

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum* PELO USO DE DOIS MARCADORES MOLECULARES

MARONEZE, Beatriz Persici¹; VALENTE, Júlia de Souza Silveira²; STO LL, Franciele Elisa²; BOTTON, Sônia de Avila³; AZEVEDO, Maria Isabel de³; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer⁴

¹ Bolsista PIBIC/CNPq - Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas-RS; ² Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS; ³ Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS; ⁴ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia- Universidade Federal de Pelotas-RS.
E-mail: danielabraye@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, uma enfermidade infecciosa de difícil tratamento que afeta, principalmente equinos e humanos. É descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo o Brasil considerado endêmico para a pitiose equina (Mendoza et al., 1996). O gênero *Pythium* agrega várias espécies saprófitas ou patógenas que utilizam ambientes aquáticos para o desenvolvimento de seu ciclo biológico (Mendoza et al., 1996). A identificação desses micro-organismos é realizada pela morfologia de suas estruturas sexuadas e assexuadas, sendo essas características determinantes para a identificação e classificação das diferentes espécies de *Pythium*. No entanto, as dificuldades em se reproduzir o ciclo sexuado *in vitro*, assim como as possíveis falhas na indução das estruturas assexuadas dificultam e complicam a identificação morfológica desses oomicetos (Schurko et al. 2003 a). Assim, o uso de técnicas de biologia molecular tem se tornado uma ferramenta bastante útil e segura na identificação de espécies de *Pythium* (Wang, White; 1997). Em *P. insidiosum* estudos moleculares utilizando o espaço ribossomal intergênico foram realizados em isolados originários das Américas, Ásia e Austrália e demonstraram haver variações genéticas entre eles (Schurko et al., 2003 a,b). Entretanto, somente um isolado originário do Brasil foi analisado nesse trabalho. Assim, pouco se sabe sobre a relação filogenética de isolados brasileiros em relação as cepas de outras regiões.

Os avanços em métodos moleculares têm permitido um estudo mais racional das relações filogenéticas dentro de vários organismos. Assim, genes que codificam proteínas metabólicas estruturais, como a citocromo oxidase II (COX II), começaram a ser usados como ferramenta em análises filogenéticas, principalmente em eucariotos. A COX II é um gene que está presente no DNA mitocondrial e acumula mutações através da evolução dos seres vivos (Palmer, 1992). O genoma nuclear possui alta taxa de complexidade e é mais conservado que o mtDNA. Em geral, as regiões ITS (espaçadores internos transcritos) do rDNA evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, o que os tornam importantes nos estudos filogenéticos (Baldwin et al., 1995).

Nas investigações filogenéticas dos oomicetos, o gene COX II tem demonstrado melhor eficiência na distinção das relações existentes entre os isolados da mesma espécie (Kammarnjesadakul et al., 2011; Villa et al., 2006). Considerando que estes genes possuem relevância para estudos de filogenia, no

presente trabalho, ambos os marcadores genéticos foram utilizados para avaliar a variabilidade genética de isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

Neste estudo foram avaliadas 30 amostras de *P. insidiosum* isoladas de equinos com pitiose, sendo uma proveniente da região sudeste, nove da região centro-oeste (MS) e 20 da região sul. Os isolados foram cultivados em 100 ml de caldo Sabouraud, incubados a 37°C em agitação constante a 150 rpm por 5 dias. A massa micelial foi separada, acondicionada em criotubos e congelada a -80°C. Posteriormente, 200mg de hifas foram maceradas com tampão de lise e acrescidas de CTAB 10% e NaCl 5N, seguida de extração fenólica. A qualidade e concentração de DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria.

2.2 AMPLIFICAÇÕES DOS SEGMENTOS ESPECÍFICOS DE DNA E SEQUENCIAMENTO

Foram feitas reações de PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) para ITS, e FM58 e FM66 (Villa et al., 2006) para COX II. Essas reações foram realizadas com 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) com o uso do *kit DYEnamic ET* (Amersham). As sequências obtidas foram utilizadas para preparar consensos que foram alinhadas 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 nove sequências de isolados da Tailândia, uma da Costa Rica e uma do Texas (US). O *outgroup* consistiu de seis isolados de outras espécies de *Pythium* (*P. aphanidermatum*, *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.

As análises filogenéticas para ITS e COX II foram conduzidas, individualmente ou em combinação, usando quatro métodos diferentes: Máxima

Parcimônia (MP), Neighbor-joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Análise Bayesiana (BA) (Swofford, 2003). As redes de haplótipos COX II foram construídas no programa Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com) usando o método *Median-joining*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise filogenética para a região ITS mostrou que *P. insidiosum* comportou-se como monofilética em relação às outras espécies de *Pythium* avaliadas, evidenciando a formação de um grande clado politômico incluindo 90% dos isolados analisados. Além deste clado ter abrangido todos os isolados brasileiros, também incluiu um isolado da Costa Rica, um isolado do Texas/US 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 (RFLP) das sequências ribossomais 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). No presente estudo, os isolados oriundos das Américas também foram agrupados no mesmo grupo. Já 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., 2011).

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. (2011). 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*. Ao verificar-se os níveis de afinidade evolutiva, os isolados de *P. insidiosum* originários das Américas demonstram baixos níveis de diversidade de nucleotídeos, e seus haplótipos COX II foram distribuídos em uma rede consistente com uma expansão recente, o que evidencia que os isolados oriundos das diferentes regiões do Brasil são geneticamente semelhantes e compartilham um único ancestral comum, possivelmente proveniente da Ásia.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem-nos inferir que os isolados brasileiros de *P. insidiosum* avaliados apresentam baixa diversidade genética e compartilham um único ancestral comum, possivelmente proveniente da Ásia. Comparando-se as

regiões estudadas, observa-se que a região COX II é a melhor opção para estudar as relações filogenéticas deste micro-organismo. Porém, estudos futuros incluindo maior número de isolados, e o sequenciamento de genes que possam apresentar uma rápida velocidade de evolução serão úteis para melhor esclarecer os indícios evolutivos de *P. insidiosum*.

5 REFERÊNCIAS

BALDWIN, B.G. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n.2, p. 247-277, 1995.

KAMMARNJESADAKUL, P. et al. 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, 2011.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

PALMER, J.D. Mitochondrial DNA in plant systematic: applications and limitations. **Molecular Systematics of Plants**. New York: Chapman and Hall, p. 36-49, 1992.

SCHURKO, A.M., et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**, v.107, n.5, p. 537-544, 2003a.

SCHURKO, A.M. et al. 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. **Mol Biotechnol**, v. 5, p.233–241. doi: 10.1007/BF02900361, 1996.

SWOFFORD, D.L. PAUP: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts, 2003.

VILLA, N.O., et al. 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. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, n.2, p.129-143. 1997.

WHITE TJ, BURNS T, LEE S ET AL. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.), PCR Protocols: **A Guide to Methods and Applications**, San Diego, Academic Press, p. 315-322., 1990.