391-395, 1991.
- CRUZ, C.D. **Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG, UFV, 1997, 442p.

- DIAS, W.P. **Controle de *Meloidogyne incognita*, raça 3, com *Arthrobotrys* spp.** Viçosa, MG: UFV, 1992. 71p. Dissertação em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. **Mycologia**, New York, v.29, p.447-552, 1937.
- DRECHSLER, C. Several species of *Dactylella* and *Dactylaria* that capture free-living nematodes. **Mycologia**, New York, v.42, p.1-79, 1950.
- DUDDINGTON, C.L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transaction British Mycological Society**, Cambridge, v.38, p.97-103, 1955.
- EGGER, K.N., FORTIN, J.A. Identification of taxa of E-strain mycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, p. 1482-1488, 1990.
- ERLAND, S., HERION, B., MARTIN, F., GLOVER, L.A. ALEXANDER, I.J. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. **New Phytologist**, v. 126, p. 525-532, 1994.
- ESTEY, R.H., OLTHOF, Th. H.A. The occurrence of nematophagous fungi in Quebec. **Phytoprotection**, v.46, p.4-17, 1965.
- FERRAZ, S., SANTOS, M.A.S. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Fitopatologia**, v.3, p.283-314, 1995.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220P.
- FOSTER, L.M., KOZAK, K.R., LOFTUS, M.G., STEVENS, J.J., ROSS, I.K. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycological Research**, v.97, p.769-781, 1993.
- FREIRE, F.C.O., BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.577-596, 1985.
- GALLEGY, M.E. New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. In: ERWIN, D.C, BARTNICKI-GARCIA, S., TSAO, P.H., (Eds.) *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. St. Paul: APS Press, 1983. P.167-174.

- GARDES, M., FORTIN, J.A., MUELLER, G.M., KROPP, B.R. Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp.: *L. bicolor*, *L. laccat*, *L. proxima* and *L. amethystina*. **Phytopathology**, v. 8, p. 1312-1317, 1990.
- GOMES, A. P.S. **Controle Biológico *in vivo* de Nematódeos Parasitos Gastrointestinais de Bovinos pelo Fungo *Arthrobotrys robusta* e atividade *in vitro* de Isolados do fungo *Monacrosporium* sobre Nematódeos**,. Viçosa, MG: UFV, 1998. 81p. Dissertação em Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- GOMES, E.A., BARROS, E.G., KASUYA, M.C., ARAÚJO, E.F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. **Mycorrhiza**, v.8, p.197-202, 1999.
- GOSSELIN, L., JOBIDON, R., BERNIER, L. Assessment of genetic variation within *Chondrostereum purpureum* from Quebec by random amplified polymorphic DNA analysis. **Mycological Research**, v.2, p.151-158, 1996.
- GRAY, N.F. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. **Annals of Applied Biology**, v.102, p.501-509, 1983.
- GRAY, N.F. Ecology of nematophagous fungi: method of collection, isolation and maintenance of predatory and endoparasitic fungi. **Mycopathologia**, v.86, p.143-153, 1984.
- GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, Vodickova, v.62, p.245-304, 1987.
- GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR JR., G.O., JANSSON, H.B. (Ed). **Disease of nematodes**. USA, 1988. v.2.
- GROTH, J.V., McCAIN, J.W., ROELFS, A.P. Virulence and isozyme diversity of sexual versus asexual collections of *Uromyces appendiculatus*. **Heredity**, v.75, p.234-242, 1995.
- GUTHRIE, P.A.I., MAGILL, C.W., FREDERIKSEN, R.A., ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.82, p.832-835, 1992.
- HAARD, K. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* corda. **Mycologia**, New York, v.60, p.1140-1159, 1968.

- HASHMI, H.A., CONNAN, R.M. Biological control of ruminant Trichostrongylids by *Arthrobotrys oligospora*, predacious fungus. **Parasitologia Today**, Oxford, v.5, n.1, p.28-30, 1989.
- HENRION, B., CHEVALIER, G., MARTIN, F. Typing truffle species by PCR amplication of ribosomal DNA spacers. **Mycological Research**, v.1, p.37-43, 1994.
- HILLS, D.M., DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v.66, n.4, p.411-431, 1991.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.453-489, 1986.
- JUNGHANS, D.T., GOMES, E.A. , GUIMARÃES W.V., BARROS, E.G., ARAÚJO, E.F. Genetic diversity or the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorriza**, v.7, p.243-248, 1998.
- KADO, C.I., HESKET, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathol*, v.60, p.969-976, 1970.
- KARÉN, O., HOGBERG, N., DAHLBERG, A. et al. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. **New Phytologist**, v.136, p.313-325, 1997.
- LIMA, R.D. **Caracterização de isolados e avaliação da patogenicidade de *Arthrobotrys* spp. a fitonematóides**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 88p. Dissertação em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- LOBUGLIO, K.F., ROGERS, S.O., WANG, J.K. Variation in ribosomal DNA among isolates of the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2331-2343, 1991.
- LUNGE, V.R., IKUTA, N., OSAKI, L.S. Uso de RFLP e RAPD na classificação e identificação de microrganismos. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.143, 1992.
- MAHUKU, G.S., HSIANG, T., YANG, L. Genetic diversity of *Microdochium nivale* isolate from turfgrass. **Micology Reaserch**, v.102, p.-559-567, 1998.
- MANKAU, R. Biological control of nematodes pests by natural enemies. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.415-440, 1980.

- MEIJER, G., MEGNEGNEAU, B. LINDERS, E.G.A. Variability form isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Micology Reaserch**, v.98, p.267-276, 1994
- MICHELMORE, R.W., HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phitopathology**, v.25, p.383-404, 1987.
- MITSUI, Y., SHARMA, R.D. Ocorrência de fungos parasitas de fitonematódeos nos solos de cerrados do distrito Federal. In.: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4, 1991, Campinas. [**Anais...**] Campinas: 1991. (Resumo 44).
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987
- NANSEN, P., GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S.A. et al. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.26, p.329-337, 1988.
- NAVES, R.L., CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.15, p.152-162, 1991.
- NEI, M., LI, W.K. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**. USA, v.76, p. 5269-5273, 1979.
- NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological Sciences**, Oxford, v.5, n.4, p.108-16, 1988.
- PERSSON, Y., ERLAND, S., JANSSON, H. Identification of nematode-trapping fungi using RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v.100, n.5, p.531-534, 1996.
- PIPE, N.D., CHANDLER, D., BAINBRIDGE, B.W., HEALE, J.B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v.99, n.4, p. 485-491, 1995.
- PRAMER, D. Nematode-trapping fungi. **Science**, Washington, v.144, p.382-388, 1964.

- ROYSE, D.J., MAY, B. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. **Mycologia**, v.74, p.93-102, 1982.
- ROUX, P., LABARERE, J. Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). **Experimental Mycology**, v.14, p.101-112, 1990.
- SHAGAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A., ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of National Academy Sciences of the USA**, v. 81, p.485-491, 1984.
- SAIKI, R.K., SXHARF, S.J., FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p.350-1354, 1985.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICIH, H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.
- SANTOS, M.A., FERRAZ, S., MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.15, p.121-134, 1991.
- SCHENCK, S., KENDRICK, W.B., PRAMER, D.A. A new nematode-trapping hyphomycete and a reevaluation of *Dactylaria* and *Arthrobotrys*. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.977-985, 1977.
- SILVA, J.F.V., CAMPOS, V.P. Fungos endoparasitos de nematóides que ocorrem no sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v.15, p.94-103, 1991.
- SOPRUNOV, F.F. **Predacious hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes**. (Ed.). Israel: Ashkhabad, 1958. 292p.
- SPECHT, C.A. DIRUSSO, C.C., NOUTNY, C.P., ULLRICH, R.C. A method for extrating high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v.119, p.158-163, 1982.
- STAZ, T.E. Genetic improvement of fungi by protoplasm fusion for biological control of plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.322-327, 1990.

- THORMANN, C.E., FERREIRA, M.E., CAMARGO, L.E.A., TIVANG, J.G., OSBORN, T.C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimate genetic relationship within and among cruciferous species. **Theoretical Applied Genetics**, v. 88, p.973-980, 1994.
- TIBAYRENC, M., NEUBAUER, K., BARNABÉ, C. GUERRINI, F., SKARECKY, D., AYALA, F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.90, p.1335-1339, 1993.
- TINKER, N.A., FORTIN, M.D., MATHER, D.E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.976-984, 1993.
- TOMMERUP, I.C. Genetics of eucalypt ectomycorrhizal fungi. In: International Symposium of Recent Topics in Genetics, Physiology and Technology of Basidiomycetes, Chiba, 1992. **Proceedings**, Chiba, Chiba University, 1992. p. 74-79
- TREVORS, J.T., van ELSAS, J.D. A review of selected methods in environmental microbial genetics. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.895-902, 1989.
- VAN der VLUGT-BERGMANS, C.J.B., BRANDWAGT, B.F., van't KLOOSTER, J.W., WAGEMAKERS, C.A.M., van KAN, J.A.L. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v.97, p.1193-1200, 1993.
- VAN GUNDY, S.D. Biological control of nematodes. In: HOY, M.A., HERZOG, D.C. **Biological control in agricultural IPM systems**. [s.l.: s.n.], 1985.
- VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycologia**, Baarn, v.26, p.61-96, 1985.
- VEENHUIS, M., NORDBRING-HERTZ, B., HARDER, W. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.51, p.385-98, 1985.
- VILGALYS, R., GONZALES, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.80, p.151-158, 1990.
- WALLER, P.J., LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **International Journal Parasitology**, Oxford, v.23, p.539-546, 1993.

- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleid Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfaud, D.H., Sninsky, J.J. White, T.J. eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 315-322, 1990.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. et al. DNA polimorphism amplified by arbitrary primers are useful as genomic markers. **Nucleid Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- ZOPF, W. Zur kenntnis der infections-krankheiten niederer thiere und pflnzen. **Nova Acta der Kaiserlichen Leopoldinischen-carolinischer der Naturforscher**, v.52, p.314-376, 1888.