

Análise filogenética por inferência bayesiana de plasmídeos mitocondriais de fungos

Andrade, Bruno S.¹, Selbach-Schnadelbach, Alessandra², Rössle, Shaila C. S.³, Pereira, Gonçalo A.G.⁴, Góes-Neto, Aristóteles²

Introdução

Plasmídeos são moléculas de DNA (ou RNA) extragenômico que podem se reproduzir independentemente no interior de células vivas. Em sua estrutura podem ser circulares ou lineares, apresentando genes completos codificantes de proteínas, pseudogenes, genes completos que não codificam proteína e elementos repetitivos (terminais repetidos invertidos - *TIR*). As funções atualmente conhecidas desses plasmídeos nos hospedeiros são alterações no tempo geracional (senescência precoce ou aumento de sobrevivência) em alguns fungos, aumento da virulência, resistência a antibióticos em bactérias e resistência a alguns patógenos no caso de plantas. A ocorrência dessas estruturas nos organismos está restrita a bactérias, alguns fungos (leveduras e fungos filamentosos) e plantas e, até o presente momento, não há registro dessas estruturas em células animais. Os plasmídeos mitocondriais de fungos podem ser circulares ou lineares do tipo invertron com as terminações 5' invertidas e repetitivas (TIR) que, em sua maioria, codificam DNA e RNA polimerases [1, 2].

Plasmídeos lineares são ocasionalmente encontrados em fungos filamentosos e localizados nas mitocôndrias [3]. Todos esses plasmídeos codificam DNA e RNA polimerases do tipo viral e possuem uma proteína de cerca de 120 kDa, covalentemente ligadas ao terminal 5' que pode estar envolvida diretamente com os processos de replicação e integração do mesmo [3, 4].

A estatística bayesiana aplicada a análises filogenéticas é relativamente nova quando comparada a outros métodos tradicionais (parcimônia, máxima verossimilhança e neighbour-joining), mas bastante interessante, pois gera tanto uma árvore estimada quanto o grau de incerteza de cada grupo naquela árvore. Esse método estatístico é altamente relacionado com a Máxima Verossimilhança. A hipótese ótima é aquela com a máxima probabilidade posterior. A probabilidade posterior para uma hipótese é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese [5].

Seqüências aminoacídicas conservadas em proteínas são amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas assim como divergências recentes próximas à raiz da árvore universal da vida [6]. Para seqüências

distantemente relacionadas, o uso de dados de nucleotídeos pode ser problemático, apresentando certa dificuldade na análise, onde a frequência de bases pode variar entre as espécies, e a saturação de substituições pode diluir a informação filogenética [6].

Até o presente momento 13 espécies do clado fúngico possuem plasmídeos mitocondriais completamente seqüenciados: sete ascomicetos, cinco basidiomicetos e um quitridiomiceto (tab. 1).

Para a realização deste trabalho foram analisadas apenas seqüências aminoacídicas das DNA e RNA polimerases codificadas pelos plasmídeos mitocondriais descritos anteriormente, os quais possuem uma estrutura linear com as terminações invertidas repetitivas.

Material e métodos

As seqüências aminoacídicas completas das DNA (DPO) e RNA (RPO) polimerases de todos os plasmídeos mitocondriais conhecidos foram alinhadas utilizando o software Bioedit (versão 7.0.5.2) através da matriz de alinhamento *Blossum 62*, seguido de ajustes manuais. A análise bayesiana foi realizada através do programa Mr. Bayes [7] utilizando-se dois conjuntos de dados (DPO e POR) formando um *contig*, de acordo com o modelo de evolução mitocondrial *MTMAM* [8] por 1.000.000 de gerações. O plasmídeo da espécie *Spizellomyces punctatus* (W.J. Koch) D.J.S. Barr foi selecionado como grupo externo nessa análise por Chytridiomycota ser considerado um grupo ancestral em relação à Ascomycota/ Basidiomycota.

Resultados

A árvore bayesiana de consenso (Fig. 1) apresenta dois grupos bem definidos (grupos I e II) com 100% de probabilidade posterior e todos os outros subgrupos com a mesma probabilidade. O grupo I é formado por cinco Ascomycota (*Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge, *Hansenula kluyveri* (Bedford) Kudryavtsev, *Podospora anserina*, *Blumeria graminis* (Rabenh.) Niessl e *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.) e dois Basidiomycota (*Agaricus bitorquis* (Qué.) Sacc. e *Hebeloma circinans* (Qué.) Sacc.). O grupo II é formado por dois Ascomycota (*Gelasinospora sp.* e *Neurospora*

1. Discente no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Universitária, s/n - km 03 da BR 116 Campus universitário, DCBIO/LABIO/LAPEM. CEP: 44031-460. Feira de Santana - BA - Brasil. E-mail: bandradefsa@yahoo.com.br

2. Professores Adjuntos do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Universitária, s/n - km 03 da BR 116 Campus universitário, DCBIO/LABIO/LAPEM. CEP: 44031-460. Feira de Santana - BA - Brasil.

3. Professor Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Laboratório de Física-Biológica, sl. G026, IBCCF, CCS, UFRJ Ilha do Fundão 21949900 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

4. Professor Associado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Genética e Evolução. Cidade Universitária Zeferino Vaz Cidade Universitária 13083-970 - Campinas, SP - Brasil - Caixa-Postal: 6109.

Apoio financeiro: FAPESB.

intermédia F.L. Tai) e três Basidiomycota (*Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. e *Crinipellis_ perniciososa* (Stahel) Singer). Diferentemente do plasmídeo do Chytridiomycota, considerado pequeno, todos os outros plasmídeos de ascomicetos e basidiomicetos apresentam um tamanho entre 5,8 – 8,6 kb, com suas DNA e RNA polimerases em fases de leitura opostas (tab. 1).

Discussão

Nos grupos I e II verificou-se claramente que há um agrupamento entre plasmídeos de espécies de filos diferentes, ou seja, espécies de Ascomycota agrupando-se com Basidiomycota e vice-versa. Nesse estudo, a árvore gerada pela inferência bayesiana, sustentada por um modelo específico de evolução mitocondrial, apresenta todos os ramos com probabilidade *a posteriori* máxima (100%). Resultados como estes sugerem eventos de transferência horizontal para esses plasmídeos nessas espécies de fungos, corroborando os resultados de outros trabalhos já publicados [1, 8, 9]. A maioria dos trabalhos que descrevem fenômenos de transferência horizontal relata a provável relação dessas seqüências com proteínas de adenovírus e retrovírus.

A filogenia bayesiana suporta claramente todos os resultados e hipóteses descritas anteriormente, mas necessitam-se ainda de estudos mais aprofundados, com a incorporação de outros métodos de inferência filogenética para a análise desses dados e a verificação das relações filogenéticas desses plasmídeos com seqüências virais provavelmente mais estreitamente relacionadas.

Agradecimentos

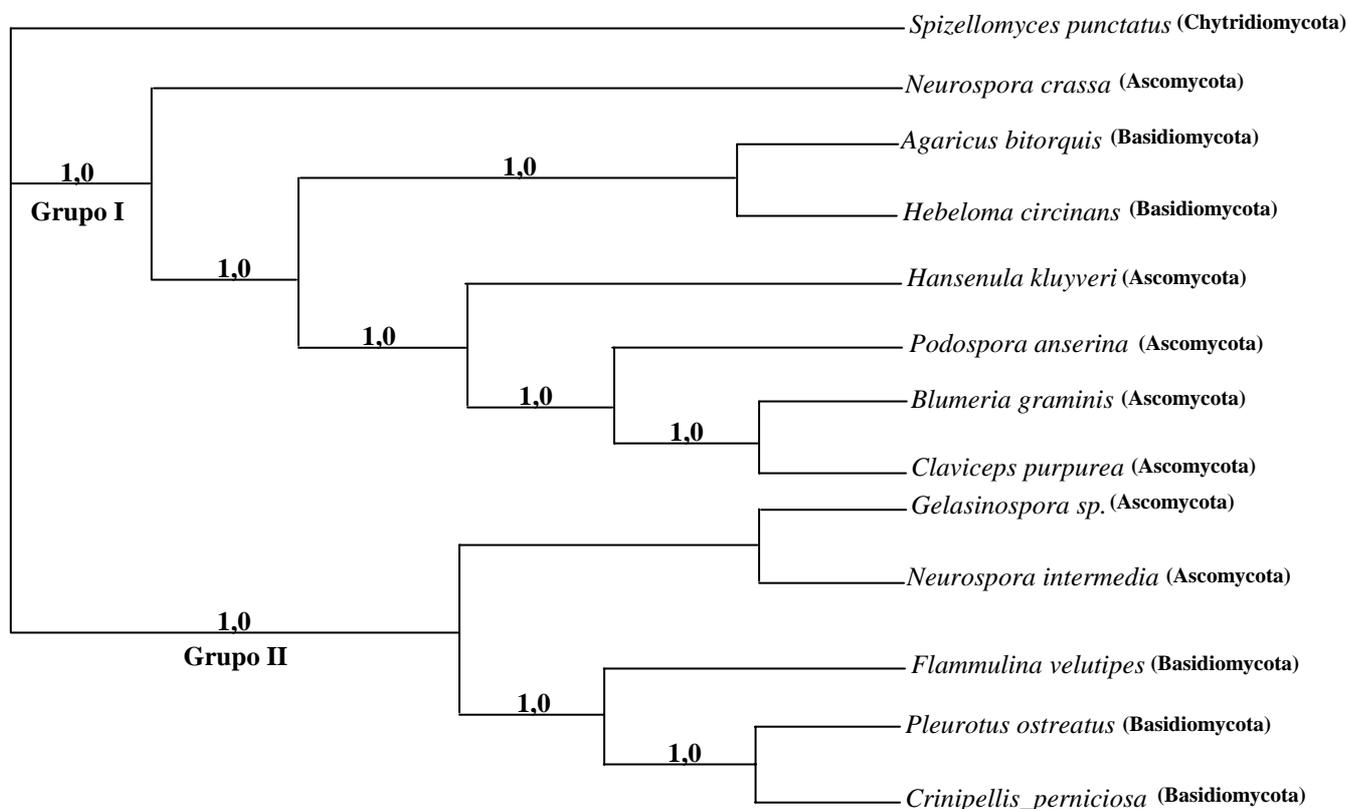
À fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de uma bolsa de Mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UEFS, FIOCRUZ-BA) e a Universidade Estadual de Feira de Santana pela infra-estrutura disponibilizada.

Referências

- [1] GRIFFITHS, A. J. F. *Natural Plasmids of Filamentous Fungi*. Microbiological Reviews (1995) 59:4 673–685.
- [2] KENNEL, J. *Jack Kennel and lab co-workers at Saint Louis University*. 2006 [Online] Homepage: <http://pages.slu.edu/faculty/kennelj/index.html>.
- [3] NAKAI, Ryohsuke; SEN, Kikuo; KUROSAWA, Shin-ichi; SHIBAI, Hiroshiro. Basidiomicetous fungus *Flammulina velutipes* harbors two linear mitochondrial plasmids encoding DNA and RNA polymerases. FEMS Microbiology Letters 190 (2000) 99-102.
- [4] CHAN, Benedict Shui-Shing; COURT, Deborah A.; VIERULA, John; BERTRAND, Helmut. *The kalilo linear senescence-inducing plasmid of Neurospora is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases*. Curr Genet (1991) 20:225-237.
- [5] HOLDER, Mark and LEWIS, Paul O. *Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian Approaches*. Nature Reviews Genetics 4:275.
- [6] YANG, Ziheng; NIELSEN, Rasmus and HASEGAWA, Masami. *Models of Amino Acid Substitution and Applications to Mitochondrial Protein Evolution*. Mol. Biol. Evol. 1998 15(12):1600–1611.
- [7] HUELSENBACK e RONQUIST. Mr Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics applications note (2003) 8:754-755.
- [8] GOJKOVIĆ, Z. et al. *Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts*. Mol Gen Genomics (2004) 271: 387–393.
- [9] MAY, G. and TAYLOR, J.W. *Independent transfer of mitochondrial plasmids in Neurospora crassa*. Nature (1989) 339:320 – 322.

Tabela 1. Comparação entre plasmídeos mitocondriais lineares de fungos.

Plasmídeo	Fungo spp.	Filo	Ordem	Tam. (bp)	Orientação	DNA pol. (aa)	RNA pol. (aa)	Nº. Acesso	Referência
pEM	<i>Agaricus bitorquis</i>	Basidiomycota	Agaricales	5810	DNA/RNA	797	1102	X63075	Robison and Horger, 1999
pBgh	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	Ascomycota	Erysiphales	7965	RNA/DNA	1062	973	NC_004935	Giese et al., 2003
pCIK1	<i>Claviceps purpurea</i>	Ascomycota	Hypocreales	6752	DNA/RNA	1063	963	X15648	Oeser and Tudzynski, 1989
pCP	<i>Crinipellis perniciosa</i>	Basidiomycota	Agaricales	6743	RNA/DNA	899	1028	NC_005927	Formighieri et al. 2006
pFV1	<i>Flammulina velutipes</i>	Basidiomycota	Agaricales	7363	DNA/RNA	925	1168	AB028633	Nakai et al., 2000
pG114	<i>Gelasinospora sp.</i>	Ascomycota	Sordariales	8231	DNA/RNA	987	831	L40494	Yuewang et al., 1996
pPK2	<i>Hansenula kluyveri</i>	Ascomycota	Saccharomycetales	7174	RNA/DNA	1118	992	Y11606	Blaisonneau et al., 1999
pHC2	<i>Hebeloma circinans</i>	Basidiomycota	Agaricales	3229	DNA/RNA	858	209	Y11504	Bai et al., 1998
pHarbin-3	<i>Neurospora crassa</i>	Ascomycota	Sordariales	7050	RNA/DNA	1021	896	AF133505	Xu et al., 1999
pKalilo	<i>Neurospora intermedia</i>	Ascomycota	Sordariales	8642	DNA/RNA	969	811	X52106	Chan et al., 1991
pMLP2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycota	Agaricales	7005	RNA/DNA	900	993	AF355103	Kim et al., 2000
pAL2-1	<i>Podospira anserina</i>	Ascomycota	Sordariales	8395	RNA/DNA	1197	948	X60707	Hermanns and Osiewacz, 1992
	<i>Spizellomyces punctatus</i>	Chytridiomycota	Spizellomycetales	1775	DNA/RNA	361	218	AF404303	Forget et al., 2002

**Figura 1.** Árvore bayesiana de consenso pelo modelo MTMAN para as DPO e RPO de plasmídeos mitocondriais lineares de fungos.