



TÉCNICAS DE FILOGENIA BASEADAS EM MULTILOCUS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

LORENA GRACIELLY DE ALMEIDA SOUZA, KARLA NAYANE RIBEIRO DE OLIVEIRA, JANYNE SOARES BRAGA PIRES, DÉBORA CORREIA SANTANA, PAÔLA DA CONCEIÇÃO CAMPOS MALTA

RESUMO

A correta identificação de bactérias fitopatogênicas auxilia na tomada de decisão sobre o método de controle a ser utilizado em uma determinada cultura, além de facilitar estudos e pesquisas com microrganismos. Porém, a identificação precisa destas bactérias ainda enfrenta dificuldade nos dias atuais, crescendo assim a necessidade de desenvolvimento, aprimoração e validação de técnicas já existentes para realizar a identificação precisa. Dentre as técnicas existentes está a análise de sequências multilocus (MLSA), onde a caracterização filogenética é feita a partir de sequências de DNA de genes que codificam proteínas conservadas (genes housekeeping) envolvidas em processos celulares essenciais, que constituem o "genoma do núcleo", a utilização desta técnica se mostra relevante uma vez que técnicas já existentes e utilizadas com frequência como a do rRNA 16S, que se baseia no sequenciamento e na comparação do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), apesar de ser uma alternativa rápida na identificação é baseada no sequenciamento de um único gene do Rna, o que pode não ser tão confiável comparado a técnicas com maiores índices de comparação. Na técnica MLSA as sequências são comparadas por similaridade e as análises filogenéticas baseadas em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência, sendo mais eficiente para separação de espécies, possuindo diversos locais distribuídos pelo genoma de um organismo, e pode ser aplicada na reassociação de espécies para fins taxonômicos, onde as sequências são processadas através do método de distâncias de similaridade e esta ferramenta deve substituir a DDH, que é baseada na medida do total de similaridade genética entre isolados, pois as duas técnicas têm se mostrado com suficiente grau de congruência entre si. Dessa forma, a técnica MLSA se mostra promissora na identificação de bactérias fitopatogênicas, auxiliando assim no controle de bacterioses.

Palavras-chave: Bacteriologia, Conservação, Fitopatologia, Nucleotídeos, MLSA

1 INTRODUÇÃO

A técnica do rRNA 16S, que se baseia no sequenciamento e na comparação do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), é uma alternativa rápida na identificação de espécies procarióticas, e tem se tornado cada vez mais utilizada. Porém, classificar espécies por meio do sequenciamento de um único gene do rRNA é insatisfatória, pois quando comparada à DDH, muitas vezes apresenta baixa resolução (Gevers *et al.*, 2005).

Dessa forma, o sequenciamento do gene ribossomal 16S apresenta limitações, uma vez que as sequências não são diversificadas o suficiente para distinção entre espécies bacterianas intimamente relacionadas. Casos de comparação com identidade elevada entre a sequência do gene do rRNA não faz deixar de ser necessário a utilização de outros métodos para aprimorar a avaliação se os isolados são semelhantes os suficientes para serem classificados dentro de uma mesma espécie (Acqua, 2011).

É considerado como padrão ouro a técnica DDH, baseando na medida do total de similaridade genética entre isolados, mesmo sendo muito usada e capaz de fornecer medidas padronizadas na identificação e classificação de espécies, possui desvantagens por ser laboriosa e onerosa, por consumir elevado tempo de análise e dificuldade de padronização entre laboratórios. Este método ainda não pode ser utilizado para bactérias que não podem ser cultivadas, apresentando ainda e limitações para aquelas espécies bacterianas de crescimento lento. Os resultados algumas vezes não são reprodutíveis, dessa forma não são eficientes para identificações rápidas (Richter *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2008).

Devido as limitações das atuais técnicas, tem sido usada uma alternativa para a caracterização e classificação de espécies a análise de sequências multilocus (MLSA), onde a caracterização filogenética é feita a partir de sequências de DNA de genes que codificam proteínas conservadas (genes housekeeping) envolvidas em processos celulares essenciais, que constituem o "genoma do núcleo" (Acqua, 2011). Diante disso, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre as técnicas de análise filogenéticas para identificação de bactérias fitopatogênicas baseadas em multilocus.

2 METODOLOGIA

A técnica MLSA é baseada em análises das sequências de nucleotídeos de diversos genes, estando incluídos os genes housekeeping, que são mais conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em qualquer organismo (Almeida *et al.*, 2010). Dessa forma, estes genes se expressão em níveis constantes nos organismos.

A MLSA consiste em comparar sequências reais de DNA (Gevers *et al.*, 2005). Nesta técnica as sequências são comparadas por similaridade, além disso as análises filogenéticas são feitas baseadas em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Dessa forma, a técnica de MLSA é mais adequada para separação de espécies (Christensen *et al.*, 2007)

A técnica possui diversos locais distribuídos pelo genoma de um organismo, e pode ser aplicada na delimitação de espécies procarióticas, e também na reassociação de espécies para fins taxonômicos (Parkinson *et al.*, 2007). Nesta técnica as sequências são processadas através do método de distâncias de similaridade e esta ferramenta deve substituir a DDH, pois as duas técnicas têm se mostrado com suficiente grau de congruência entre si (Stackebrandt *et al.*, 2002). De acordo com Richter *et al.* (2006), os resultados da técnica MLSA são uma valiosa alternativa para a diferenciação de espécies, precisa e confiável, que resulta em sequências sólidas de dados, com elevado poder discriminatório e não sujeitos às variações experimentais.

Devido a tais características, os resultados da MLSA podem ser facilmente compartilhados, permitindo a comparação entre aqueles obtidos em diferentes estudos. Esta técnica é de grande importância para investigar com maiores critérios sobre a classificação de *Xanthomonas*, uma vez que oferece uma maneira simples de identificar estirpes, como membros de espécies conhecidas ou pertencentes a novas espécies (Young *et al.*, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MLSA é utilizada na filogenia e taxonomia para a espécies. Foram sequenciados sete genes housekeeping de diversas estirpes de *Borrelia burgdorferi*, bactérias gram-negativas, anaeróbicas e causadoras da doença de Lyme, e ao compararem com resultados de uma extensa coleção de dados de DDH, foi observado que sequências de similaridade produzidas pela MLSA foram estritamente correlacionadas com os dados da DDH, concluindo assim que a técnica é uma alternativa valiosa para a laboriosa técnica da DDH (Richter *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Parkinson *et al.* (2007), mostraram que ao realizar filogenia de 27 espécies do gênero *Xanthomonas* utilizando a comparação de sequências parciais do gene *gyrB*, foi observado que mesmo variando entre o comprimento de ramos entre espécies, indicando diferentes graus de distinção genética, a maior parte das espécies foram bem

diferenciadas, o que mostra a utilidade do método como uma ferramenta tanto para indicação de parentesco de interespecies, e também no auxílio rápido e com precisão para identificação de espécies.

MLSA tem sido utilizado devido a sua reprodutibilidade, poder discriminatório e confiabilidade (Marlow, 2013). Definições bem-sucedidas de grupos filogenéticos de rizóbios também foram alcançadas com o uso do MLSA (Menna *et al.*, 2009). A MLSA foi então proposta como uma ferramenta acessível para avaliar a filogenia e taxonomia de procariontes (Brett *et al.*, 1998).

Análise de MLSA tem demonstrado ótima repercussão e aceitação como ferramenta na caracterização de cepas e estudos evolutivos (Jacobsen *et al.*, 2008), sendo uma promissora ferramenta com eficiente poder discriminatório, confiabilidade, reprodutibilidade e comparabilidade interlaboratórios. Projetado com intuito de tornar-se o método padrão ouro na tipagem e caracterização das cepas de microorganismos (Schönian *et al.*, 2011).

Em estudos realizados por Acqua (2011), a técnica MLSA não foi capaz de diferenciar isolados pertencentes às mesmas espécies de bactérias patogênicas à citros, isso pode ter acontecido devido ao elevado grau de conservação dos genes housekeeping dentro das espécies. A utilização do MLSA foi grande importância para a descrição da nova espécie *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta *et al.*, 2013), foi utilizada a sequência concatenada dos genes *atpD*, *glnII* e *recA*, as relações filogenéticas de 13 estirpes de *Bradyrhizobium* foram determinadas, indicando a existência de possíveis novas espécies dentro do gênero. A árvore filogenética baseada no gene 16S RNAr dividiu as estirpes de *Bradyrhizobium* em dois grandes grupos. Através desta técnica foi possível observar que a posição taxonômica das estirpes não ficou de forma clara baseada somente no gene 16S RNAr. Há ainda muitas espécies deste gênero para serem descritas, isso pode ser devido a utilização em grande quantidade da taxonomia baseada em 16S RNAr, onde a sequência é extremamente conservada neste gênero. Dessa forma, a MLSA se mostra de grande utilidade para estudos filogenéticos, para descrição e para reclassificação de espécies de *Bradyrhizobium* (Guerrouj *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

4 CONCLUSÃO

A técnica MLSA por ser baseada em análises das sequências de nucleotídeos de diversos genes, inclusive os housekeeping, é promissora na detecção de bactérias fitopatogênicas, uma vez que estes genes são mais conservados, se expressando de forma constante, o que facilita a utilização da técnica.

REFERÊNCIAS

ACQUA, F. C. D. Análises por Sequências Multilocus de *Xanthomonas fuscans* subsp. *arauntifolli*. **Tese de Mestrado**. UNESP. 2011.

ALMEIDA, N. F.; YAN, S. C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated Microbes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 208- 215, 2010.

BRETT, P.J.; DESHAZER, D.; WOODS, D.E. (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 317-320.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H-J., FREDERIKSEN, W.C., BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the

Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Berks, v. 57, p. 166-178, 2007. DELAMUTA, J.R.M., et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, Londres, v. 3, n. 9, p.733-739, 2005. GUERROUJ, K., et al. (2013). *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 218-223.

JACOBSEN MD, BOEKHOUT T, ODDS F.C, Multilocus sequence typing confirms synonymy but highlights differences between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *FEMS Yeast Res.*, v. 8(5), p. 764-770, 2008.

MARLOW, M. A. Epidemiologia Molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Tese de Doutorado**. UFSC. 2013.

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934- 2950.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, p. 2881-2887, 2007.

RICHTER, D.; POSTIC, D.; SERTOUIR, N.; LIVEY, I.; MATUSCHKA, F.R.; BARANTON, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, n.4, p. 873-881, 2006.

SHONIAN G, Kuhls K, Maurício IL, Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138(4), p. 405-425, 2011.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P. A. D., KÄMPFER, J.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWING, J.; MAIDEN, M. C. J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Internations Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Bekers, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 366-377, 2008.

WANG, J.Y., et al. (2013). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 616-624.