

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Uso de Marcadores RAPD na Análise da Variabilidade Genética
de Linhagens de *Paecilomyces variotii***

Sérgio Alves Bezerra

Recife, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Uso de Marcadores RAPD na Análise da Variabilidade Genética
de Linhagens de *Paecilomyces variotii***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Aluno: Sérgio Alves Bezerra

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Elza Áurea de Luna Alves Lima

Co-orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Neiva Tinti de Oliveira.

RECIFE

2003

A DEUS, que me ama apesar do meu orgulho, egoísmo e vaidade. A DEUS que está sempre ao meu lado mesmo quando não o enxergo ou não o aceito.

Dedico.

Agradecimentos.

A DEUS por ser o ser mais presente em toda a minha vida. Separei até hoje pouco tempo da minha vida para dar atenção a Ele, mas, tive em toda a existência sua atenção. Perdão pelos atos descuidados e pelas brigas. É bom ser sincero com Você e saber que Você o é comigo também. Muito obrigado pelo seu amor e perdoe-me se não te amo na mesma intensidade. Apenas estou aprendendo a te amar agora. Obrigado por carregar-me todo esse tempo.

Ao meu pai, Aristóteles Bezerra Silva, e minha mãe, Maria José Alves, pela atenção e carinho empregados todos estes anos. Obrigado por tentar fazer o melhor por mim e por me ajudar da maneira que for a ser feliz. Aprendi muito nestes anos e com certeza chegou a hora da minha mudança interior. Obrigado, principalmente nos momentos finais deste trabalho. Aos meus familiares, pelo apoio, muito obrigado.

Aos amigos da espiritualidade, Miguel, Luis, Tavis, Rita, Sueli, Ceça, as crianças, Deyse, André, Biga, entre outros que sempre auxiliam aqueles que necessitam e estão sempre dispostos a consolar em nome de DEUS.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Paula e Ana Paula Duarte, Rosineide, Adnéia, Adna, Virgínia, Gladistone, Fábio, Mariele, Lina, Franciene, Bereneuza, Marlon, Lili, Auristela, Amélia, Ubiranir, Meiriane, Ana Luiza, o ilustre senhor Hugo, Luis, Senhor Nunes, Lurdinha, o pessoal da lavagem dos carros, Vânia, Ramiro, Prof(A). Silvia e Prof. Sidney, enfim.....todos do departamento de micologia que contribuíram um pouquinho para que este trabalho fosse concretizado.

Aos meus amigos de turma pelo apoio e carinho.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite, pela atenção prestada e sugestões úteis.

Ao CNPq pela ajuda e suporte financeiro em todo o período do trabalho.

À Prof(a). Neiva pela sua atenção e paciência comigo. Por ter me aceitado de forma acolhedora e por ter me orientado em momentos de dificuldades. Muito obrigado.

À Prof(a). Elza.....o que teria para falar desta mulher que me acolheu em um momento onde todos deram as costas. Em um momento onde muitos não quiseram nem me ouvir. Apenas me julgavam e não acreditavam em meu potencial. Não tenho o que falar

para a senhora....não pelo fato de não querer, mas, pelo fato que não há palavras para descrever a senhora. Nunca irei esquecer o seu carinho pela minha pessoa e toda a ajuda dada. Garanto que não desapontarei a senhora por ter acreditado em mim. E digo mais! A senhora não imagina o tijolinho que colocou no murinho da ciência. Obrigado por tudo. Se existe algo que nunca esquecerei na senhora será sua humildade e o jeito sapeca de ser. Essas foram as verdadeiras lições que aprendi no seu laboratório. Amar e ser humilde sempre. Dizem que o silêncio é a melhor resposta, então, me reservo o direito de ficar em silêncio e lhe enviar boas energias. Um beijo e um abraço do seu pupilo. Obrigado por tudo.

Lista de Figuras.

Figura.01. Colônias de <i>P. variotii</i> . (A) Linhagem 107. (B) Linhagem 1879. (C) Linhagem 2402.....	3
Figura.02. Clamidosporo de inserção terminal. Linhagem 107. 640x.....	3
Figura.03. Clamidosporo de inserção intercalar. Linhagem 107. 640x.....	4
Figura.04. Conidióforo de <i>Paecilomyces variotii</i> . (a) Fiálide. (b) Conídio. Linhagem 1879. 640x.....	4
Figura.05. Conídios elipsóides produzidos em cadeia de <i>Paecilomyces variotii</i> . Linhagem 1879. 640x.....	4
Figura.06. Quantificação do DNA de <i>Paecilomyces variotii</i> . M ₁ : marcador de peso molecular DNA fago λ (100 ng); M ₂ : marcador de peso molecular DNA fago λ (150 ng); M ₃ : marcador de peso molecular DNA fago λ (250 ng) . O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.....	29
Figura.07. Perfis de RAPD de dez linhagens de <i>Paecilomyces variotii</i> obtidos com o primer OPA-02. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.....	30
Figura.08. Perfis de RAPD de dez linhagens de <i>Paecilomyces variotii</i> obtidos com o primer OPA-08. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145;	

6) 2230;	7) 2402;	8) 2818;	9) 2966;	10)	
3097.....					31

Figura.09. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPA-18. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND

III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145;

6) 2230;	7) 2402;	8) 2818;	9) 2966;	10)	
3097.....					32

Figura.10. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPX-02. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND

III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145;

6) 2230;	7) 2402;	8) 2818;	9) 2966;	10)	
3097.....					33

Figura.11. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPX-06. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND

III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145;

6) 2230;	7) 2402;	8) 2818;	9) 2966;	10)	
3097.....					34

Figura.12. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPX-17. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND

III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145;

6) 2230;	7) 2402;	8) 2818;	9) 2966;	10)	
3097.....					35

Figura.13. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPW-11. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.....36

Figura14. Dendrograma obtido a partir dos perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* através do método UPGMA.....37

Lista de Tabelas.

Tabela 01. Registro das dez linhagens de <i>Paecilomyces variotii</i> utilizadas no trabalho.....	22
Tabela 02. Proporções dos reagentes da PCR.....	24
Tabela 03. Quantificação de DNA extraídos de dez linhagens de <i>P. variotii</i>	26
Tabela 04. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para a técnica de RAPD.....	27

Sumário

	Pág
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	IX
Resumo	XI
1- Introdução	1
2- Revisão da Literatura	3
2.1- <i>Paecilomyces variotii</i> : importância para o homem	3
2.2- RAPD	9
3- Referências Bibliográficas	12
4- Manuscrito	18
4.1- Resumo	19
4.2- Introdução	20
4.3- Materiais e Métodos	22
4.3.1- Linhagens e Cultivo	22
4.3.2- Extração do DNA	23
4.3.3- Quantificação do DNA	23
4.3.4- RAPD	24
4.4- Resultados	26
4.5- Discussão	38
4.6- Conclusão	39
4.7- Referências Bibliográficas	40
5- Anexo	46

Resumo

Paecilomyces variotii Bainier é um fungo sapróbio, isolado do solo de diversos substratos das regiões áridas e quentes, sendo um dos primeiros organismos a colonizar o solo e sua participação é observada em processos de compostagem. Atua na deterioração de vários substratos, na produção de ácidos e antibióticos, além de proteínas úteis na alimentação. Capaz de produzir doenças por ser oportunista, *P. variotii* vêm preocupando devido aos problemas que causa aos imunodeprimidos, apresentando resistência para alguns antibióticos. Pouco se conhece sobre a genética deste fungo. O emprego de marcadores moleculares constitui uma importante ferramenta no estudo da variabilidade genética de um fungo anamorfo, pois auxilia na caracterização e seleção de linhagens, permitindo a inclusão dessas em processos de melhoramento genético de espécies fúngicas. O objetivo deste trabalho foi submeter dez linhagens de *P. variotii* de regiões, décadas de preservação e substratos diferentes à técnica RAPD para análise de sua variabilidade genética.

1- Introdução.

Nas últimas décadas, o aumento de relatos sobre infecções ou contaminações causadas por *Paecilomyces variotii* Bainier, vêm causando preocupações ao homem (Uys *et al* 1963; Silver *et al.* 1971; Thompson *et al.* 1988; Shing *et al.* 1996; Aguilar *et al.* 1998). Este receio se deve a patogenicidade de *P. variotii* em indivíduos imunodeprimidos, os quais, por sua debilidade, já são acometidos por outros fungos como *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, entre outros (Lee *et al.* 2002).

As pesquisas indicam que *P. variotii* não é capaz de invadir tecidos íntegros (no homem e animais) e iniciar um processo inflamatório, necessitando de uma lesão para sua instalação e início da infecção (Naidu *et al.* 1992; Marzec *et al.* 1993). Apesar de não possuir poder invasivo, a capacidade de resistência do fungo à resposta do organismo, parece ser grande. Alguns pacientes desenvolvem um quadro clínico sintomático meses após a contaminação (Uys *et al* 1963; Silver *et al.* 1971).

Anfotericina B é o antibiótico mais utilizado contra *P. variotii*, porém, algumas linhagens apresentam respostas diferentes à anfotericina B, bem como, a outros antibióticos. As respostas *in vitro* e *in vivo* nem sempre são iguais e isto poderia estar relacionado à linhagem isolada (Aguilar *et al.* 1998). Pouco se sabe sobre a diversidade das linhagens de *P. variotii*, visto que, o ciclo parassexual e a reprodução sexuada ainda não foram detectados nesta espécie.

Nos organismos em geral, as diferenças refletem o que se chama de variabilidade genética e são principalmente causadas por mutações e recombinações (Azevedo, 1985; 1998). O número limitado de caracteres morfológicos e a influência de fatores ambientais sobre eles, tornam a discriminação morfológica de linhagens bastante restrita. Contudo, uma das formas de se avaliar esta diferença é através da genética, por meio de marcadores moleculares. Dentre estes cita-se a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que utiliza princípios da PCR (Polymerase Chain Reaction) para demonstrar a variabilidade genética entre as linhagens de uma mesma espécie. Isto é observado através da presença ou ausência de bandas de DNA detectadas através de gel de agarose (Ferreira & Grattapaglia 1996).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a variabilidade genética de dez linhagens de *P. variotii* oriundas de regiões e substratos diferentes e com tempos diferentes de estocagem, utilizando a técnica da RAPD.

2- Revisão da Literatura.

2.1- *Paecilomyces variotii*: importância para o homem.

Paecilomyces variotii foi primeiramente descrito em 1907 por Bainier. Apresenta colônia de aspecto pulverulento (Figura.01) podendo ser flocosa ou funiculosa, com coloração variando do oliva ao amarelo-castanho. Durante o desenvolvimento do ciclo biológico apresenta clamidosporos, que são considerados estruturas de resistência, de inserção terminal (Figura.02) e inserção intercalar (Figura.03). Os conidióforos (Figura.04) estão arranjados em ramos verticilados ou irregulares, comportando fiáldes (15 – 20 μm); as quais, possuem uma porção basal cilíndrica ou elipsoidal que abruptamente termina em um longo pescoço cilíndrico. Os conídios (5 – 7 x 2,5 – 3 μm) (Figura.05) são subglobosos ou elipsoidais de coloração castanho-amarela (Samson, 1974; Onions *et al.* 1981).



Figura.01. Colônias de *P. variotii*.
(A) Linhagem 107. (B) Linhagem 1879
(C) Linhagem 2402.

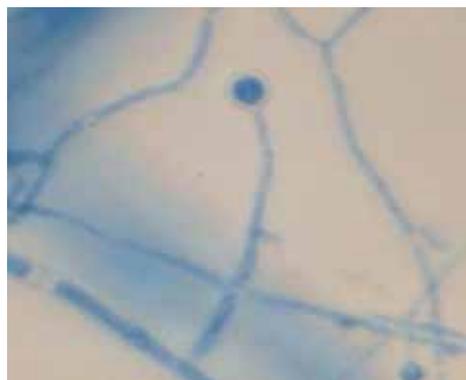


Figura.02. Clamidosporo de inserção terminal. Linhagem 107. 640x.

P. variotii é um fungo filamentosos, classificado artificialmente segundo Alexopoulos & Mims (1979) dentro da Subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales, família Moniliaceae, Gênero *Paecilomyces*, espécie *P. variotii*. O fungo que apresenta somente a fase assexuada ou corresponde a fase assexuada de um holomorfo (fungo que apresenta durante o ciclo de vida uma fase assexuada e outra

sexuada), atualmente é considerado um anamorfo (fungo que só apresenta a fase assexuada) (Kendrick, 1992).



Figura.03. Clamidospore de inserção intercalar. Linhagem 107. 640x.

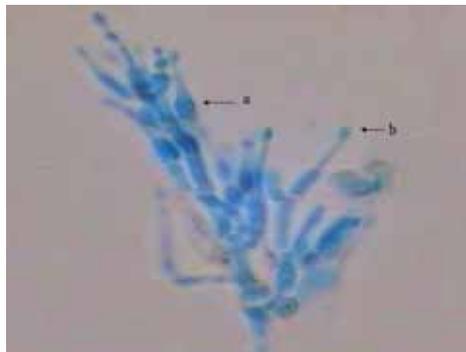


Figura.04. Conidióforo de *Paecilomyces variotii*. (a) Fiálide. (b) Conídio. Linhagem 1879. 640x.



Figura.05. Conídios elipsóides produzidos em cadeia de *Paecilomyces variotii*. Linhagem 1879. 640x.

P. variotii ocorre em regiões de clima quente e árido, sendo isolado em solos de florestas, salino, água do mar, compostagem, entre outros. Predominantemente habitante do solo, *P. variotii* pode agir na deterioração de alimentos, papel fotográfico, borracha sintética, tintas, soluções químicas, entre outros (Samson. 1974 ; Domsch *et al.* 1980).

Sua importância econômica vai desde a produção de antibióticos até o acometimento de alguns pacientes devido ao seu caráter oportunista. O antibiótico variotina

foi isolado por Takeuchi *et al.* (1959) de *P. variotii* var. *antibioticus* (5201), e tem a capacidade de inibir fungos como *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Cryptococcus* e *Blastomyces*. A ação da variotina também foi estudada em fungos fitopatogênicos, sendo os mais sensíveis os gêneros *Giberella*, *Colletotrichum* e *Ophiobolus*. Variotina não possui ação bactericida ou contra leveduras e apresenta baixa toxicidade quando testada em ratos.

Nakajima *et al.* (1991) utilizando processos fermentativos com o fungo *P. variotii* Sank 21086, identificaram um herbicida (cornexistina) com ação pós-emergente para algumas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

P. variotii ATCC 74097 = MF 5537 pode produzir as esfingofunginas E e F que constituem novas estruturas da família das esfingofunginas, capazes de inibir a enzima serinapalmitoil transferase (primeira a atuar na via de formação dos esfingolípídeos). O efeito inibitório foi demonstrado pelo não crescimento de algumas colônias fúngicas de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Ceratocystis ulmi* e *Alternaria solani*. Em bactérias este efeito não é observado devido ao fato das mesmas não apresentarem síntese de esfingolípídeos (Horn *et al.* 1992).

Ling *et al.* (1978) observaram que a produção do ácido 1-trans-2,3-epoxisuccínico e do ácido succínico por *P. variotii* NRRL 1123 está relacionada com as concentrações de cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{3+}) no meio de cultura. Este composto hidratado ao ácido meso-tartárico, pode ser empregado na produção de tintas para pintura em resina acrílica e em detergentes.

A produção de compostos orgânicos microbianos voláteis (MVOC – Microbial Volatile Organic Compounds) por *P. variotii* pode afetar a saúde humana causando letargias, dores de cabeça, irritações dos olhos, mucosas nasais e garganta. Pode ainda promover, informações sobre a natureza da comunidade microbiana do solo e servir como marcadores espécie-específicos. Porém, é certo que alguns substratos em decomposição, podem liberar compostos idênticos aos MVOC. Apesar da necessidade de maiores pesquisas, as linhagens de *P. variotii* 592.97 e 593.97 coletadas em indústrias de compostagem, foram estudadas quanto à produção desses compostos. Os resultados confirmaram a produção de éter (2-3-5-trimetilfuran), álcool {3-metil-1-butanol (isopentanol), 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol(isobutanol)}, alceno (3,5,7-trimetil-

2E,4E,6E,8E-decatetraeno, 2-metil-2,4-hexadieno) e os terpenos (α -cardieno, δ -4-careno, 2-isopropenil-2-careno-like, α -chamigreno-like, germacreno B, $+\alpha$ -longipineno, α -ionol-like, megastigma-4,6(E),8(Z)-trieno, megastigma-4,6(E),8(Z)-trieno-like, mirceno, neo-alloocimeno, β -felandreno, α -felandreno, α -terpineno e um terpeno desconhecido). Dentre os compostos encontrados, os terpenos δ -4-careno, megastigma-4,6(E),8(Z)-trieno, neo-alloocimeno e β -felandreno foram específicos para *P. variotii* quando comparados com outras espécies, podendo ser útil na identificação deste fungo (Fischer *et al.* 1999).

Udall *et al.* (1984) analisaram a tolerância e os valores nutricionais de uma proteína (Pekilo) extraída de *P. variotii*, e sugeriram que a mesma, pode ser bem tolerada e utilizada como complemento alimentar, caso sejam reduzidas as quantidades de ácidos nucléicos no processo de obtenção da proteína.

Doenças no homem e nos animais provocadas por *P. variotii* também foram relatadas (Samson. 1974 ; Domsch *et al.* 1980). A literatura cita o caso de uma mulher de 22 anos que faleceu 13 meses após correção de uma incompetência pós-reumática da válvula mitral. A paciente desenvolveu sinais de endocardite e 7 meses após a operação faleceu. Cultura de sangue (retirada antes do falecimento) constatou a presença de *P. variotii*. Apesar de ter sido tratada com o antibiótico micostatim e do retorno da sua temperatura a normalidade, as condições gerais permaneceram (pirexia, resposta inflamatória crônica e células de Langerhan gigantes) (Uys *et al.* 1963).

Um outro caso de endocardite em decorrência de infecção causada por *P. variotii*, ocorreu em um paciente submetido a uma cirurgia da válvula aórtica. A administração dos antibióticos penicilina, estreptomicina e ampicilina (esta última intravenosa) não foram suficientes para a sua eliminação. As culturas de sangue foram negativas e a identificação do fungo só foi possível devido a retirada do implante cirúrgico e dos êmbolos formados (Silver *et al.* 1971).

Colonização e obstrução do dreno do fluido cérebro-espinal por *P. variotii* foi relatado por Fagerburg *et al.* (1981) em uma mulher de 57 anos. Ao demonstrar hidrocefalia persistente, a paciente foi submetida ao tratamento com anfotericina B após a remoção do dreno. A administração de antibióticos intravenosos e dexametasona, não surtiram efeito e a paciente faleceu após o décimo quinto dia do pós-operatório.

Naidu & Singh (1992), constataram a presença de hialohifomicose causada por *P. variotii* em um homem de 25 anos. Estudos com ratos albinos, demonstraram a preferência da pele e do fígado para ratos normais e imunodeprimidos e do coração e pulmão somente para os imunodeprimidos. Testes *in vitro* revelaram que o isolado não foi inibido por anfotericina B, mas, houve bons resultados com 5-fluorocitosina, oxiconazole, amorolfina e cetoconazole. Hialohifomicose causada por *P. variotii*, também foi descrita em uma mulher de 31 anos submetida à cesariana (Athar *et al.* 1996). Exames de ultrasonografia, revelaram a presença de uma massa complexa (micélio fúngico) e fluido na pélvis e abdômen. A melhora da paciente, só foi possível após a aspiração do material encontrado.

Quatro pacientes com deficiência renal, submetidos a diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD – Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) apresentaram peritonites em decorrência de infecção causada por *P. variotii*. Peritonites também podem ser causadas por bactérias, mas, o risco à saúde do paciente é maior quando causada por fungo. Isto decorre do fato de que em situações onde a causa seja fúngica, adesões peritoneais, abscessos e peritonite esclerótica progressiva podem ser formadas. Nos quatro pacientes, foram administrados anfotericina B (intravenosa) ou cetoconazole (oral), os catéteres de Tecnkhoff foram retirados e a hemodiálise iniciada (Marzec *et al.* 1993). Peritonite também foi observada em um paciente (Rinaldi *et al.* 2000) submetido à diálise peritoneal. O tratamento ocorreu com administrações intraperitoneais e orais de fluconazole sem a remoção do cateter peritoneal.

Outras infecções causadas por *P. variotii* foram descritas por Shing *et al.* (1996) em um paciente com transplante de medula, o qual, teve o cateter venoso removido e tratamento intravenoso com anfotericina B e itraconazole oral, visto que, as medidas profiláticas com fluconazole não funcionaram. Byrd *et al.* (1992) reportaram infecção pulmonar por *P. variotii* em um paciente com diabetes mellitus. O tratamento com cetoconazole não surtiu efeito, sendo necessária a administração intravenosa de anfotericina B. Thompson *et al.* (1988) detectaram *P. variotii* como o agente etiológico de sinusite esfenoidal em um paciente. Apesar de não ocorrer com frequência, a sinusite esfenoidal, quando originada por fungo, é sujeita a cirurgia. Lam *et al.* (1999) relataram endofitalmite causada por *P. variotii*, enquanto que Dhindsa *et al.* (1995) descreveram otorreia, perfuração da membrana timpânica e granulação das células do lado esquerdo da cavidade

mastóide, causada por um agregado de massas e células livres do mesmo fungo. A terapia consistiu na administração de cetoconazole. Contaminação de implantes salinos para os seios, foram demonstrados por Young et al. (1995), em um paciente, 14 meses após a cirurgia. *P. variotii*, foi o fungo responsável pela contração capsular do implante e possivelmente sua contaminação tenha ocorrido devido a exposição do depósito salino na sala de operação. Niazi et al. (1996) também, obtiveram contaminação de implantes salinos ocasionados por *P. variotii*.

P. variotii, também foi isolado (Das et al. 2000) das vias respiratórias de um paciente após um transplante de pulmão em decorrência de fibrose cística. Lee et al. (2002) verificaram a destruição da porção inferior do osso esterno, da cartilagem xifoide e das costelas adjacentes por *P. variotii* meses após uma cirurgia de transplante de pulmão em uma mulher de 33 anos. Depois de um longo tratamento com anfotericina B, itraconazole e remoção do material necrosado, a paciente obteve melhora na saúde.

Estudos relativos à suscetibilidade de *P. variotii* a diferentes drogas foram realizados por Aguilar et al. (1998). Todos os antibióticos testados, (anfotericina B, miconazole, itraconazole, cetoconazole, fluconazole e flucitosina) demonstraram atividades contra *P. variotii*. Apesar da anfotericina B, miconazole, itraconazole e cetoconazole terem apresentado melhor atividade *in vitro* e do fato da anfotericina B ser o antibiótico mais empregado contra *P. variotii*, a terapia com fluconazole obteve resultados significativos *in vivo*.

Os relatos mostram a importância de *P. variotii* tanto como oportunista quanto produtor de antibióticos ou metabólitos de interesse para o homem.

2.2- RAPD

Os marcadores moleculares podem ser usados para a análise da variabilidade genética entre e dentro de espécies fúngicas. A técnica da RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi primeiramente descrita por Williams *et al.* (1990) e simultaneamente por Welsh & McClelland (1990) que denominaram a técnica de AP-PCR (Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction), enquanto que Caetano-Anóles *et al.* (1991) denominaram-na por DAF (DNA Amplification Fingerprinting).

RAPD consiste de uma modificação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Tal modificação consiste na utilização de um único *primer* ao invés de um par e este *primer* possui seqüência arbitrária (Ferreira & Grattapaglia (1996). Desta forma, polimorfismos podem ser detectados tanto em regiões não repetitivas quanto repetitivas do genoma em estudo (Williams *et al.* 1993). Segundo Williams *et al.* (1990), para uma ótima amplificação do DNA, faz-se necessária a construção de *primers* com 6 a 10 nucleotídeos.

A técnica tem sido empregada em várias espécies para a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações, análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, para o melhoramento genético e bancos de germoplasma, construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de grupos de interesse econômico (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Bidochka *et al.* (2001) analisaram isolados de *Metarhizium anisopliae* oriundos de Ontário (Canadá), pela técnica da RAPD e observaram a formação de dois grandes grupos. Estes grupos, mostraram possíveis correlações entre as linhagens e suas regiões geográficas. Um grupo, foi formado com isolados remanescentes de área florestal e outro com isolados de áreas cultivadas.

Após o uso da técnica da RAPD em isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* (fungo entomopatogênico, capaz de infectar a mosca branca *Bemisia argentifolli*, uma das pragas da agricultura), Azevedo *et al.* (2000) observaram variabilidade suficiente para discriminar todos os isolados. Além disto, cinco isolados não diferenciados morfológicamente, mas, isolados da mosca branca, mostraram padrões similares aos de *P. fumosoroseus*. Através da técnica, os autores distinguiram *P. fumosoroseus* de *Paecilomyces tenuipes*. Tigano-Milani *et al.* (1995b) analisando 27 isolados de *P. fumosoroseus* (15 oriundos da mosca branca

Bemisia tabaci – da agricultura), um isolado de *Paecilomyces lilacinus* e nove isolados de *Paecilomyces sp.*, observaram a formação de 3 grupos fenéticos. Não foi possível precisar a relação isolado-região geográfica e isolado-espécie hospedeira, mas, alguns isolados antes classificados como *P. fumosoroseus* apresentaram apenas 14% de similaridade com os demais. Nestas condições, isolados com dificuldades morfológicas para classificação apresentaram padrões similares a *P. fumosoroseus*.

Correlações quanto a região geográfica ou hospedeiro (nematóide) não foram encontradas entre 28 isolados de *P. lilacinus*. Apesar de todos os genótipos serem distintos e da classificação ser baseada nas características morfológicas, um isolado apresentou divergências significativas em relação aos demais (Tigano-Milani et al. 1995a).

Marcadores de RAPD também são utilizados em fungos para detectar a variabilidade genética (polimorfismo e grau de similaridade) entre genótipos diferentes de uma mesma espécie, visando a caracterização de linhagens. Neste sentido, Steffan *et al.* (1997) conseguiram identificar isolados de *Candida* coletados de pacientes e trabalhadores de hospitais de Detroit (EUA). *Candida* é o quarto organismo mais isolado de culturas sanguíneas e sua maior influência está com os pacientes imunodeprimidos. Testes padrões de identificação como o CHROMagar (reações de coloração da colônia) e o kit API 20C *Yeast Identification System*, foram realizados e comparados com os padrões genéticos (RAPD). Algumas linhagens antes identificadas pelos testes padrões não exibiram similaridades genéticas, o que poderia ser em decorrência de uma nova variedade ou espécie diferente de *Candida*.

Linhagens e espécies de *Trichoderma* foram identificadas de acordo com padrões genéticos específicos pela RAPD. *T. hamatum* 382, um efetivo agente biocontrolador de patógenos do solo utilizado em compostos já aquecidos, pôde ser distinguido dos demais *T. hamatum* coletados e *Trichoderma sp.* através de um processo seletivo utilizando 3 *primers* em 3 diferentes reações (Abbasi *et al.* 1999).

Após a utilização de 3 *primers* de RAPD, Geisen *et al.* (2001) caracterizaram 76 isolados de *Penicillium roqueforti*. Apesar dos isolados terem apresentado similaridades, grupos distintos foram observados quanto a distribuição dos isolados e a produção de metabólitos.

Análises genéticas clássicas e moleculares de *P. variotii* não são frequentemente citadas na literatura. A exceção ocorre com Irisbayev *et al.* (1998), que utilizaram as seqüências ITS (Internal Transcribed Spacer) entre os genes rRNA 18S e 5,8S de *P. variotii* e propuseram um método para isolar sondas de DNA espécie-específica. Maiores estudos relativos à genética de *P. variotii* necessitam ser realizados para o melhor entendimento da genética e biologia deste fungo. Assim sendo, os marcadores de RAPD constituem uma eficiente ferramenta, que até o momento, não foi superada por outros marcadores de DNA, para se detectar em fungos, a variabilidade entre e dentro de espécies fúngicas.

3- Referências Bibliográficas.

- Abbasi, P.A., Miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, H.J., Kim, J.** 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5421-5426.
- Aguilar, C., Pujol, I., Sala, J., Guarro, J.** 1998. Antifungal Susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 1601-1604
- Alexopoulos, C.J., & Mims.** 1979. *Introductory Mycology*. 3ed. John Wiley, New York.
- Athar, M.A., Sekhon, A.S., Megrath, J.V., Malone, R.M.** 1996. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii* in a obstetrical patient. *European Journal of Epidemiology*. 12: 33-35.
- Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Sosa-Gómez, D.R., Fungaro, M.H.P.** 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola*. 57: 729-732.
- Azevedo, J.L.** 1985. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba-SP: FEALQ, 173.
- Azevedo, J.L.** 1998. *Genética de microrganismos*. Goiânia: ed. da UFG, 478.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J., de Cross, J.N.** 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1335-1342.
- Byrd, R.P.Jr., Roy, T.M., Fields, C.L., Lynch, J.A.** 1992. *Paecilomyces variotii* in a patient with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Complications*. 6: 150-153.

- Caetano-Anóles, G., Bassan, B.J., Gresshoff, P.M.** 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. 9: 553-557.
- Das, A., McLaughlin, E.F., Ross, L.A., Monforte, H.L., Horn, M.V., Lam, G.L., Mason, W.H.** 2000. *Paecilomyces variotii* in a pediatric patient with lung transplantation. *Pediatric Transplant*. 4: 328-332.
- Dhindsa, M.K., Naidu, J., Singh, S.M., Jain, S.K.** 1995. Chronic suppurative otitis media caused by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Medical Veterinary Mycology*. 33: 59-61.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, Traute-Heide.** 1980. *Paecilomyces*. In. Compendium of soil fungi. Vol.1. London: Academic Press LTD. 525-536.
- Fagerburg, R., Suh, B., Burckley, H.R., Lorder, B., Karian, J.** 1981. Cerebrospinal fluid shunt colonization and obstruction by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Neurosurgery*. 54: 257-260.
- Ferreira, M.E., & Grattapaglia, D.** 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^a edição. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 220.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W.** 1999. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*. 39: 795-810.
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapel, W.H., Jakobsen M.** 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology*. 65: 183-191.

- Horn, W.S., Smith J.L., Bills, G.F., Raghoobar, S.L., Helms, G.L., Kurtz, M.B., Marrinan, J.A., Frommer, B.T., Thornton, R.A., Mandala, S.M.** 1992. Sphingofungins E and F: novel serinepalmitoyl transferase Inhibitors from *Paecilomyces variotii*. *The Journal of Antibiotics*. 45: 1692-1696.
- Irisbayev, B.K., Ikramov, A.A., Gazikhodjaeva, M.A., Dehkan-Hodjaeva, N.A., Abdukarimov, A.A.** 1998. Gene engineering approaches to development of species-specific probe for *Paecilomyces variotii* Bainier var. *zaaminella*. *Parasitology International*. 47: 140.
- Kendrick, B.** 1992. *The Fifty Kingdom*. 2^a ed. Ontario. Micologue Publications. 379p.
- Lam, D.S., Koehler, A.P., Fan, D.S., Cheuk, W., Leung, A.T., Ng, J.S.** 1999. Endogenous fungal endophthalmitis caused by *Paecilomyces variotii*. *Eye*. 13: 113-116.
- Lee, J., Yew, W.W., Chiu, C.S.W., Wrong, P.C., Wrong, C.F., Wrang, E.P.** 2002. Delay sternotomy wound infection due to *Paecilomyces variotii* in a lung transplant recipient. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 21: 1131-1134.
- Ling, E.M.T., Dibble, J.T., Houston, M.R., Lockwood, L.B., Elliott, L.P.** 1978. Accumulation of 1-trans-2,3-epoxysuccinic acid and succinic acid by *Paecilomyces variotii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 1213-1215.
- Marzec, A., Heron, L.G., Pritchard, R.C., Butcher, R.H., Powell, H.R., Disney, A.P., Tosolini, F.A.** 1993. *Paecilomyces variotii* in peritoneal dialysate. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2392-2395.
- Naidu, J., & Singh, S.M.** 1992. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii*: a cas report, animal pathogenicity and “in vitro” sensibility. *Antonie van Leeuwenhoek*. 62: 225-230.

- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Sato, S., Furukawa, Y., Furuya, K., Honma, T., Kadotani, J., Kozasa, M., Haneishi, T.** 1991. Cornexistin: a new fungal metabolite with herbicidal activity. *The Journal of Antibiotics* 44: 1065-1072.
- Niazi, Z.B., Salzberg, C.A., Petro, J.A.** 1996. *Paecilomyces variotii* contamination in the lumen of a saline-filled breast implant. *Plastic Reconstruction Surgery*. 98: 1323.
- Onions, A.H.S., Allsopp, D., Eggins, H.O,W.** 1981. Smith's introduction to industrial mycology. 2^a ed. London. Edward Arnold LTD. 398.
- Rinaldi, S., Fiscarelli, E., Rizeoni,G.** 2000. *Paecilomyces variotii* peritonitis in na infant on automated peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*. 14: 365-366.
- Samson, R.A.** 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomicetes. *Studies in Micology*. 6: 119.
- Steffan, P., Vazquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., Akins, R.A.** 1997. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2031-2039.
- Shing, M.M., Ip, M., Li, C.K., Chik, K.W., Yuen, P.M.** 1996. *Paecilomyces variotii* fungemia in a bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant*. 17: 281-283.
- Silver, M.D., Tuffnell, P.G., Bigelow, W,G.,** 1971. Endocarditis caused by *Pecilomyces variotii* affecting an aortic valve allograft. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 61: 278-281.
- Takeuchi, S., Yonehara, H., Umezawa, H.** 1959. Variotin, a new antifungal antibiotic, I. Preparations and properties of variotin. *Journal of Antibiotics*. 12: 195-200.

- Thompson, R.F., Bode, R.B., Rhodes, J.C., Gluckman, J.L.** 1988. *Paecilomyces variotii*. An unusual cause of isolated sphenoid sinusitis. *Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. 114: 567-569.
- Tigano-Milani, M.S., Samson, R.A., Martins, I., Sobral, B.W.S.** 1995a. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology*. 141: 239-245.
- Tigano-Milani, M.S., Honeycutt, R., Lacey, L.A., Assis, R., McClelland, M., Sobral, B.W.S.** 1995b. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*. 65: 274-282.
- Udall, J.N., Young, U.R., Scrimshaw, N.S.** 1984. The tolerance and nutritional value of two microfunal foods in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 40: 285-292.
- Uys, C.J., Don, P.A., Schrire, V., Barnard, C.N.** 1963. Endocarditis following cardiac surgery due to the fungus *Paecylomyces*. *South Africa Medicine Journal*. 37: 1276-1280.
- Welsh, J., & McClelland, M.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, L.A., Tingey, S.V.** 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** 1993. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods of Enzymology*. 218: 704-740.

Young, V.L., Herti, M.C., Murray, P.R., Lambros, V.S. 1995. *Paecilomyces variotii* contamination in the lumen of a saline-filled breast implant. *Plastic Reconstruction Surgery*. 96: 1430-1434.

4- Manuscrito.

Uso de Marcadores RAPD na Análise da Variabilidade Genética de
Linhagens de *Paecilomyces variotii*

Sérgio Alves Bezerra¹, Elza Áurea de Luna Alves Lima² & Neiva Tinti de
Oliveira².

¹Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, ²Departamento de
Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. CEP 50670-420
Fone: +55 (81) 3271-8479 / 3271-8480
s_bez@hotmail.com

Manuscrito a ser submetido à Revista Fungal Genetics and Biology
(Academic Press, San Diego. USA).

4.1- Resumo.

Paecilomyces variotii Bainier é um fungo sapróbio, isolado do solo e de vários substratos das regiões áridas e quentes. Possui importância pela produção de ácidos, antibióticos e proteínas, além de infectar alguns pacientes humanos (principalmente imunocomprometidos) devido a sua característica oportunista. Pouco conhecimento se tem sobre a genética de *P. variotii*, devido a ausência do ciclo parassexual e da reprodução sexuada. Com a utilização de metodologias simples e rápidas vêm sendo possível a análise molecular de organismos antes nunca estudados. Dentre elas, a técnica da RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) constitui uma ferramenta útil na observação da variabilidade genética de linhagens de uma mesma espécie. Neste trabalho, dez linhagens de *Paecilomyces variotii* de regiões, substratos e de períodos de estocagem diferentes foram analisados utilizando sete *primers* de RAPD. Os resultados demonstraram a formação de bandas monomórficas e de dois grupos distintos. A análise do agrupamento das linhagens mostrou um razoável nível de variabilidade entre os mesmos. Cada linhagem apresentou um perfil molecular distinto. Correlações quanto a região geográfica, substrato e períodos de estocagem não puderam ser confirmadas.

Palavras-chave: *Paecilomyces variotii*, RAPD, Polimorfismo.

4.2- Introdução.

Paecilomyces variotii Bainier é um fungo freqüentemente isolado do solo nas regiões áridas e quentes. Apresenta colônia de coloração que varia do oliva ao amarelo-castanho com aspecto pulverulento, flocoso ou funiculoso. Seus conidióforos se encontram em ramos irregulares ou verticilados e suas fiálides, apresentam uma porção basal cilíndrica ou elipsoidal que termina abruptamente em um longo pescoço cilíndrico. Os clamidosporos quando presentes podem ser de dois tipos: intercalares ou terminais; e sua presença pode conferir intensificação da cor escura à colônia. Os conídios são subglobosos ou elipsoides com coloração castanho-amarela (Samson, 1974; Onions *et al.* 1981).

Predominantemente sapróbio, *P. variotii* vem sendo isolado de solos cultivados, florestas, grama, águas poluídas e não poluídas, água do mar, solo salino, lixo urbano, madeira, substratos auto-aquecidos, entre outros. Além disto, devido ao seu poder de deterioração, foram encontrados isolados de alimentos, soluções químicas, tintas, papel fotográfico, lentes, borracha sintética, entre outros. (Domsch *et al.* 1980).

Substâncias semelhantes a penicilina além de outros metabólitos, podem ser produzidos por *P. variotii*. (Domsch *et al.* 1980). Dentre estes o ácido 1-trans-2,3-epoxisuccínico (Ling *et al.* 1978), as esfingofunginas E e F (Horn *et al.* 1992), cornexistina (Nakajima *et al.* 1991), variotina (Takeuchi *et al.* 1959) e a proteína conhecida por Pekilo que pode ser útil como complemento alimentar (Udall *et al.* 1984).

P. variotii não é um fungo patogênico, mas, relatos de infecções causadas por este fungo, tais como endocardites (Uys *et al.* 1963; Silver *et al.* 1971) vem aumentando e preocupando o homem. Podem emitir compostos orgânicos voláteis, danosos a saúde (Fischer *et al.* 1999). Podem também colonizar e obstruir drenos de líquido cérebro-espinal (Fagerburg *et al.* 1981), causar peritonites (Marzec *et al.* 1993; Rinaldi *et al.* 2000), hialohifomicoses (Naidu & Singh. 1992; Athar *et al.* 1996), infecções pulmonares (Byrd *et al.* 1992; Das *et al.* 2000; Lee *et al.* 2002), infecções após transplante de medula óssea (Shing *et al.* 1996), endofitalmite (Lam *et al.* 1999), sinusite esfenoidal (Thompson *et al.* 1988) e contaminação de implantes (Young *et al.* 1995; Niazi *et al.* 1996).

A suscetibilidade de *P. variotii* aos antibióticos (anfotericina B, miconazole, itraconazole, cetoconazole, fluconazole e flucitosina) foram estudadas por Aguilar *et al.* (1998). Apesar dos resultados “*in vitro*” terem sido satisfatórios, houve divergências quanto

aos resultados “*in vivo*”. A resistência de *P. variotii* às drogas, também foi relatada por Lee *et al.* (2002) e Marzec *et al.* (1993) e esta suscetibilidade está relacionada à variabilidade genética, encontrada nessa espécie.

Descrita por Williams *et al.* (1990), a técnica da RAPD é usada como marcador molecular para detectar a variabilidade genética de organismos de uma mesma espécie. Utilizando-se dos princípios da PCR e de primers com 6 a 10 oligonucleotídeos, a RAPD possibilitou a análise da variabilidade genética e identificação de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1996), bactérias (Grayson *et al.* 2000; Jolivet-Gougeon *et al.* 2000) e fungos (Fegan *et al.* 1993; Tigano-Milani *et al.* 1995; Steffan *et al.* 1997; Abbasi *et al.* 1999; Geisen *et al.* 2001). Esta análise será útil para *P. variotii*, pois, não há registros literários suficientes a respeito da genética clássica e molecular deste fungo.

Assim, este estudo tem a finalidade de caracterizar linhagens de *P. variotii* através da análise da variabilidade genética de 10 linhagens coletadas em diferentes regiões geográficas e substratos, e em diferentes períodos utilizando a técnica da RAPD. Isto será importante, pois, poderá diferenciar linhagens que apresentam melhor produção de antibióticos, metabólitos e poder de deterioração, ajudará na identificação de novos isolados, irá diferenciar linhagens resistentes a antibióticos e promoverá estudos quanto à virulência do fungo.

4.3- Materiais e Métodos.

4.3.1- Linhagens e Cultivo

As linhagens utilizadas foram oriundas da Micoteca (URM) do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) conforme descrito na Tabela 01. Para obtenção de massa micelial, frascos de Erlenmeyer com 100ml de meio Sabouraud (10g Peptona de carne, 40g Dextrose, pH 5,6) líquido foram inoculados com 1ml de uma suspensão (10^7 conídios/ml) e mantidos sob agitação, durante 4 dias a temperatura ambiente. Em seguida prosseguiu-se a filtração em papel de filtro e estocagem da massa micelial a -20°C .

Tabela 01. Registro das dez linhagens de *Paecilomyces variotii* utilizadas no trabalho.

N ^o de Acesso Micoteca - URM	Espécie	Substrato ou Hospedeiro	Origem Geográfica	Ano de Registro	Tipo de Conservação
107	<i>P. variotii</i>	Indeterminado	Pernambuco	1954	OM ¹
338	<i>P. variotii</i>	Indeterminado	Pernambuco	1955	OM
529	<i>P. variotii</i>	Indeterminado	Pernambuco	1955	OM
1879	<i>P. variotii</i>	Solo	Amapá	1963	OM
2145	<i>P. variotii</i>	Madeira	Maranhão	1966	OM
2230	<i>P. variotii</i>	Aves	Pernambuco	1968	OM
2402	<i>P. variotii</i>	Cupim	Pernambuco	1977	OM
2818	<i>P. variotii</i>	Bagaço de Cana	Alagoas	1985	OM
2966	<i>P. variotii</i>	Polpa de Morango	São Paulo	1988	OM
3097	<i>P. variotii</i>	Folha <i>Paulicorea</i> <i>marcgravii</i>	São Paulo	1989	OM

¹OM = Óleo Mineral

4.3.2- Extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada segundo Raeder & Broda (1985). Cerca de 1g de massa micéial das linhagens foram trituradas, separadamente, com o auxílio do nitrogênio líquido, até a formação de grãos finos, que puderam ser transferidos para tubos de microcentrífuga. A seguir, acrescentou-se 800 µl de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH. 8,0 , 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) e os tubos foram gentilmente agitados e incubados a 65 °C por 15 minutos. Em seguida, 1 volume de fenol tamponado (Gibco BRL) foi adicionado a cada tubo e após misturadas as fases, centrifugados a 12.000 r.p.m por 15 minutos. A fase aquosa foi retirada e colocada em outro microtubo e ao mesmo foi adicionado 1 volume de clorofane (1 vol. fenol : 1 vol. Clorofil). Após a mistura, seguiu-se a centrifugação como descrito anteriormente. Novamente a fase aquosa, foi transferida para um novo microtubo recebendo agora 1 volume de Clorofil (24 vol. Clorofórmio : 1 vol. Álcool Isoamílico). A mistura foi centrifugada e a fase aquosa transferida para outro microtubo, e a este volume foi adicionado 10% de NaCl (3M), mais 2 volumes de etanol absoluto resfriado a – 20 °C. Uma nova centrifugação a 12.000 r.p.m por 15 minutos foi realizada, desprezando-se o sobrenadante e adicionando-se ao precipitado 200µl de etanol 70%, seguido de nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos invertidos para secagem. O DNA foi ressuspendido em 50µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA).

4.3.3- Quantificação do DNA.

Dois microlitros de DNA extraído de cada linhagem, separadamente, foi misturado a 18µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH. 8,0 , 1 mM EDTA) e 4µl de tampão de amostra {Ficol 400 (Pharmacia), Azul de Bromofenol, H₂O deionizada}. As amostras foram depositadas em poços de gel de Agarose 0,8% {Agarose + Tampão TBE 1X pH. 8,0 (Trizma base, Ácido Bórico, EDTA 0,5 M pH 8,0)} e submetidas a eletroforese em cuba eletroforética (3 volts/cm de distância entre os eletrodos) contendo tampão TBE 1X. As concentrações do marcador molecular (DNA de fago λ - Gibco BRL) utilizadas foram 100

ng, 150 ng e 250 ng respectivamente. Após a eletroforese o gel foi transferido para uma solução de Brometo de Etídio (200ml de tampão TBE 1X + 15 µl de Brometo de Etídio) onde repousou por 30 minutos para em seguida serem visualizadas (as bandas) sobre luz ultravioleta.

4.3.4- RAPD.

Para a amplificação dos DNA extraídos, uma mistura de reagentes foi preparada com os seguintes componentes: água Milli-Q esterilizada, tampão de amplificação (Gibco BRL), dNTPs (Gibco BRL), *Primer* (Operon, Technologies), MgCl₂ (Gibco BRL), Taq DNA-polimerase (Gibco BRL) e DNA genômico de acordo com a Tabela 02.

Tabela 02. Proporções dos reagentes da PCR.

Componentes	Concentração Estoque	Volume da reação (µl)	Concentração final
Água Milli-Q esterilizada	-	10,4	q.s.p
Tampão de Amplificação	10X	2,5	1X
dNTPs	2,5 mM	2,5	0,25 mM
Primer	4 mM	2,5	0,40 mM
MgCl ₂	50 mM	1,7	3,4 mM
Taq DNA-polimerase	5 U/µl	0,4	2 unidades
DNA genômico	5 ng/µl	5,0	25 ng
Total		25 µl	

A reação de amplificação, ocorreu em termociclador (Minicycler™ MJ Research) com a seguinte programação: 92 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 92 °C por 45 segundos, 39

$^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 3 minutos a 72°C . Os produtos de amplificação (20 μl) foram misturados a 4 μl de tampão da amostra e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,4% nas mesmas condições da quantificação do DNA. O marcador molecular utilizado, foi o DNA do fago λ clivado pela enzima de restrição Hind III (Gibco BRL) e a eletroforese, bem como a visualização das bandas, ocorreu nas mesmas condições da quantificação do DNA. Após a eletroforese, o gel foi corado com Brometo de Etídio e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Para a seleção de *primers*, foi utilizada uma única linhagem e observadas as bandas de maior intensidade e definição.

Os dados obtidos, foram analisados pelo programa de microcomputador NTSYS.PC (Applied Biostatistic, Inc), o qual, através de variáveis binárias do tipo 0 (ausência de bandas) e 1 (presença de bandas), forneceram uma matriz de similaridade com a utilização do coeficiente de Jaccard (não considera a combinação de marcadores ausentes como indicador de similaridade) (Sneath & Sokal, 1973). Os dados desta matriz foram utilizados para a construção de um dendrograma pelo método UPGMA (Unweight Pair-Group Method Arithmetical Average).

4.4- Resultados.

Todas as linhagens estudadas demonstraram boas quantidades de DNA quando submetidas a extração. Conforme a Figura.06, é possível observar a integridade do DNA extraído, ou seja, não houve degradação do mesmo, durante a extração. A Tabela 03, ilustra os dados estimados da quantificação do DNA, das dez linhagens de *P. variotii*.

Tabela 03. Quantificação de DNA extraídos de dez linhagens de *P. variotii*.

Linhagem	Concentração (ng/μl)
107	150
338	200
529	225
1879	225
2145	225
2230	150
2402	150
2818	225
2966	225
3097	150

O perfil molecular de cada linhagem pôde ser observado, após a utilização dos sete *primers* selecionados (Figuras.07 a 13). Estes *primers* (Tabela 04) originaram um total de 945 bandas, sendo 121 bandas geradas pelo *primer* OPA-02; 136 pelo OPA-08; 118 pelo OPA-18; 137 pelo OPX-02; 122 pelo OPX-06; 162 pelo OPX-17 e 159 pelo OPW-11. Além das bandas polimórficas, bandas comuns a todas as linhagens, (bandas monomórficas) também foram observadas para cada *primer* utilizado neste trabalho. Estes dados serviram para a formação de uma matriz de similaridade com o coeficiente de Jaccard (Anexo) e posterior dendrograma.

Tabela 04. Seqüência dos *primers* utilizados para a técnica de RAPD.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' – 3'	Número médio de bandas polimórficas
OPA-02	TGCCGAGCTG	10,1
OPA-08	GTGACGTAGG	9,6
OPA-18	AGGTGACCGT	9,8
OPX-02	TTCCGCCACC	11,7
OPX-06	ACGCCAGAGG	11,2
OPX-17	GACACGGACC	12,2
OPW-11	CTGATGCGTG	13,9

O dendrograma construído através do método UPGMA (Figura.14) evidenciou a formação de dois grandes grupos fenéticos: grupo A e Grupo B (sendo o grupo A dividido em dois subgrupos A1 e A2 e o grupo B dividido em dois subgrupos B1 e B2), os quais, possuem similaridade de 38%. A variabilidade exibida entre as linhagens ocorreu entre 38% e 94% e média de 66%, mostrando uma razoável variabilidade genética entre as linhagens. No grupo A estão presentes as linhagens 107, 1879, 3097 e 2402. Todas, à exceção da 3097 (São Paulo), pertencem a região Norte (Amapá) e Nordeste (Pernambuco) e foram isoladas em décadas diferentes (50, 60, 70, 80). As linhagens 107 e 1870 são as mais similares geneticamente com 70% e as mais próximas quanto ao ano de isolamento e região geográfica, quando comparada com a linhagem 3097 (64%). A menor similaridade genética deste grupo, ocorreu com a linhagem 2402 (57%) isolada de cupim (Isoptera) apesar da mesma pertencer a região Nordeste (Pernambuco). As similaridades do grupo ocorreram entre 57% e 70% com média de 62%.

No grupo B estão contidas as linhagens de Pernambuco, Alagoas, Maranhão e São Paulo. A exceção da linhagem 2230 e da falta de informação a respeito das linhagens 338 e 529, todas as linhagens deste grupo, foram agrupadas de acordo com o substrato (vegetal) de coleta (75% de similaridade). As linhagens mais próximas geneticamente (94%) são a 2966 (São Paulo) e a 2818 (Alagoas), ambas obtidas de material vegetal e da mesma década

de coleta. Em contraposição, as linhagens 338 e 529 isoladas de Pernambuco no ano de 1955 possuem 75% de similaridade. A linhagem 2230, isolada de ave, comportou-se como a linhagem de maior distância (65%) genética deste grupo. A similaridade do grupo variou entre 65% e 94% e média de 79%.

Em ambos os grupos (A e B), as linhagens não estiveram dispostas de acordo com o ano de coleta. No grupo A estiveram presentes linhagens coletadas nas décadas de 50, 60, 70 e 80, enquanto que no grupo B ocorreram linhagens da década de 50, 60 e 80. A exceção pode ocorrer com as linhagens 107 e 1879 (Grupo A), 338 e 529 (Grupo B), 2818 e 2966 (Grupo B), que apresentaram relação com as décadas de estocagem (1954 e 1963, 1955 e 1955, 1985 e 1988 respectivamente).

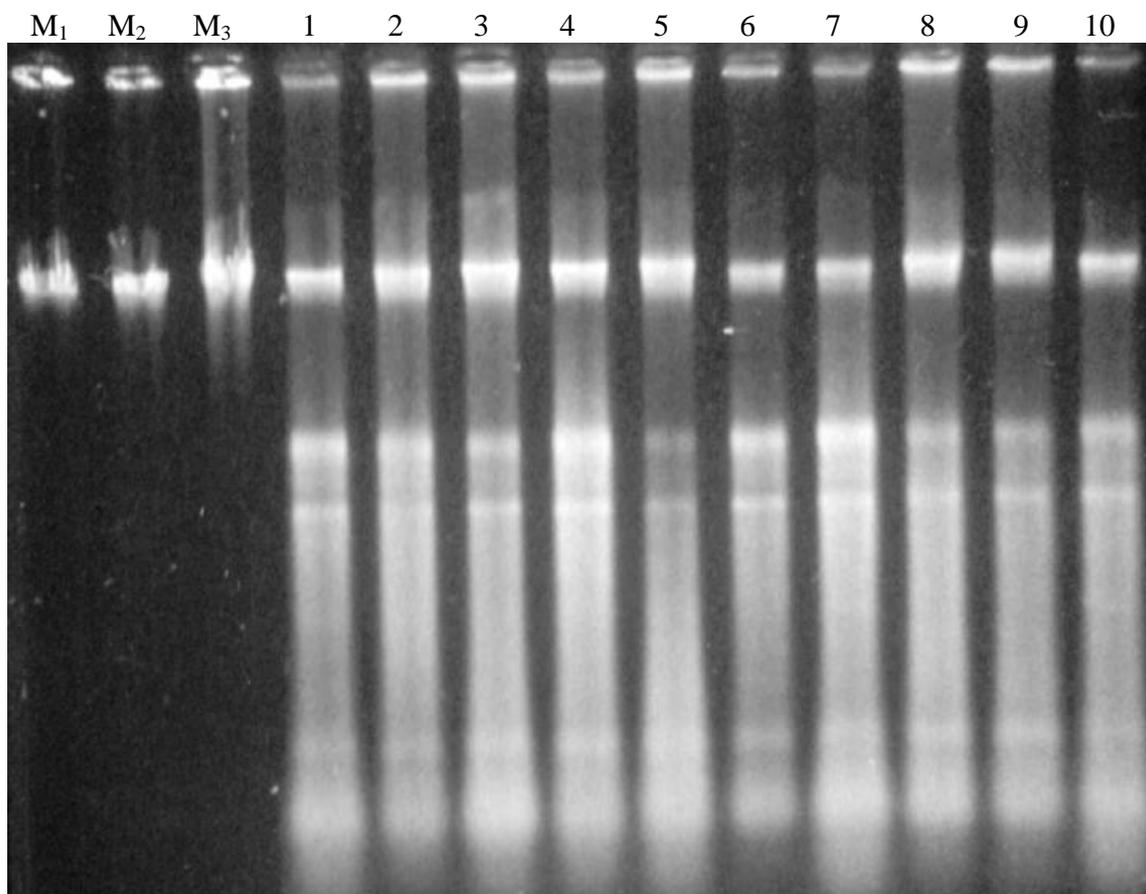


Figura.06. Quantificação do DNA de *Paecilomyces variotii*. M₁: marcador de peso molecular DNA fago λ (100 ng); M₂: marcador de peso molecular DNA fago λ (150 ng); M₃: marcador de peso molecular DNA fago λ (250 ng) . O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

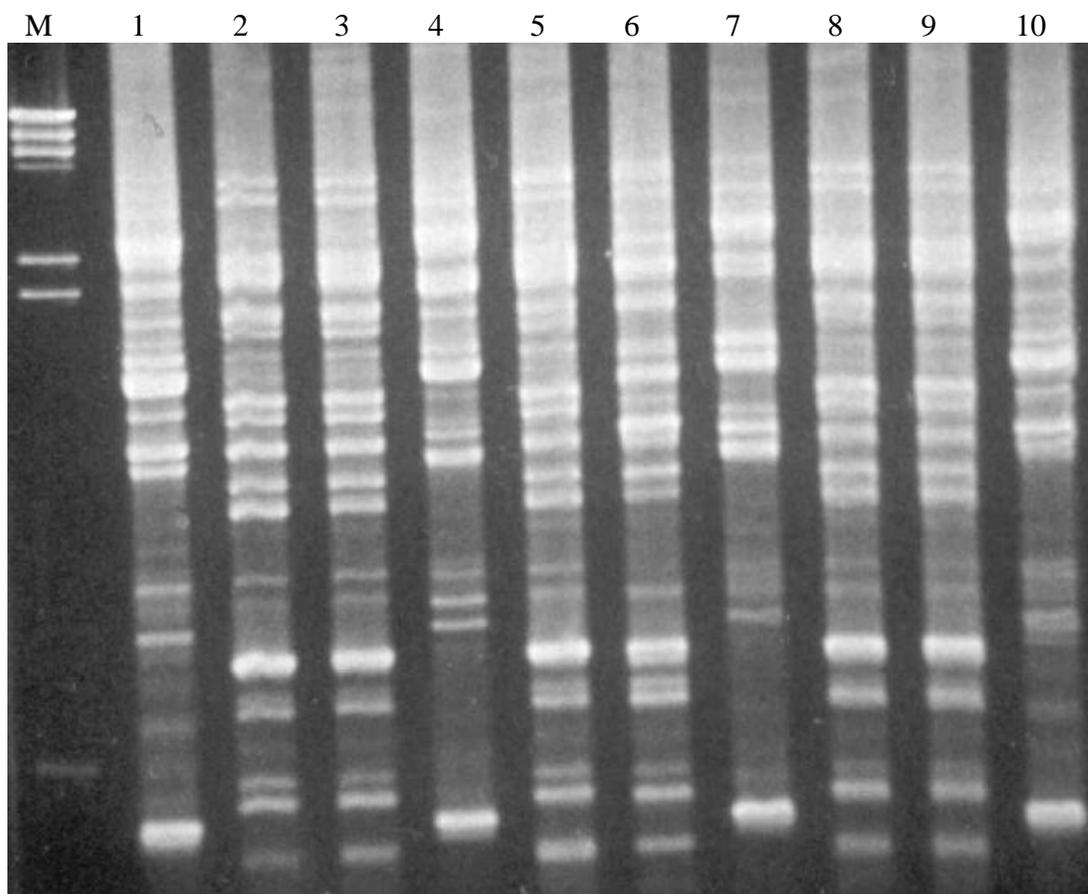


Figura.07. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o *primer* OPA-02. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

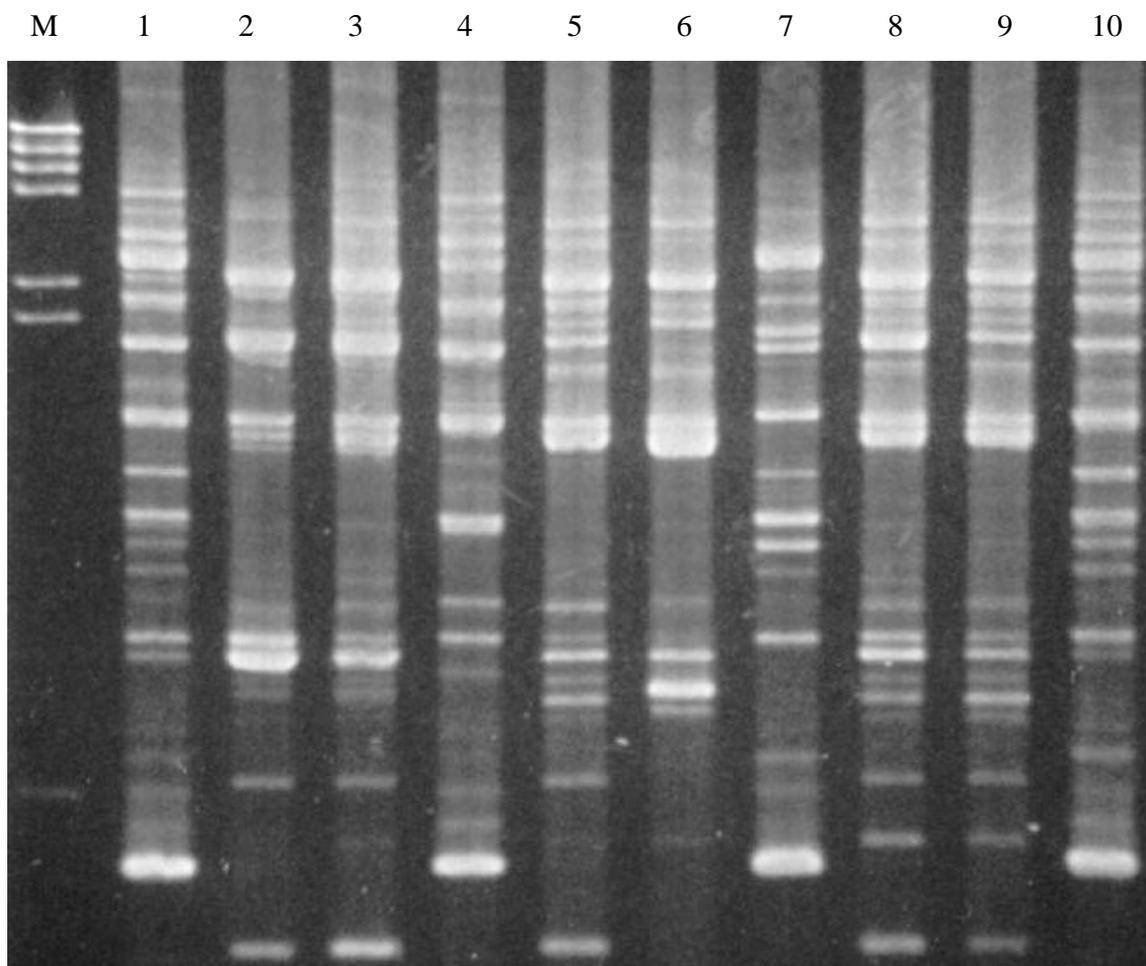


Figura.08. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o *primer* OPA-08. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

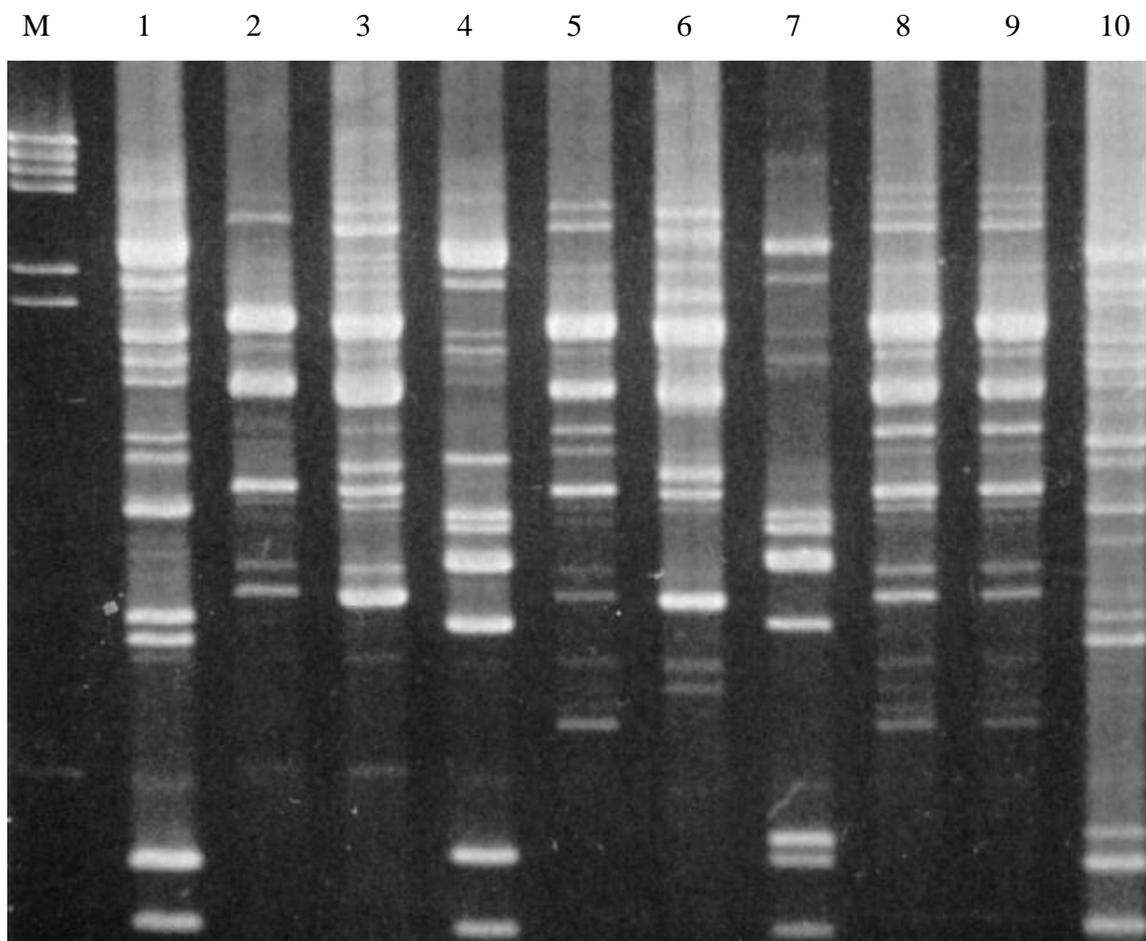


Figura.09. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o *primer* OPA-18. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

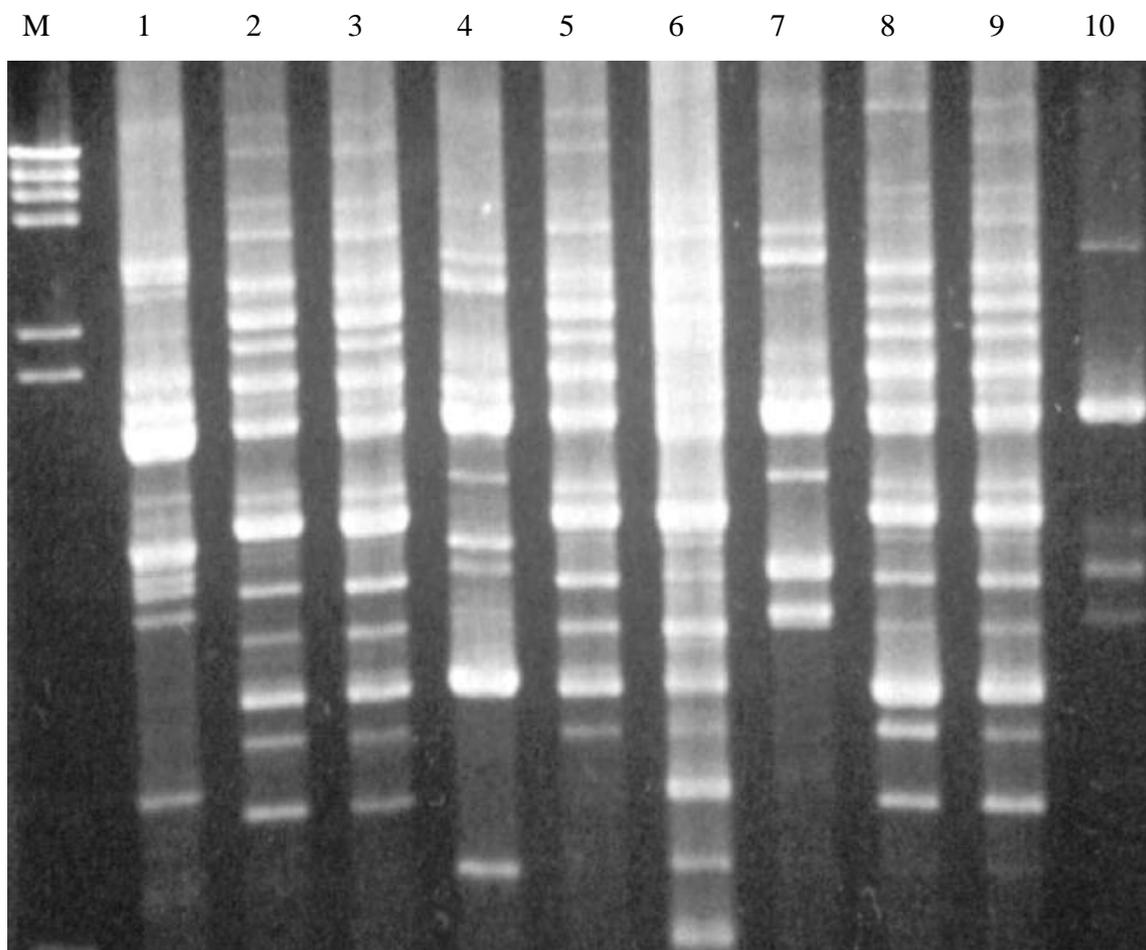


Figura.10. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o *primer* OPX-02. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

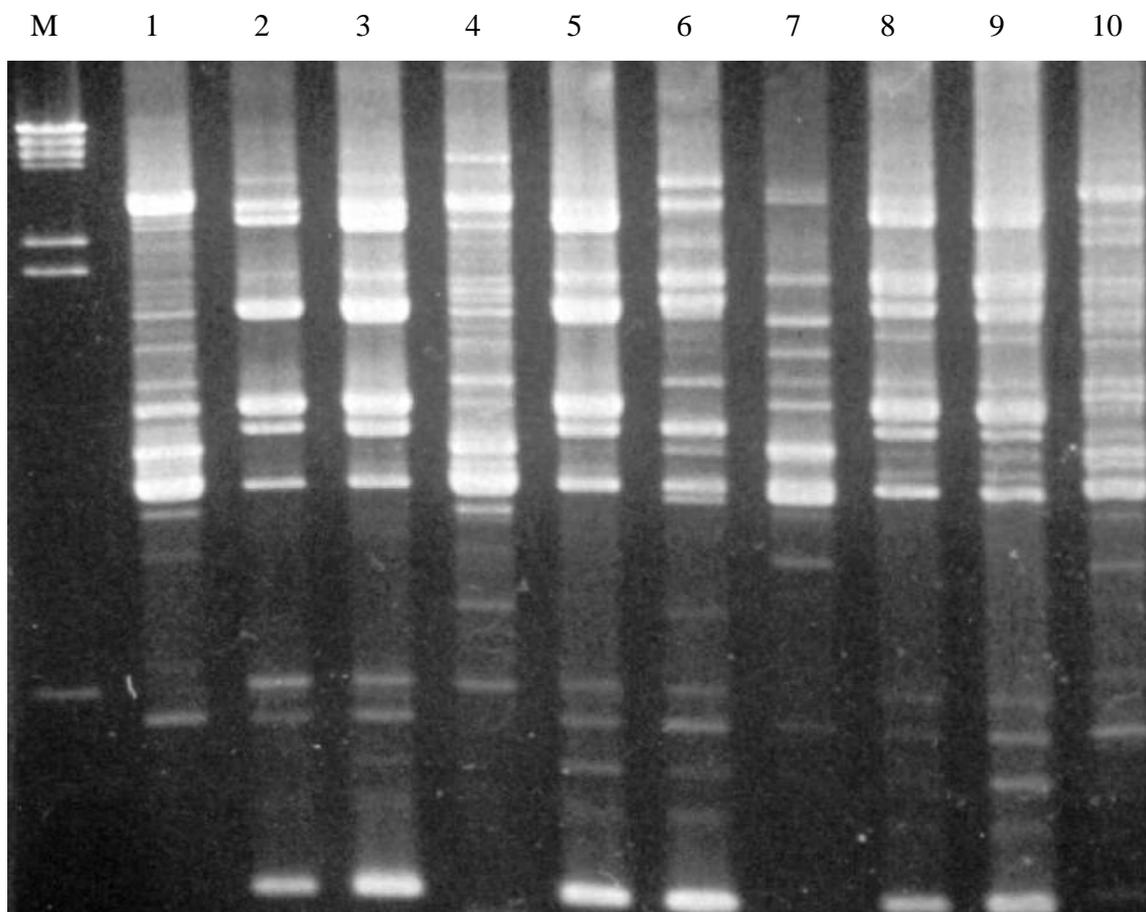


Figura.11. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPX-06. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

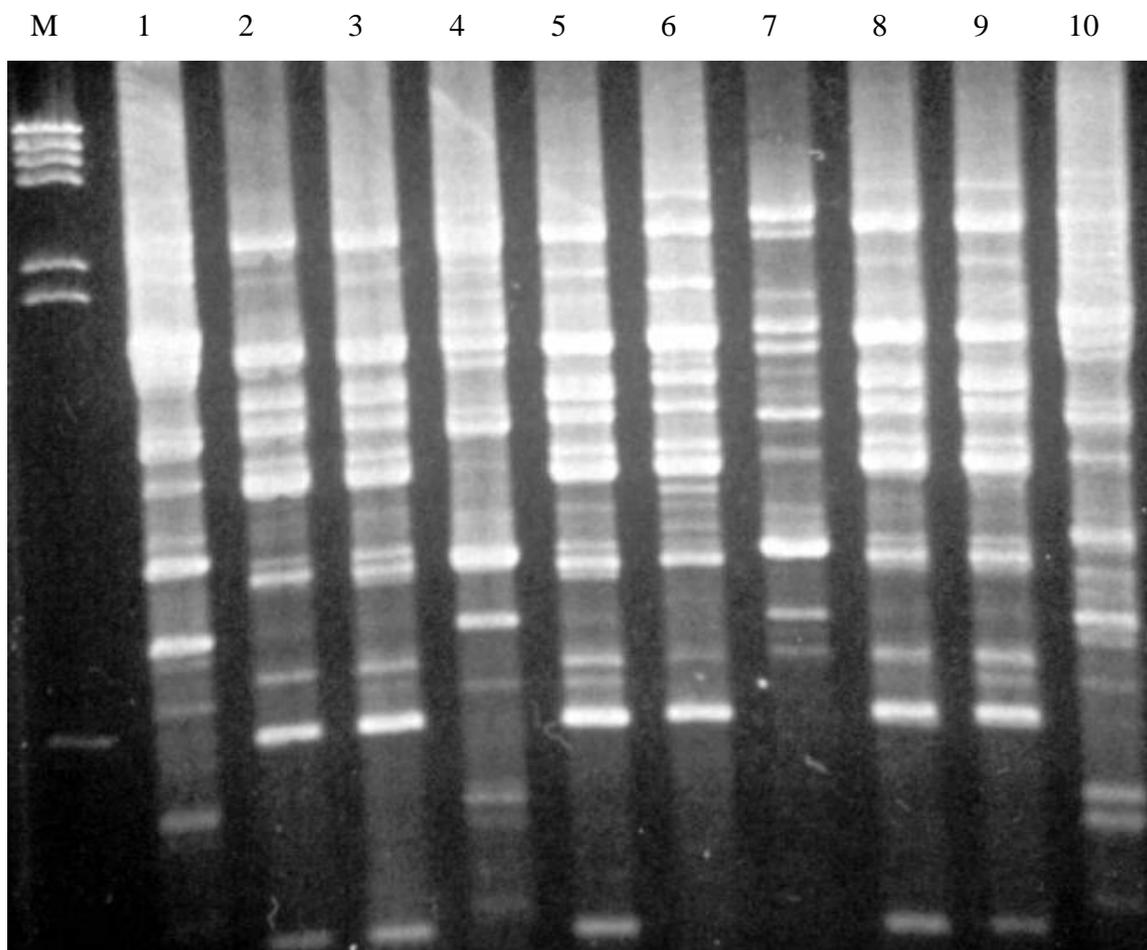


Figura.12. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o *primer* OPX-17. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

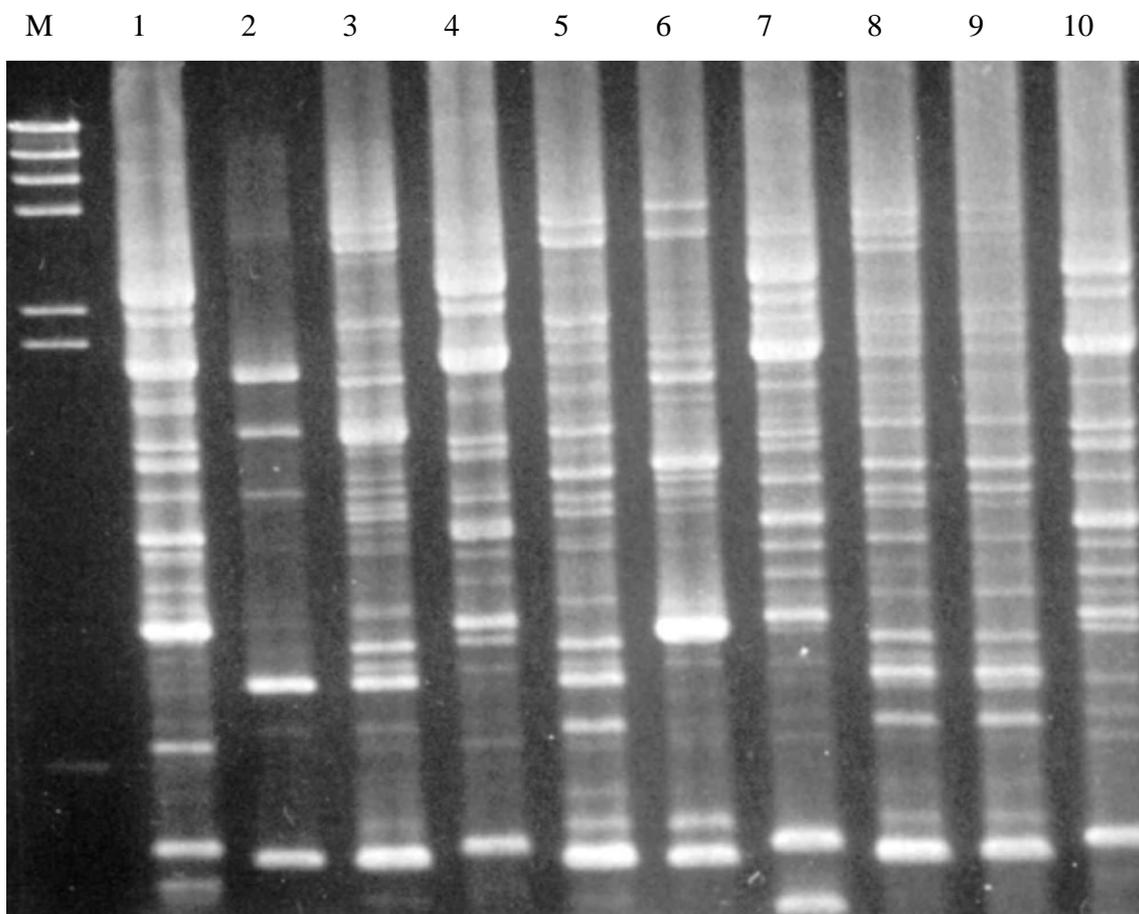


Figura.13. Perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* obtidos com o primer OPW-11. M: marcador de peso molecular DNA fago λ , clivado com a enzima HIND III. O DNA das linhagens estão nos poços 1 a 10. 1) 107; 2) 338; 3) 529; 4) 1879; 5) 2145; 6) 2230; 7) 2402; 8) 2818; 9) 2966; 10) 3097.

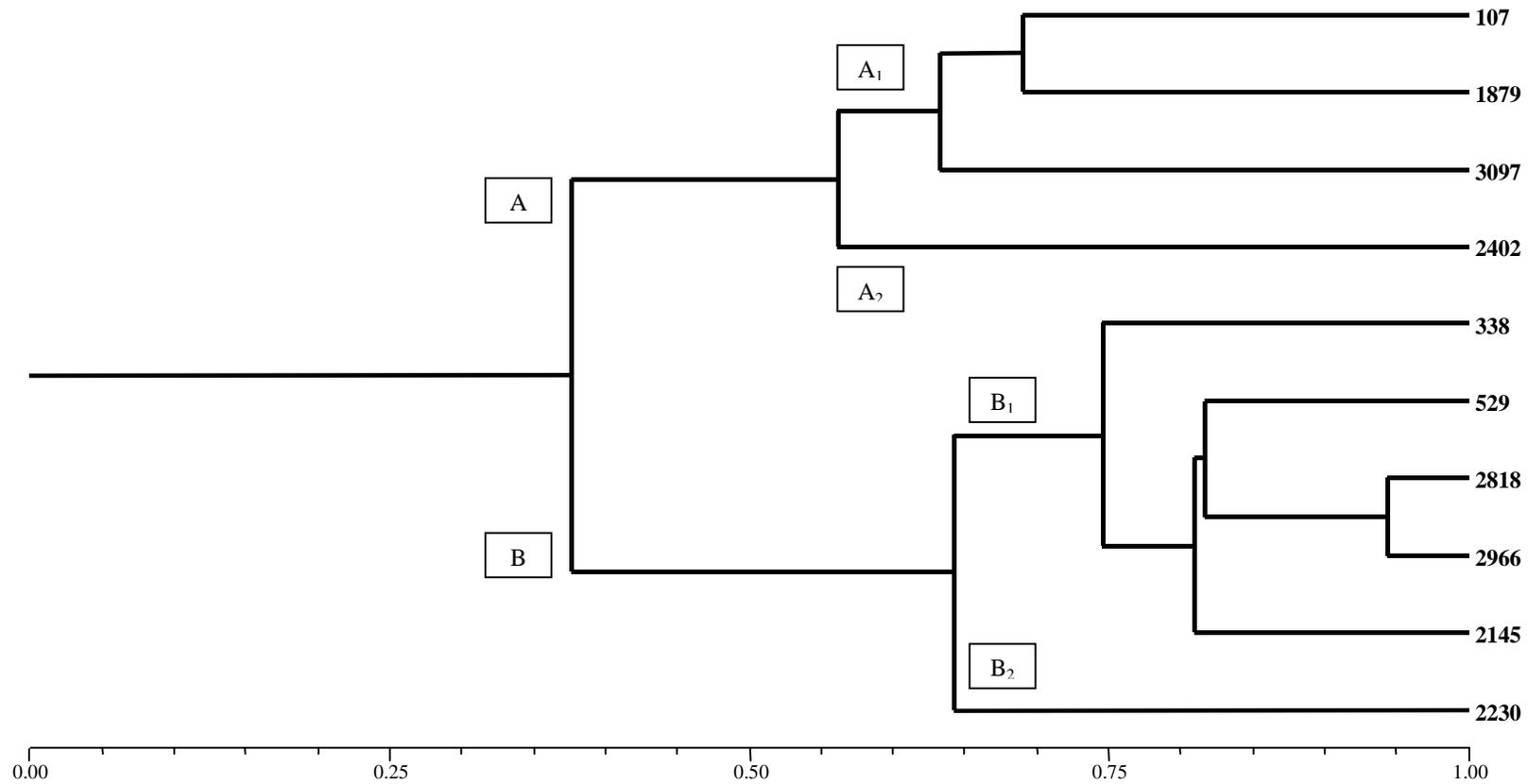


Figura 14. Dendrograma obtido a partir dos perfis de RAPD de dez linhagens de *Paecilomyces variotii* através do método UPGMA.

4.5- Discussão

Os marcadores moleculares de RAPD, possibilitaram a discriminação de todos as dez linhagens utilizadas neste estudo. Resultado semelhante também foi relatado por Azevedo *et al.* (2000) com linhagens de outra espécie, *Paecilomyces fumosoroseus*. Segundo Soll (2000), a discriminação de isolados pode ser útil para a construção de um banco de dados, que possibilitaria o armazenamento de informações sobre a variabilidade genética de determinada espécie fúngica, e auxiliaria na taxonomia de outros isolados. Comparações com variedades atípicas (Steffan *et al.* 1997) poderiam ser realizadas e dúvidas quanto a identificação morfológica de uma espécie poderiam ser resolvidas (Tigano-Milani *et al.* 1995). Pelo fato de *P. variotii* também ser um fungo oportunista, sua identificação se faz necessária devido as variações de resistência (in vitro e in vivo) encontradas em alguns isolados a certas drogas (Naidu & Singh. 1992; Marzec *et al.* 1993; Aguilar *et al.* 1998; Lee *et al.* 2002).

Apesar de já ter sido relatado para o gênero o teleomorfo *Byssochlamys* Westling (Samson, 1974) e o ciclo parassexual em *Paecilomyces fumosoroseus* (Riba & Ravelojoana, 1984), em *P. variotii* somente a reprodução assexuada ocorre. Sugere-se assim que a variabilidade encontrada em *P. variotii* tenha sido originada por mutações, que podem ser pontuais, inserções e deleções tanto na região complementar ao *primer* quanto nas regiões a serem supostamente amplificadas.

Bidochka *et al.* (2001) propuseram que o meio ambiente (e não somente o inseto hospedeiro) pode ter um papel significativo na variabilidade genética de *Metarhizium anisopliae*. Logo, efeito ambiental semelhante deve agir sobre as linhagens de *P. variotii*, em virtude da variabilidade genética encontrada neste fungo.

As bandas monomórficas originadas pelos sete *primers* utilizados na RAPD, caso seqüenciadas e comparadas com um banco de dados poderiam ajudar na identificação da espécie. Segundo Soll. (2000) bandas monomórficas poderiam ser utilizadas como componentes na formação de sondas de hibridização por facilitar a normalização de padrões universais, em computadores, para subseqüentes estudos comparativos e retrospectivos do fungo em estudo.

As bandas monomórficas e polimórficas detectadas pela técnica da RAPD originaram os grupos A e B (Figura.14) e possibilitaram uma melhor análise da variabilidade genética em *P. variotii*. Isolados não similares (338 e 529) foram encontrados na mesma região e no mesmo ano de coleta; porém, outros isolados de regiões distintas (2818 e 2966) mostraram maior similaridade. Correlações quanto à região geográfica, substrato e ano de coleta não puderam ser confirmadas, devido à presença (nos grupos) de isolados de regiões diferentes (3097, 1879, 2818), substratos diferentes, anos de coleta diferentes e a razoável variabilidade genética (grupo A e B). Fegan *et al.* (1993) estudaram *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e constataram que também não foi possível estabelecer correlação entre origem geográfica e perfil molecular. Dos seis isolados de um dos grupos fenéticos, cinco pertenciam a mesma região geográfica, enquanto que um pertencia a outra localidade. Além disto, outros isolados reunidos em um mesmo grupo fenético foram coletados de diferentes gêneros de insetos. Resultados semelhantes também foram obtidos por Tigano-Milani *et al.* (1995) em *Paecilomyces fumosoroseus*, os quais, observaram o agrupamento de diferentes isolados de vários substratos e origem geográfica em um mesmo grupo fenético.

4.6- Conclusão.

A variabilidade genética de *P. variotii* pôde ser observada pela RAPD.

A média da variabilidade genética encontrada nas linhagens estudadas ocorreu em torno de 66%. Razoável variabilidade foi encontrada, com conseqüências maiores para a classificação morfológica, que deverá ser empregada com mais afinco.

Não houve correlação entre a região geográfica, substrato e ano de coleta.

4.7- Referências Bibliográficas.

- Abbasi, P.A., Miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, H.J., Kim, J.** 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology.*, 65: 5421-5426.
- Aguilar, C., Pujol, I., Sala, J., Guarro, J.** 1998. Antifungal Susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42: 1601-1604
- Athar, M.A., Sekhon, A.S., Megrath, J.V., Malone, R.M.** 1996. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii* in a obstetrical patient. *European Journal of Epidemiology*, 12: 33-35.
- Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Sosa-Gómez, D.R., Fungaro, M.H.P.** 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola*, 57: 729-732.
- Azevedo, J.L.** 1985. Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba-SP: FEALQ, 173.
- Azevedo, J.L.** 1998. Genética de microrganismos. Goiânia: ed. da UFG, 478.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J., de Cross, J.N.** 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1335-1342.
- Byrd, R.P.Jr., Roy, T.M., Fields, C.L., Lynch, J.A.** 1992. *Paecilomyces variotii* in a patient with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Complications*, 6: 150-153.

- Das, A., McLaughlin, E.F., Ross, L.A., Monforte, H.L., Horn, M.V., Lam, G.L., Mason, W.H.** 2000. *Paecilomyces variotii* in a pediatric patient with lung transplantation. *Pediatric Transplant*, 4: 328-32.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, Traute-Heide.** 1980. *Paecilomyces*. In. Compendium of soil fungi. Vol.1. London: Academic Press LTD, 525-536.
- Fagerburg, R., Suh, B., Burckley, H.R., Lorder, B., Karian, J.** 1981. Cerebrospinal fluid shunt colonization and obstruction by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Neurosurgery*, 54: 257-260.
- Fegan, M., Manners, J.M., MacLean, D.J., Irwin, J.A.G., Samuels, K.D.Z., Holdom, D.G., Li, D.P.** 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of General Microbiology*, 139: 2075-2081.
- Ferreira, M.E., & Grattapaglia, D.** 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^a edição. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 220.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W.** 1999. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*, 39: 795-810.
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzappel, W.H., Jakobsen M.** 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 183-191.
- Grayson, T.H., Atienzar, F.A., Alexander, S.M., Cooper, L.F., Gilpin, M.** 2000. Molecular diversity of *Renibacterium salmoniarium* isolates determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 435-438.

Horn, W.S., Smith J.L., Bills, G.F., Raghoobar, S.L., Helms, G.L., Kurtz, M.B., Marrinan, J.A., Frommer, B.T., Thornton, R.A., Mandala, S.M. 1992. Sphingofungins E and F: novel serinepalmitoyl transferase Inhibitors from *Paecilomyces variotii*. *The Journal of Antibiotics*, 45: 1692-1696.

Jolivet-Gougeon, A., David-Jobert, S., Tamanai-Shacoori, Z., Ménard, C., Cormier, M. 2000. Osmotic stress-induced genetic rearrangements in *Escherichia coli* H10407 detected by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5484-5487.

Lam, D.S., Koehler, A.P., Fan, D.S., Cheuk, W., Leung, A.T., Ng, J.S. 1999. Endogenous fungal endophthalmitis caused by *Paecilomyces variotii*. *Eye*, 13: 113-116.

Lee, J., Yew, W.W., Chiu, C.S.W., Wrong, P.C., Wrong, C.F., Wrang, E.P. 2002. Delay sternotomy wound infection due to *Paecilomyces variotii* in a lung transplant recipient, 21: 1131-1134.

Ling, E.M.T., Dibble, J.T., Houston, M.R., Lockwood, L.B., Elliott, L.P. 1978. Accumulation of 1-trans-2,3-epoxysuccinic acid and succinic acid by *Paecilomyces variotii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 1213-1215.

Marzec, A., Heron, L.G., Pritchard, R.C., Butcher, R.H., Powell, H.R., Disney, A.P., Tosolini, F.A. 1993. *Paecilomyces variotii* in peritoneal dialysate. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2392-2395.

Naidu, J., & Singh, S.M. 1992. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii*: a case report, animal pathogenicity and “in vitro” sensibility. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 62: 225-230.

Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Sato, S., Furukawa, Y., Furuya, K., Honma, T., Kadotani, J., Kozasa, M., Haneishi, T. 1991. Cornexistin: a new fungal metabolite with herbicidal activity. *The Journal of Antibiotics*, 44: 1065-1072.

Niazi, Z.B., Salzberg, C.A., Petro, J.A. 1996. *Paecilomyces variotii* contamination in the lumen of a saline-filled breast implant. *Plastic Reconstruction Surgery*, 98: 1323.

Onions, A.H.S., Allsopp, D., Eggins, H.O.W. 1981. Smith's introduction to industrial mycology. 2^a ed. London. Edward Arnold LTD, 398.

Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.

Riba, G., & Ravelojoana, M. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 922-926.

Rinaldi, S., Fiscarelli, E., Rizeoni, G. 2000. *Paecilomyces variotii* peritonitis in na infant on automated peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*, 14: 365-366.

Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomicetes. *Studies in Micology*, 6: 119.

Shing, M.M., Ip, M., Li, C.K., Chik, K.W., Yuen, P.M. 1996. *Paecilomyces variotii* fungemia in a bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant*, 17: 281-283.

Silver, M.D., Tuffnell, P.G., Bigelow, W.G., 1971. Endocarditis caused by *Pecilomyces variotii* affecting an aortic valve allograft. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 61: 278-281.

Sneath, P.H. & Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco. Freeman.

Soll, D.R., 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Review*, 13: 332-370.

Steffan, P., Vazquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., Akins, R.A. 1997. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2031-2039.

Takeuchi, S., Yonehara, H., Umezawa, H. 1959. Variotin, a new antifungal antibiotic, I. Preparations and properties of variotin. *The Journal of Antibiotics*, 12: 195-200.

Thompson, R.F., Bode, R.B., Rhodes, J.C., Gluckman, J.L. 1988. *Paecilomyces variotii*. An unusual cause of isolated sphenoid sinusitis. *Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 114: 567-569.

Tigano-Milani, M.S., Honeycutt, R., Lacey, L.A., Assis, R., McClelland, M., Sobral, B.W.S. 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 274-282.

Tigano-Milani, M.S., Samson, R.A., Martins, I., Sobral, B.W.S. 1995. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology*, 141: 239-245.

Udall, J.N., Young, U.R., Scrimshaw, N.S. 1984. The tolerance and nutritional value of two microfunal foods in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 40: 285-292.

Uys, C.J., Don, P.A., Schrire, V., Barnard, C.N. 1963. Endocarditis following cardiac surgery due to the fungus *Paecylomyces*. *South Africa Medicine Journal*, 37: 1276-1280.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, L.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

Young, V.L., Herti, M.C., Murray, P.R., Lambros, V.S. 1995. *Paecilomyces variotii* contamination in the lumen of a saline-filled breast implant. *Plastic Reconstruction Surgery*, 96: 1430-1434.

Anexo.01.

Matriz de Similaridade genética construída a partir da análise dos perfis da RAPD através do coeficiente de Jaccard.

Linhagens	107	338	529	1879	2145	2230	2402	2818	2966	3097
107	1.0000000									
338	0.3507463	1.0000000								
529	0.4125874	0.7980769	1.0000000							
1879	0.6902655	0.3435115	0.4071429	1.0000000						
2145	0.4014085	0.7523810	0.8141593	0.4160584	1.0000000					
2230	0.3851852	0.5925926	0.6218487	0.4218750	0.6379310	1.0000000				
2402	0.5892857	0.2936508	0.3430657	0.5871560	0.3507463	0.3520000	1.0000000			
2818	0.4326241	0.7314815	0.8245614	0.4379562	0.8141593	0.6782609	0.3430657	1.0000000		
2966	0.4326241	0.7000000	0.8086957	0.4275362	0.7982456	0.6782609	0.3430657	0.9439252	1.0000000	
3097	0.6696429	0.2932331	0.3496503	0.5964912	0.3768116	0.3692308	0.5089286	0.3687943	0.3785714	1.0000000