

Identificación Filogenética de Bacterias Fitopatógenas

M.C. Andrés Aguilar Granados, Laboratorio de Bacterias, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal-SENASICA, Guillermo Pérez Valenzuela # 127, Col. del Carmen, Delegación Coyoacán. México D.F. CP 04100, México. Correspondencia: aguilargranadosandres@gmail.com

El término “Filogenia” proviene del griego (“φύλον”, raza y “genia”, nacimiento, producción, generación) y hace referencia a las relaciones evolutivas entre los organismos (especies, géneros, familias). La filogenia está considerada también como la rama de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos. Biológicamente esta considerado como origen, evolución y desarrollo de las especies (Rodicio y Mendoza, 2004).

Existen dos sistemas de clasificación; la fenética y la cladista. Históricamente las relaciones filogenéticas se inferían a partir del análisis de datos generalmente morfológicos, serológicos, bioquímicos, fisiológicos y de patogenicidad. En tanto, la relación filogenética cladista se basa en la comparación de secuencias de DNA permitiendo establecer relaciones precisas y confiables entre los organismos procariontes, generando cercanías evolutivas con interpretaciones cuantitativas y directas. Aunque la secuenciación de ácidos nucleicos es un método nuevo dentro de los estudios de sistemática, ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para inferir la historia filogenética de los organismos².

Carl Woese en 1987 y 1993 determinó que el gen que codifica el RNA ribosomal 16S era la macromolécula más adecuada para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, esto debido a las siguientes características:

Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. No está sujeto a transmisión horizontal. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios (presenta constancia funcional). El tamaño relativamente largo del gen (1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas. La tasa de cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariontes, y suficiente variable para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. Desde el punto de vista metodológico no es excesivamente largo permitiendo aplicar técnicas de secuenciación, alineamiento, comparación en base de datos y realización de árboles filogenéticos.

Carl Woese en 1990, agrupó a los organismos celulares en tres dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. El análisis de los ARNr 16S se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procarionte, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.

El método molecular de identificación bacteriana

mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: *a)* amplificación del gen, *b)* secuenciación y *c)* análisis de la secuencia.

Para utilizar las secuencias en estudios filogenéticos éstas deben ser revisadas y alineadas en función de sus homologías. Posteriormente se comparan las secuencias en bases de datos (GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System)). Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético.

El análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. Esto se logra empleando distintos métodos de reconstrucción filogenética (Máxima parsimonia, Máxima verosimilitud, Inferencia bayesiana, Neighbour Joining, entre otros). El resultado es uno o más árboles filogenéticos que representan las relaciones evolutivas de las muestras analizadas. A partir de estos árboles, si el muestreo taxonómico y de regiones ha sido adecuado, se pueden realizar inferencias sobre las relaciones evolutivas de las especies.

Hay que tener en cuenta, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación del ADNr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. La especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una identidad del 97 % o más. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación.

La identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial del diagnóstico para la aplicación posterior del tratamiento adecuado. En la actualidad, la mayor parte de las bacterias fitopatógenas pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales (aislado previo del agente patógeno y evaluación de características fenotípicas). Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo o resulta difícil, tales como; bacterias no cultivables, bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida, bacterias fastidiosas y bacterias de crecimiento lento. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis filogenético puede representar una ventaja tanto en tiempo como en especificidad.

Teniendo en cuenta su potencialidad, a medida que los recursos técnicos aumenten y el precio se haga más

competitivo, la identificación bacteriana basada en análisis filogenético encontrará probablemente una aplicación más amplia en los laboratorios.

Referencias Bibliográficas

- Neefs J-M, van de Peer Y, Hendriks L, de Wachter R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *NuclAcids Res*;18:2237-2330.
- Olsen GJ, Woese CR. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. 7:113-123.
- Rodicio M. R; M. C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22:238-45.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 51:221-227.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 4576-4579.
- Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol* 6:143-151.
http://ocw.uam.es/cursos/valcarcel/filogenia/1_W_Text_1.pdf
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/phylo.html>