

Análise filogenética de *Burkholderia* spp. isoladas de nódulos de leguminosas.

CLÁUDIO DE OLIVEIRA CUNHA¹, ANTÔNIO ALVES DO NASCIMENTO FILHO², SÉRGIO MIANA DE FARIA³, FÁBIO MARTINS MERCANTE⁴ & BENILDO SOUSA CAVADA⁵

RESUMO - O gênero *Burkholderia* reúne bactérias multifuncionais de grande interesse agrônômico, biotecnológico e médico. Algumas dessas bactérias são rizóbios, capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação simbiótica com leguminosas. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma análise filogenética deste gênero, a partir da comparação das sequências do gene 16S rRNA e da comparação de genomas, com ênfase nos beta-rizóbios e isolados de nódulos de leguminosas. A análise de genomas foi feita por CVTree, um método baseado em vetores de composição. Os resultados obtidos com a análise filogenética, tanto a baseada nas sequências do gene 16S rRNA, quanto a baseada nas sequências de genomas completos, reforçam a grande diversidade do gênero *Burkholderia* e apontam para um provável desdobramento deste gênero no futuro próximo. Observou-se, ainda, que os beta-rizóbios e várias espécies de *Burkholderia* de interesse agrônômico e biotecnológico, “Grupo 1”, diferem das espécies patogênicas. O conteúdo GC desse grupo varia de 61,6 a 65,0%, enquanto nas espécies patogênicas varia de 65,7 a 69,0%.

Palavras-chave: *Burkholderia*, beta-rizóbio, filogenia, 16S rRNA, genômica comparativa.

Introdução

O gênero *Burkholderia* reúne bactérias de grande interesse agrônômico, biotecnológico e médico [1]. Algumas dessas bactérias são rizóbios, capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação simbiótica com leguminosas [2]. Outras são endofíticas diazotróficas e/ou promotoras de crescimento vegetal [3], benéficas para importantes culturas, como arroz, milho e cana-de-açúcar [4]. Muitas dessas bactérias são altamente eficientes na biorremediação de solos contaminados por produtos químicos [1]. Por outro lado, algumas espécies são patógenos de vegetais, de animais e até de humanos [1]. As 17 espécies que compõem o “Complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) são extremamente oportunistas, causadoras de infecções nosocomiais. *B. mallei* e *B. pseudomallei*, respectivamente, agentes etiológicos do mormo e da melioidose, são tão virulentas que são consideradas agentes com potencial para arma biológica.

O gênero foi descrito em 1992, para alocar um grupo de bactérias patogênicas que antes estavam erroneamente classificadas como *Pseudomonas* [5].

Desde então, o número de espécies tem crescido de forma exponencial e hoje já somam 58 espécies válidas.

Desde que o gênero foi proposto, o interesse nessas bactérias só tem aumentado, resultando na descoberta e descrição de inúmeras novas espécies, muitas delas descritas a partir de isolados de origem ambiental. Nosso conhecimento atual sobre a diversidade dos membros desse gênero indica que existe uma complexidade genômica muito grande, que reflete-se na relação dessas bactérias com seus hospedeiros e no papel que desempenham nos habitats que colonizam.

Entender a evolução, as relações filogenéticas e a diversidade dessas bactérias tornou-se essencial, não só para os microbiologistas, mas para toda a sociedade, pois são bactérias que variam da “Classe de Risco 1” (baixo risco) até a “Classe de Risco 3” (elevado risco), exigindo condições de biossegurança e de manuseio diferenciados. Algumas espécies de grande interesse para a agricultura, apesar de nunca terem sido associadas com qualquer evento patogênico, sofrem resistência ao seu uso em campo por estarem taxonomicamente relacionadas às espécies patogênicas.

A comparação de sequências do gene 16S rRNA ainda é a forma mais eficiente e adequada para inferir a filogenia das bactérias do gênero *Burkholderia*; mesmo que, para algumas espécies de *Burkholderia*, como as do CBC, não seja possível identificar a espécie apenas com base na sequência do gene 16S rRNA, sendo necessária a análise de outros genes conservados, como o *recA* [6]. No entanto, ainda não estão disponíveis as sequências do gene *recA* para todas as espécies do gênero *Burkholderia* e o número de sequências desse gene no GenBank ainda é pouco representativo da diversidade do gênero. Ao contrário, o número de sequências do gene 16S rRNA no GenBank já é bastante representativo da diversidade do gênero, permitindo uma análise filogenética mais robusta. No GenBank, em 30/04/2009, a pesquisa por “16S ribosomal RNA gene” de *Burkholderia* retornou 2641 sequências, enquanto para “*recA*” a pesquisa retornou 714 sequências.

Existe uma expectativa de que, com um grande número de genomas sequenciados, os dados genômicos possam validar as árvores filogenéticas atuais, corrigindo os erros resultantes da análise filogenética de genes e estabelecendo uma nova filogenia baseada na análise de genomas. Diante da necessidade de se criar árvores filogenéticas a partir de dados genômicos,

¹ Analista em C&T do CNPq, Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). E-mail: agrobrasil@gmail.com

² Estudante de Agronomia, Bolsista ITI do CNPq, BioMol-Lab, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

³ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 47, Caixa Postal 74505, 23890-000, Seropédica, RJ.

⁴ Pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253, Caixa Postal 661, 79804-970, Dourados, MS.

⁵ Professor Adjunto, BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 907, Caixa Postal 6043, 60455-970, Fortaleza, CE.

alguns métodos foram propostos, mas, em geral, todos dependem do alinhamento de sequências. Como os genomas das bactérias divergem bastante no tamanho, assim como no número e na organização dos genes, o alinhamento de sequências não tem se mostrado uma ferramenta adequada para a análise filogenética de genomas. Para evitar o alinhamento de sequências, foi proposto um método baseado em vetores de composição (*composition vector*, CV) [7].

Este trabalho tem por objetivo fazer uma análise filogenética do gênero *Burkholderia*, a partir da comparação das sequências do gene 16S rRNA e da comparação de genomas feita por CVTree, com ênfase nos beta-rizóbios e isolados de nódulos de leguminosas.

Material e métodos

Filogenia do gênero Burkholderia inferida a partir da análise das sequências do gene 16S rRNA

As sequências do 16S rRNA de estirpes-padrão e referência de *Cupriavidus taiwanensis*, de *Ralstonia solanacearum* e de 57, das 58 espécies do gênero *Burkholderia* (só não foi possível localizar sequência de 16S rRNA para *B. dolosa*, um dos membros do CBC), foram recuperadas no GenBank, entre fevereiro e abril de 2009. O alinhamento múltiplo das sequências foi obtido com o programa ClustalW [8]. As sequências alinhadas (1313 pb) foram utilizadas para construir a árvore filogenética, usando-se o programa Mega 4.1 [9].

Análise filogenética do “Grupo 1”

No “Grupo 1” (Figura 1), estão reunidas as 27 espécies não patogênicas, que são o foco deste estudo. Utilizou-se a sequência do gene 16S rRNA da estirpe-padrão de cada uma dessas espécies para, com auxílio da ferramenta BLAST [10], localizar no GenBank, entre março e abril de 2009, outros potenciais isolados da mesma “espécie”. Fez-se uso da função “distance tree of results”, disponível no BLAST do NCBI, para visualizar os resultados na forma de árvore filogenética e identificar o ramo contendo as sequências de maior similaridade com a sequência pesquisada. As sequências recuperadas foram alinhadas e utilizadas para construir a árvore filogenética, como descrito anteriormente. Como novos clados foram formados, indicando potenciais novas espécies, utilizou-se as sequências do 16S rRNA, dos isolados dos novos grupos formados, para uma nova busca no GenBank, objetivando assim proceder como foi feito para as espécies já estabelecidas e aumentar o número de isolados desses novos grupos.

Análise filogenética de genomas completos

Utilizou-se um método baseado em vetores de composição, disponível, na internet, na forma de uma plataforma metodológica, num servidor “web” chamado de CVTree (<http://cvtree.cbi.pku.edu.cn/>), que disponibiliza o banco de dados de genomas integrado aos softwares, para análise desses genomas e para construção da árvore filogenética [7].

Resultados e Discussão

Filogenia do gênero Burkholderia inferida a partir da análise das sequências do gene 16S rRNA

A análise da árvore filogenética obtida com as sequências do 16S rRNA das estirpes-padrão e referência (Figura 1) revela cinco clados muito concisos. Dois grandes clados reúnem muitas espécies; o “Grupo 1” reúne 27 espécies não patogênicas e o “Grupo 5” reúne 24 espécies patogênicas. Três pequenos clados fazem a transição entre os dois grandes.

No “Grupo 1”, apenas *B. fugorum* foi isolada de seres humanos e de animais; no entanto, esses isolamentos representam casos isolados, esta espécie é raramente isolada de portadores de fibrose cística (FC) e nunca foi identificada causando infecções hospitalares, apesar de ser uma das espécies de *Burkholderia* mais dispersas pelo ambiente, colonizando desde sistemas de ventilação até nódulos radiculares de leguminosas. No “Grupo 1” estão concentrados os beta-rizóbios, as espécies diazotróficas associativas e, principalmente, os isolados de grande interesse biotecnológico nas áreas de biorremediação e biodegradação.

No grande “Grupo 5” estão reunidas 24 espécies de *Burkholderia* que são patógenos de plantas e de animais. Dentro desse grande grupo, estão estabelecidos três clados bem concisos.

O “Grupo 5.1” reúne três patógenos vegetais que, ocasionalmente, podem infectar portadores de FC e ocasionar infecções hospitalares: *B. gladioli*, *B. glumae* e *B. plantarii*. *B. glumae* e *B. plantarii* são patógenos de arroz, sendo *B. glumae* o mais importante patógeno do arroz no Japão, na Coreia e em Taiwan. *B. gladioli* foi identificada como patógeno das plantas de alho, cebola, arroz, orquídea, gladiolo, lisianthus e íris. Em humanos, *B. gladioli* é um patógeno oportunista causador de infecções hospitalares; é um patógeno de grande risco para pacientes portadores de FC, causador de severa infecção pulmonar; também é encontrado colonizando as vias respiratórias de portadores da doença granulomatosa.

No “Grupo 5.2” estão reunidas *B. mallei*, *B. pseudomallei* e *B. thailandensis*. Bem próximo deste grupo, encontra-se *B. oklahomensis*. *B. mallei*, o agente causador do mormo, é um parasita obrigatório, não resistindo no meio ambiente por períodos superiores a seis semanas. *B. pseudomallei*, filogeneticamente muito próxima de *B. mallei*, é uma bactéria saprófita do solo, que, ocasionalmente, infecta, de forma muito severa, seres humanos e outros animais. *B. thailandensis* e *B. oklahomensis* são duas espécies bem próximas às anteriores, sendo que a primeira é uma bactéria saprófita do solo, muito pouco infectiva em animais, enquanto a segunda é tão ou mais virulenta que *B. pseudomallei* em humanos.

O “Grupo 5.3” reúne as 16 espécies do CBC (seriam 17 espécies, mas não foi localizada nenhuma sequência do gene 16S rRNA para *B. dolosa*), bactérias saprófitas de solo, que, apesar da grande variabilidade genética, formam um grupo muito conciso dentro do gênero, cuja principal característica é a grande capacidade de infectar portadores de FC e de desencadear infecções hospitalares.

Embora a análise filogenética do gene 16S rRNA tenha permitido a distribuição das espécies em clados bem consolidados, observa-se que dentro dos grandes clados “Grupo 1” e “Grupo 5” existe uma dificuldade para definir a ramificação hierárquica interna, isto é, as relações filogenéticas dentro de cada grupo não são bem definidas, o que, segundo Tayeb *et al.* [6], pode ser consequência de uma rápida radiação evolucionária dentro de um curto período de tempo.

O Clado de *Burkholderias* Não-Patogênicas

A comparação de um maior número de sequências permitiu obter uma árvore filogenética (Figura 2A) mais robusta e informativa que a anterior, apesar de ambas as árvores apresentarem topologias bem parecidas. Na Figura 1 as espécies *B. sartisoli* e *B. phenazinium* estavam unidas dentro do grande “Grupo 1”. Na Figura 2A essas duas espécies continuam unidas, mas separadas do “Grupo 1”. Esta nova topologia é mais coerente com a grande maioria dos estudos filogenéticos do gênero.

Comprovadamente, por meio de estudos mais detalhados que o mero isolamento da bactéria, os beta-rizóbios estão presentes nas espécies *B. caribensis*, *B. mimosarum*, *B. nodosa*, *B. phenoliruptrix*, *B. phymatum*, *B. sabiae*, *B. tuberum* e “*Burkholderia* sp. A”. Além dessas espécies, isolados de nódulos de leguminosas, ainda não comprovados como beta-rizóbios, estão presentes nas espécies *B. caledonica*, *B. fungorum*, *B. graminis*, *B. hospita*, *B. phenazinium*, *B. terrae*, *B. terricola*, *B. xenovorans*, “*Burkholderia* sp. B”, “*Burkholderia* sp. C”, “*Burkholderia* sp. D” e “*Burkholderia* sp. E”.

As espécies *B. kururiensis*, *B. silvatlantica*, *B. tropica* e *B. unamae* são predominantemente diazotróficas endofíticas, todas nos “Grupos 1.1 e 1.2”. Também nesses grupos, as espécies *B. mimosarum*, *B. nodosa*, *B. tuberum*, “*Burkholderia* sp. A” e “*Burkholderia* sp. B” são constituídas, predominantemente, por isolados de nódulos de leguminosas.

As espécies *B. phymatum*, *B. sabiae*, “*Burkholderia* sp. C” e “*Burkholderia* sp. D”, todas no “Grupo 1.3”, também são constituídas, predominantemente, por isolados de nódulos. No “Grupo 1.4”, os beta-rizóbios estão concentrados na espécie *B. phenoliruptrix*, mas não são predominantes, pois dessa espécie também fazem parte vários isolados de solo.

Análise filogenética de genomas completos

Apenas três genomas de espécies do “Grupo 1” estavam disponíveis durante a elaboração deste trabalho, mesmo assim, a árvore obtida (Figura 2B) confirma a topologia das árvores anteriores, com essas espécies formando um clado distinto dos clados formados pelas espécies patogênicas.

Conclusões

As análises filogenéticas aqui apresentadas, tanto a baseada nas sequências do gene 16S rRNA, quanto a baseada nas sequências de genomas completos, reforçam a grande diversidade do gênero *Burkholderia* e apontam para uma provável divisão deste gênero no

futuro próximo. Os beta-rizóbios e várias espécies de *Burkholderia* de interesse agrônomico e biotecnológico, aqui chamados de “Grupo 1”, diferem das espécies patogênicas. O conteúdo GC desse grupo varia de 61,6 a 65,0%, enquanto nas espécies patogênicas varia de 65,7 a 69,0%.

Referências

- [1] COENYE, T. & VANDAMME, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5: 719–729.
- [2] CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAUJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P. & JAMES, E.K. 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7461–7471.
- [3] CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. & MARTÍNEZ-AGUILAR, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5308–5319.
- [4] PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M. & CABALLERO-MELLADO, J. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3103–3110.
- [5] YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T. & ARAKAWA, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 36: 1251–1275.
- [6] TAYEB, L.A.; LEFEVRE, M.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S. & GRIMONT, P.A. 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159: 169–177.
- [7] QI, J.; LUO, H. & HAO, B.L. 2004. CVTree: A phylogenetic tree reconstruction tool based on whole genomes. *Nucleic Acids Research*, 32: W45–W47.
- [8] HIGGINS, D. & SHARP, P. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73: 237–244.
- [9] TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596–1599.
- [10] ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. 1997. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 25: 3389–3402.
- [11] SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.
- [12] TAMURA, K. & KUMAR, S. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1727–1736.

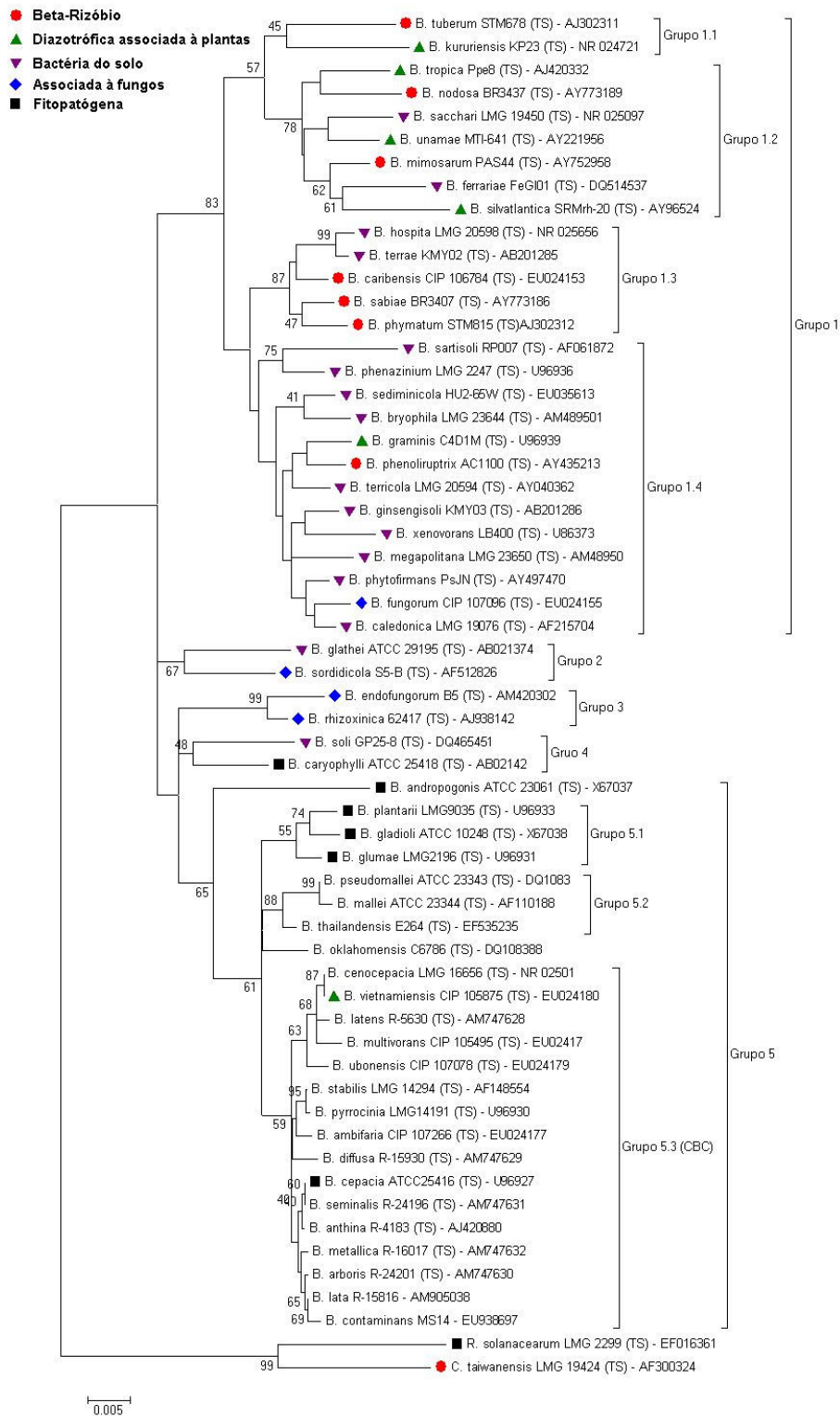


Figura 1. Relações filogenéticas entre 57 estirpes-padrão e -referência de espécies do gênero *Burkholderia* (*B.*) e duas espécies dos gêneros relacionados *Ralstonia* (*R.*) e *Cupriavidus* (*C.*). As sequências de 16S rDNA foram utilizadas para inferir a árvore filogenética, utilizando-se o método de “Neighbor-Joining” [11]. Os valores de “Bootstrap”, obtidos com 50.000 réplicas, quando acima de 40%, estão indicados. Os ramos da árvore estão em escala e representam as distâncias evolucionárias entre as sequências, calculadas por meio do método de “Maximum Composite Likelihood”, expressas na forma de % de dissimilaridade entre as sequências [12]; a barra representa cinco substituições para cada 1.000 nucleotídeos. Posições sem dados ou com “gaps” foram removidas antes da análise. Foram analisadas 1279 posições válidas. Toda a análise filogenética foi feita com auxílio do programa Mega 4.1 [9].

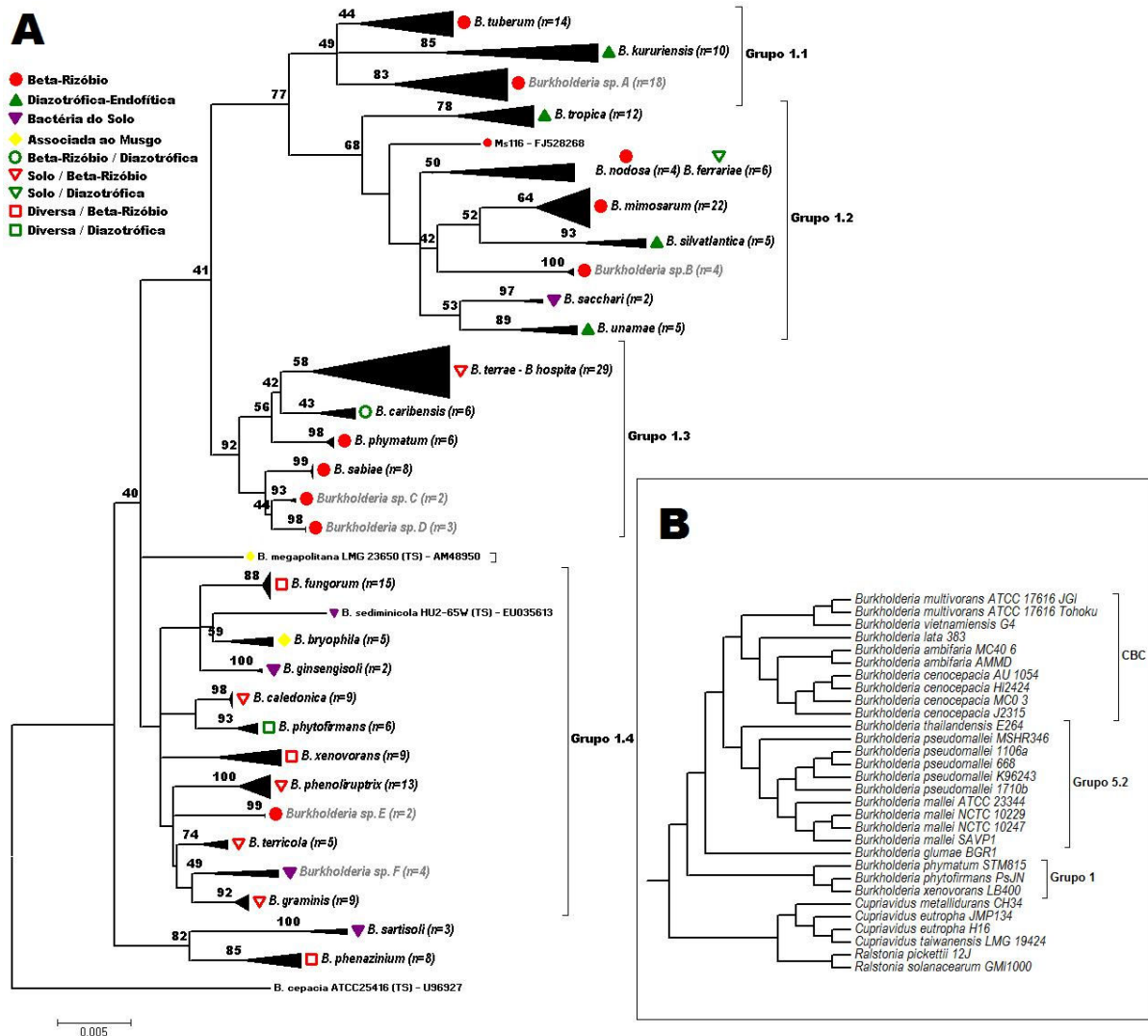


Figura 2. A: Relações filogenéticas entre 250 isolados de *Burkholderia*, incluindo estirpes-padrão e referência das espécies validadas do gênero. O valor de *n*, após o nome de cada espécie, representa o número de isolados. Toda a análise filogenética foi feita como descrito na Figura 1. Foram analisadas 1167 posições válidas. Os valores de “Bootstrap”, obtidos com 5.000 réplicas, quando acima de 40%, estão indicados. **B:** Árvore filogenética, obtida da análise de 420 genomas, na figura é mostrada apenas a topologia do ramo da família *Burkholderiaceae*, com destaque para o “Complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) e os “Grupos 1 e 5.2” (definidos na Figura 1).