

FILOGENIA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum* PELA REGIÃO ITS E PELO GENE DA COXII

CORRÊA, Bruna Ferraz¹; VALENTE, Júlia de Souza Silveira¹; BOTTON, Sônia de Avila^{2,a}; AZEVEDO, Maria Isabel de^{2,b}; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer³

¹Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas; ^{2,a}Setor de Biossegurança Med. Vet.

Preventiva/DMVP/CCR/UFSM e ^{2,b}Lab.Pesquisas Micológicas (LAPEMI)/DMIP/CCS/UFSM;

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia/UFPEL
E-mail para correspondência: brunafcorrea@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose em mamíferos. O gênero *Pythium* compreende mais de 200 espécies, a maioria saprófitas ou patógenos de plantas (COCK et al; 1987). As análises filogenéticas demonstraram que as espécies de *Pythium* estão mais relacionadas às diatomáceas e algas do que aos fungos verdadeiros (SCHURKO et al., 2003a,b). A identificação e classificação das espécies de *Pythium* são baseadas frequentemente por características morfológicas, mas complicações podem surgir devido à ausência de estruturas sexuais e falhas para induzir a zoosporogênese em cultura. Em soma, fatores ambientais, assim como temperatura, tipo de meio e idade da cultura, podem afetar características morfológicas e fisiológicas e desta forma impedir o processo de identificação do agente (HENDRIX, PAPA; 1974). Entretanto, a habilidade de distinguir *P. insidiosum* de outras espécies de *Pythium* e de outros organismos que podem causar sintomas similares no hospedeiro é crucial para o diagnóstico precoce e tratamento da doença (SCHURKO, et al; 2003b). Assim, o uso de técnicas de biologia molecular tem se tornado uma ferramenta bastante útil e segura para identificação de espécies de *Pythium* (WANG, WHITE; 1997). Estudos moleculares têm sido reportados para a identificação e filogenia de *P. insidiosum*. SCHURKO et al. (2003 a,b) analisaram a filogenia e caracterização molecular de isolados de *P. insidiosum* originários das Américas, Ásia e Austrália pela comparação das regiões que compreendem o espaço ribossomal intergênico (IGS e ITS) usando as técnicas de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e sequenciamento de DNA. Esses autores demonstraram haver variações genéticas entre os isolados de *P. insidiosum* das 3 regiões estudadas havendo a possibilidade de não serem todas da mesma espécie. Entretanto, somente um isolado de *P. insidiosum* originário do Brasil (CBS 101555-LAPEMI 118) foi analisado. KAMMARNJESADAKUL et al. (2010) estudando as relações filogenéticas, empregaram dois marcadores gênicos, a citocromo c oxidase II (COX II) e o espaço ribossomal intergênico (ITS), para analisar cepas de *P. insidiosum* oriundas de seres humanos e fontes ambientais da Tailândia. Pelo fato da grande maioria dos isolados brasileiros de *P. insidiosum* não ter sido caracterizada molecularmente e devido à possibilidade de existirem amplas variações genéticas torna-se importante analisar as características moleculares dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a análise filogenética de isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS BRASILEIROS DE *P. insidiosum* E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram analisadas do período de janeiro de 2009 a julho de 2011, 30 amostras de *P. insidiosum*, isoladas de animais infectados. As amostras foram oriundas de diferentes regiões do Brasil, sendo 20 do sul do Brasil, 9 do Mato Grosso do Sul, e uma do sudeste brasileiro. Para a extração do DNA, os isolados foram cultivados em frascos tipo Erlenmeyer com 100 ml de caldo Sabouraud e incubados a 37°C em agitação constante a 150 rpm por 5 dias. Após cultivo, as hifas foram coletadas, acondicionadas em criotubos e congeladas a -80°C até sua utilização. A extração do DNA total foi obtida a partir de 200 mg de hifas maceradas com tampão de lise e acrescidas de CTAB 10% e NaCl 5N, seguido da extração fenólica. A qualidade e concentração de DNA das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi quantificado por espectrofotometria.

2.2 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS ESPECÍFICOS DE DNA E SEQUENCIAMENTO

As reações de PCR foram feitas com os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) para ITS, e FM58 e FM66 (VILLA et al., 2006) para COX II. Todas as reações foram realizadas em um volume total de 50 µl, contendo 20 pmol de cada *primer*, 1,25 UI de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 µM de dNTPs, 1X do tampão da enzima 10X, 1.5 mM MgCl₂ e 200 ng de DNA. As amplificações foram feitas usando PTC-100 *Programmable Thermal Controller* (MJ Research) com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1min (ITS) ou 52°C/1min (COX II), 72 °C/2 min, e finalizando com 72°C/10min. O isolado *P. insidiosum* CBS 101555 foi usado como controle positivo. Os produtos da PCR foram separados em 1,2% de gel de agarose, coradas com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV. Posteriormente os produtos foram purificados com o *Kit PureLink* (Invitrogen) e sequenciadas em um sequenciador automático (MegaBACE500) no LABDROS (UFMS) com o uso do *kit DYEnamic ET* (Amersham). As sequências obtidas foram utilizadas para preparar consensos que foram alinhados com as sequências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

2.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os cromatogramas foram visualizados e montados usando o programa Gap4 (Staden, 1996). Além das 30 sequências gênicas obtidas para cada marcador dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*, foram utilizadas 9 sequências de isolados da Tailândia, uma da Costa Rica e uma do Texas (EUA). O *outgroup* consistiu de seis isolados de outras espécies de *Pythium* (*P. aphanidematum*, *P. catenulatum*, *P. deliense*, *P. graminicola*, *P. irregulare* e *P. ultimum*) e *Lagenidium giganteum*. Todas as sequências dos isolados utilizadas na análise estão disponíveis no *GenBank*. Os alinhamentos múltiplos dos dois grupos foram conduzidos usando o algoritmo Clustal W no *software* MEGA 5 (ref.).

As análises filogenéticas para ITS e COX II foram conduzidas, ambas individualmente ou em combinação, usando quatro métodos diferentes: Máxima Parcimônia (MP), *Neighbor-joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e análise Bayesiana (BA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A filogenia obtida no presente estudo, para a região ITS, demonstrou *P. insidiosum* como sendo monofilética em relação às outras espécies de *Pythium* avaliadas, evidenciando a formação de um grande Clado politômico incluindo 90% dos isolados analisados. Além de este clado ter abrangido todos os isolados brasileiros, também incluiu um isolado da Costa Rica, um isolado do Texas/EUA e cinco isolados tailandeses. SCHURKO et al. (2003b), mediram os níveis de variação intraespecífica entre os vários isolados de *P. insidiosum* baseada em análise de polimorfismo de fragmentos (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) das sequências ribossômicas intergênicas do rDNA. Porém apenas um isolado brasileiro de *P. insidiosum* (CBS 101555) foi analisado e apresentou o mesmo perfil molecular de isolados de Costa Rica e Estados Unidos. Naquele artigo os isolados americanos de *P. insidiosum* foram predominantemente reunidos em um grupo (*cluster* I). Em nossos resultados, os isolados oriundos das Américas também foram agrupados no mesmo grupo. Os isolados tailandeses por sua vez, apresentaram diferenças filogenéticas, formando grupos distintos visualizados tanto no presente trabalho quanto em estudos prévios (SCHURKO et al., 2003a; KAMMARNJESADAKUL, et al., 2010)

As análises das sequências geradas pela amplificação do gene da COX II proporcionaram maiores níveis de informação filogenética, estando de acordo com as informações obtidas por KAMMARNJESADAKUL et al. (2010). Esses autores demonstraram a formação de dois grupos constituídos somente por linhagens tailandesas e um grupo formado apenas por cepas americanas. No presente estudo foi observada a formação de três grupos distintos, os quais foram denominados de: PI-A, composto pelos isolados oriundos das Américas, PI-B e PI-C, formados pelos isolados tailandeses. Desta forma, pode-se considerar que a região COX II é a melhor opção para estudar as relações filogenéticas entre os isolados de *P. insidiosum*. Ambos os marcadores genéticos mostraram-se inteiramente congruentes com as relações filogenéticas. A única diferença encontrada entre as árvores filogenéticas obtidas para a região COX II e ITS refere-se às relações politômicas, ou seja, houve a formação de diferentes grupos, entre os isolados de *P. insidiosum*.

Pela análise molecular realizada, incluindo dois marcadores gênicos, foi possível evidenciar uma semelhança genética entre os isolados oriundos das diferentes regiões do Brasil.

4 CONCLUSÃO

- Existe uma proximidade filogenética entre os isolados de *P. insidiosum* oriundos das diferentes regiões do Brasil.
- Os isolados brasileiros de *P. insidiosum* apresentam uma baixa diversidade genética.
- A região COX II demonstrou ser a melhor opção para estudar as relações filogenéticas entre os isolados de *P. insidiosum*.

5 REFERÊNCIAS

COCK, A.W.A.M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p.344–349, 1987.

HENDRIX F.J.; PAPA K.E. Taxonomy and genetics of *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society** , v.1, p.200–207, 1974.

KAMMARNJESADAKUL, P.; PALAGA, T.; SRITUNYALUCKSANA, K. ; MENDOZA, L.; KRAJAEJUN, T.; VANITTANAKOM, N.; TONGCHUSAK, S.; DENDUANGBORIPANT, J.; CHINDAMPORN, A. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Medical Mycology**, v. 49, n.3, p. 289-295, 2010.

SCHURKO, A. M.; MENDOZA, L.; LEVESQUE, C. A.; DESAULNIERS, N. L.; COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G.R. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**, v.107, n.5, p. 537-544, 2003a.

SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G. R. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003b.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v.5, p. 233-241, 1996.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology Evolution**, v.10, n. 1, p. 512-526, 1993.

VILLA, N.O., KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. **Mycologia**, v.98, p.410–422, 2006.

WANG, P.H.; WHITE, J.G. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 51, p. 129-143, 1997.

WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.), **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, San Diego, Academic Press, p. 315-322., 1990.