

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

CRESCIMENTO MICELIAL E SÍNTESE DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM TRÊS ISOLADOS DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS SOB CONDIÇÕES DE TEMPERATURAS SUPRA-ÓTIMAS⁽¹⁾

Adão de Siqueira Ferreira⁽²⁾, Marcos Rogério Tótola⁽³⁾, Adriano Guimarães Parreira⁽⁴⁾ & Arnaldo Chaer Borges⁽³⁾

RESUMO

A síntese de proteínas de choque térmico é uma alteração fisiológica transitente na célula de organismos expostos a temperaturas supra-ótimas. A resposta fisiológica ao choque térmico é dependente, particularmente, do tipo de célula e da capacidade dos organismos em responder às alterações do meio. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento micelial e a síntese de proteínas de choque térmico de dois isolados de *Pisolithus* sp. (RV82 e RS24) e de um isolado de *Paxillus involutus* em temperaturas supra-ótimas. No trabalho, foram feitas análises de crescimento micelial em placa de Petri com meio apropriado para o crescimento sob condições de temperaturas subletais, letais e de choque térmico. As proteínas nos micélios dos isolados foram marcadas com aminoácido radioativo (³H-leucina), e a radioatividade, quantificada em solução de cintilação. A síntese das proteínas de choque térmico (HSPs) foi avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE e 2D-PAGE). Demonstrou-se, com ³H-leucina, que os fungos ectomicorrízicos apresentaram respostas diferenciadas em relação ao crescimento micelial quando expostos a temperaturas supra-ótimas. Os dois isolados de *Pisolithus* sp., RS24 e RV82, mostraram-se mais tolerantes a altas temperaturas, quando comparado ao isolado de *P. involutus*. Os isolados de *Pisolithus* sp. diferem

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa – UFV. CEP 36570-000 Viçosa (MG). Bolsista do CNPq. Recebido para publicação em janeiro de 2004 e aprovado em dezembro de 2006.

⁽²⁾ Professor do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. CEP 38400-902 Uberlândia (MG). E-mail: adaosferreira@yahoo.com.br

⁽³⁾ Professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa – UFV. CEP 36570-000 Viçosa (MG). E-mails: chaer@ufv.br; totola@ufv.br

⁽⁴⁾ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

quanto à síntese de proteínas de estresse, com a síntese de HSPs de alta e de baixa massa molecular. Em resposta ao choque térmico, o isolado RV82 sintetizou proteínas putativas dos grupos HSP70, HSP28 e HSP26 e as sHSPs (15-18 kDa), enquanto o isolado RS24 sintetizou as dos grupos HSP86, HSP60, HSP55 e HSP35 e as sHSPs (12-18 kDa). A baixa tolerância a temperaturas elevadas do isolado de *P. involutus* foi atribuída à ausência de síntese de proteínas putativas do grupo HSPs em condições de choque térmico. Os resultados sugerem que os isolados de fungos ectomicorrízicos diferem quanto ao mecanismo de indução de termotolerância.

Termos de indexação: estresse térmico, HSPs, *Pisolithus* sp., *Paxillus involutus*, proteínas de choque térmico.

SUMMARY: MYCELIAL GROWTH AND SYNTHESIS OF HEAT SHOCK PROTEINS BY ECTOMICORRHIZAL FUNGI UNDER SUPRA-OPTIMAL TEMPERATURE CONDITIONS

*In most organisms, the synthesis of heat shock proteins is a transient physiological change in the cell exposed to supra-optimal temperatures. The physiological response to heat shock is particularly dependent on the cell type and on the capacity of the organisms to respond to environmental alterations. In this study the mycelial growth and synthesis of heat shock proteins of two *Pisolithus* isolates (RV82 and RS24) and one *Paxillus involutus* isolate to supra-optimal temperatures was evaluated. Mycelial growth was evaluated under sublethal, lethal and heat shock temperature conditions with appropriate growth medium on Petri plates. Proteins in the mycelium of the isolates were marked using radioactive amino acid (^3H -leucine) and the radioactivity was quantified in scintillation solution. Synthesis of heat shock proteins (HSPs) were evaluated by polyacrylamide gels (SDS-PAGE and 2D-PAGE). The two *Pisolithus* isolates RS24 and RV82 were more tolerant to high temperatures than *P. involutus*. The *Pisolithus* isolates differed regarding the synthesis of stress proteins since high and low molecular mass proteins were synthesized. In response to the heat shock, the RV82 isolate synthesized putative heat shock proteins of the groups HSP70, HSP28, HSP26 and sHSPs (15–18 kDa), while the RS24 isolate synthesized putative heat shock proteins of the groups HSP86, HSP60, HSP55, HSP35 and sHSPs (12–18 kDa). The low heat tolerance of the *P. involutus* isolate was attributed to its incapacity of synthesizing HSPs. Our results suggest that the induction of the thermotolerance mechanism differs among ectomicorrhizal fungi isolates.*

Index terms: heat stress, heat shock proteins, HSPs, *Pisolithus* sp., *Paxillus involutus*.

INTRODUÇÃO

Os organismos, na natureza, estão sujeitos a uma variedade de estresse devido a flutuações das condições ambientais. Em resposta a essas flutuações, a grande maioria dos organismos, especialmente os microrganismos, desenvolveu mecanismos de proteção para se sobrepôr às condições adversas ao crescimento (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Vierling, 1991; Plesofsky-vig & Brambl, 1993). Entre essas estratégias desenvolvidas incluem-se os mecanismos de indução à tolerância ao estresse (Levitt, 1980; Lindquist, 1986; Sun et al., 2002).

Um dos mecanismos responsáveis pela tolerância mais estudados é o da resposta dos organismos ao estresse por temperatura, que coincide com o acúmulo

de proteínas de estresse, conhecidas como proteínas de choque térmico, as HSPs (Levitt, 1980; Lindquist, 1986; Jakob et al., 1993; Feder & Hofmann, 1999; Edkins et al., 2004). O aumento na síntese de HSPs pode levar à aquisição de termotolerância quando da exposição à temperatura subletal e, também, a outras condições de estresse, como pH, metais pesados e salinidade (Feder & Hofmann, 1999). Embora a síntese de HSPs, em resposta ao choque térmico, seja uma alteração bioquímica conservada entre os organismos, diversos estudos têm demonstrado que há grande diferença entre os organismos quanto à indução de HSPs, possibilitando a separação inter e intra-espécies quanto à capacidade de tolerância aos estresses, incluindo as leveduras (Sanchez & Lindquist, 1990) e os fungos filamentosos (Plesofsky-Vig & Brambl, 1985, 1993; Mohsenzadeh et al., 1998).

As evidências, em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que as HSPs sintetizadas em resposta ao choque térmico são essenciais para a proteção celular durante as condições de estresse por temperatura. Inicialmente, as HSPs podem atuar impedindo a formação de agregados de proteínas desnaturadas (Jakob et al., 1993; Pivovarova et al., 2005) e, posteriormente, podem estar envolvidas na reativação de proteínas desnaturadas, decorrente da exposição a altas temperaturas (Glover & Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2000; Edkins et al., 2004). Embora a resposta ao choque térmico ocorra na maioria dos organismos estudados, o mecanismo de indução de termotolerância parece ser dependente do estado fisiológico e do tipo de célula (Schlesinger et al., 1982; Neidhardt et al., 1984; Vierling, 1991; Plesofsky-Vig & Brambl, 1993; Schöffl et al., 1998; Ferreira et al., 2005). Em fungos ectomicorrízicos, a indução de HSPs pode ser uma alteração fisiológica importante na adaptação desses fungos em ambientes com variações extremas de temperaturas. Recentemente, Ferreira et al. (2005) demonstraram, em um isolado de *Pisolithus* sp., a síntese de proteínas de baixa massa molecular quando da exposição do micélio ao choque térmico. Contudo, a existência de relação entre níveis de tolerância a estresse térmico e a expressão de HSPs, em fungos ectomicorrízicos, ainda não foi relatada.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento micelial e a síntese de proteínas de choque térmico de dois isolados de *Pisolithus* sp. e de um isolado de *Paxillus involutus* em temperaturas supra-ótimas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, no Núcleo de Biotecnologia Aplicada na Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Avaliaram-se a resposta e a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) em dois isolados de *Pisolithus* sp. – o RS24, proveniente do Rio Grande do Sul, e o RV82, proveniente da região de Viçosa-MG – e um de *Paxillus involutus* (PI), originário da França.

Os isolados foram cultivados em placas de Petri em meio ágar MNM (Marx, 1969) a 28 °C por 10 dias. Um disco de ágar de 10 mm de diâmetro com micélio fresco, retirado das bordas das colônias, foi transferido para o centro de cada uma das placas de Petri, que continha 20 mL de MNM, com o micélio em contato com o meio. As placas foram incubadas em temperaturas de 20 a 36 °C, com variação de 2 °C, em quatro repetições para cada temperatura. A avaliação do crescimento das colônias, por medição do diâmetro, foi feita a cada 24 h durante o período de incubação de 12 dias. Os dados foram ajustados pela equação de Arrhenius, a fim de definir a temperatura ótima de crescimento para cada isolado.

As condições de temperaturas supra-ótimas foram determinadas em placas de Petri em meio ágar MNM, e as placas, incubadas à temperatura ótima de crescimento de cada isolado. Após sete dias de incubação, as placas foram expostas a temperaturas subletais de 38, 40, 42, 44, 46 ou 48 °C por duas horas, seguindo-se a incubação à temperatura ótima de crescimento de cada isolado. As temperaturas de choque térmico foram de 36, 38, 40, 42 e 44 °C por 30, 60 ou 120 min de exposição, seguindo-se a incubação à temperatura ótima de crescimento por quatro horas e subsequente exposição à temperatura subletal, de cada isolado, por duas horas. Após esses tratamentos, as placas foram incubadas à temperatura ótima do isolado por seis dias. A cada 24 h foram feitas as medidas do diâmetro das colônias, em quatro posições nas placas. Em cada tratamento foram utilizadas quatro repetições.

A marcação de proteínas com leucina tritiada (³H-leucina) foi feita segundo método descrito por Jinn et al. (1989), com algumas modificações. Discos de ágar com micélio fresco de cada isolado foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido MNM suplementado com extrato de malte (1,5 g L⁻¹) e extrato de levedura (50 mg L⁻¹). Após 10 dias de incubação à temperatura ótima, foi realizada a troca do meio por 10 mL de meio líquido MNM sem extrato de levedura e tiamina, sendo os frascos incubados novamente à temperatura ótima de crescimento dos isolados. Após incubação por dois dias, os frascos com o micélio foram submetidos a condições de choque térmico por 30, 60 ou 120 min de exposição, utilizando-se três repetições para cada tratamento. A adição de 20 µCi [³H]-leucina, por frasco, foi efetuada após 15, 30 ou 60 min, nos respectivos tempos de exposição à temperatura de choque térmico. Os tratamentos-controle foram estabelecidos com os mesmos tempos de exposição à leucina tritiada, sob temperatura ótima de crescimento de cada isolado. O micélio foi lavado imediatamente com o mesmo meio, contendo leucina não-marcada (5 mmol L⁻¹), e incubado à temperatura ótima de crescimento dos isolados por quatro horas. Em seguida, o micélio foi lavado com água destilada e o excesso desta eliminado entre camadas de gaze. O material foi congelado em nitrogênio líquido e conservado em -80 °C, para posterior análise.

As proteínas marcadas foram extraídas com 5 mL de solução-tampão (0,25 mol L⁻¹ de sacarose, 0,2 mol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8), 30 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 100 mmol L⁻¹ de KCl, 1 mmol L⁻¹ de DTT e 1 mmol L⁻¹ de PMSF) em cadinho de porcelana a 4 °C. O homogenato de cada tratamento foi filtrado em gaze e centrifugado a 20.000 g por 20 min. Uma alíquota de 50 µL de cada sobrenadante, em triplicata, foi utilizada para quantificação de aminoácido radioativo incorporado às proteínas, conforme método descrito por Mans & Novelli (1961). O restante do sobrenadante foi utilizado no fracionamento de proteínas com sulfato de amônio a 0–30, 30–50, 50–70 e 70–100 % de

saturação, como descrito por Jinn et al. (1989). Após uma hora, o precipitado de cada fração foi centrifugado a 20.000 g por 20 min, e o pélete foi ressuscitado em 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8), contendo 1 mmol L⁻¹ de EDTA e 0,1 % de 2-mercaptoetanol. Uma alíquota de 50 µL foi retirada e colocada em frasco de 15 mL com 5 mL de solução de cintilação (Sigma), para medir a radioatividade do aminoácido (³H-leucina) em cada uma das frações, em um cintilador (Beckman, modelo LS 6000 IC). A dosagem de proteínas foi feita pelo método de coloração com azul de “Comassie” (Bradford, 1976), para se determinar a incorporação específica de ³H-leucina (cpm mg⁻¹ proteínas) durante as condições de choque térmico.

A extração de proteínas solúveis para avaliação em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) foi feita utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após o fracionamento, o pélete de cada fração foi ressuscitado em solução-tampão (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8), 1 mmol L⁻¹ de EDTA e 0,1 % de 2-mercaptoetanol). A diálise do extrato protéico foi feita com o mesmo tampão, por 48 h a 4 °C. O extrato de proteínas da solução dialisada foi submetido a três lavagens com solução 0,1 mmol L⁻¹ de acetato de amônio em metanol e uma vez com acetona. O precipitado de cada lavagem foi centrifugado a 20.000 g por 20 min. O pélete foi seco a vácuo por 30 min e ressuscitado em tampão Laemmli (1970). A mesma quantidade de proteínas das amostras foi usada para a eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE). Após a corrida, o gel foi corado com azul de “Comassie” e fotografado.

O gel para eletroforese em poliácridamida em duas dimensões (2D-PAGE) de proteínas solúveis foi obtido conforme método descrito por O’Farrell (1975), com algumas modificações. As proteínas obtidas do fracionamento com 50–70 % de sulfato de amônio foram ressuscitadas em solução-tampão, para a diálise, e lavadas com acetato de amônio (0,1 mmol L⁻¹) em metanol e com acetona. O pélete da última lavagem foi seco a vácuo e ressuscitado em tampão de amostra contendo 9,5 mol L⁻¹ de uréia, 2 % de Triton X-100, 5 % de β-mercaptoetanol, 4 % de anfólitos pH 5,0–7,0 e 10 % de anfólitos pH 3,5–10. Uma mesma quantidade de proteínas (60 µg de proteínas) foi utilizada para focalização isoeletrica (IEF). A eletroforese na primeira dimensão foi feita em gel com gradiente de pH com 9,5 mol L⁻¹ de uréia, 2 % de acrilamida, 0,1 % (v/v) de Triton X-100, 4 % (v/v) de anfólitos pH 5,0–7,0 e 1 % (v/v) de anfólitos pH 3,5–10 a 750 V, por sete horas. O SDS-PAGE, segunda dimensão, foi conduzido em gel com 13 % de poliácridamida (Laemmli, 1970). Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata, segundo Blum et al. (1987).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, com contrastes ortogonais a 1 % de probabilidade. Algumas variáveis foram analisadas por intervalos de confiança a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três isolados de fungos ectomicorrizicos foram caracterizados quanto à faixa de temperatura de crescimento em meio MNM (Figura 1). A temperatura ótima de crescimento do isolado RV82 foi maior do que a dos outros dois isolados. O isolado de *P. involutus* apresentou temperatura ótima de crescimento de 26 °C, e 31 °C foi o limite superior de crescimento, dois graus abaixo das temperaturas-limite de crescimento dos dois isolados de *Pisolithus*. Contudo, a taxa de crescimento do *P. involutus*, em meio sólido, foi superior à dos isolados de *Pisolithus* sp. (Figura 1).

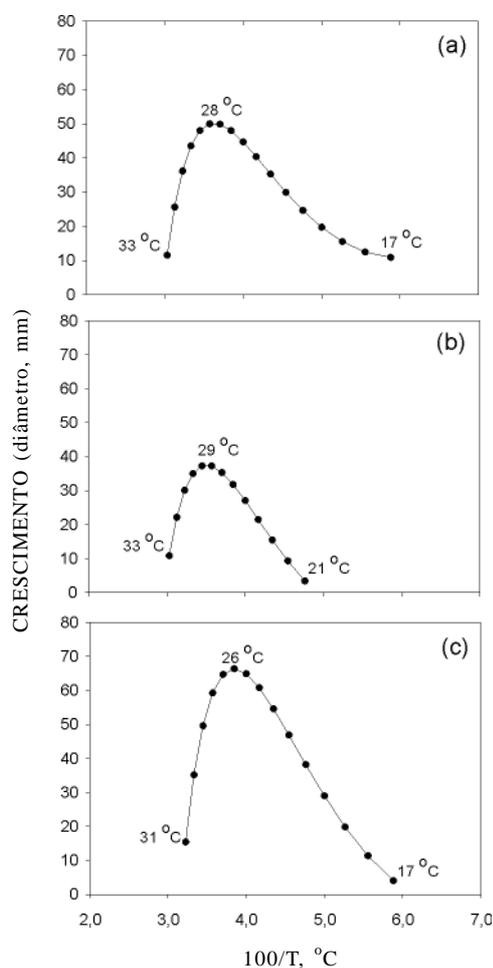


Figura 1. Temperaturas cardinais de crescimento de três isolados de fungos ectomicorrizicos. (a) *Pisolithus* sp. (RS24); (b) *Pisolithus* sp. (RV82); e (c) *Paxillus involutus*. As temperaturas cardinais foram definidas de acordo com a equação de Arrhenius. A avaliação foi feita pela estimativa do diâmetro das colônias em 12 dias de incubação nas diferentes temperaturas, conforme as taxas de crescimento de cada isolado (crescimento micelial/dia) em cada temperatura.

Os isolados expostos a temperaturas supra-ótimas (Figura 2) apresentaram respostas distintas com relação à tolerância a temperaturas subletal e letal. Observa-se que os isolados de *Pisolithus* sp., RS24 e RV82, toleram temperaturas de 48 e 46 °C por duas horas de exposição, respectivamente. No entanto, o isolado de *P. involutus* não se mostrou tolerante a temperaturas acima de 40 °C por duas horas de exposição. A exposição dos isolados a temperaturas maiores do que a de tolerância pode provocar danos celulares, que impossibilitam a recuperação do crescimento em temperatura ótima. Em células eucarióticas, alguns trabalhos têm demonstrado que a temperatura letal ocorre acima de 45 °C por duas horas de exposição (Vierling, 1991; Queitsch et al.,

2000), incluindo as leveduras (Obserson et al., 1999) e os fungos filamentosos (Plesofsky-vig & Brambl, 1985, 1993; Mohsenzadeh et al., 1998).

Observou-se que os três isolados estudados diferiram quanto à temperatura de choque térmico (Figura 3), sendo a do RV82 a maior e correspondente a 42 °C, enquanto a do *P. involutus* foi de 36 °C. A temperatura de choque térmico do RS24 foi 2 °C menor que a do RV82. Quando os isolados são expostos à temperatura de choque térmico, antes da exposição à temperatura subletal, ocorre recuperação significativa no crescimento micelial (ver os contrastes ortogonais na Figura 3) dos isolados estudados, após 48 h de incubação em temperatura ótima de crescimento.

Constatou-se também que a capacidade de recuperação de crescimento do micélio do isolado RV82 é maior do que a do isolado RS24, após a exposição à temperatura de choque térmico e temperatura subletal (Figura 3). O micélio do isolado de *P. involutus* submetido à temperatura subletal apresentou recuperação limitada do crescimento, quando comparado com os outros dois, demonstrando a dificuldade de crescimento do isolado quando o micélio é exposto ao estresse por temperatura. A temperatura de choque térmico tem sido relacionada como uma condição de aquisição de termotolerância que favorece a recuperação do crescimento, quando os organismos são expostos a temperaturas subletais ou letais (Neidhardt et al., 1984; Vierling, 1991; Sanmiya, 2004).

No que se refere às condições de temperaturas supra-ótimas, os resultados deste trabalho demonstram que o mecanismo de aquisição de termotolerância pelo *P. involutus* difere daquele dos isolados de *Pisolithus*. Em outros organismos eucariotos, as temperaturas acima de 40 °C são requeridas como uma condição de temperatura para que ocorra a indução de termotolerância, permitindo aos organismos maior resistência quando expostos às temperaturas subletais ou letais (Lin et al., 1984; Plesofsky-Vig & Brambl, 1985; Helm et al., 1997). A exposição dos organismos à temperatura de choque térmico é conhecida como uma condição que induz o mecanismo de aquisição de termotolerância em muitos organismos, sendo esse fenômeno relacionado principalmente com o acúmulo de HSPs nas células (Sanchez & Lindquist, 1990; Vierling, 1991; Sanchez et al., 1992; Hsieh et al., 1992; Schöffl et al., 1998; Ferreira et al., 2005). A baixa tolerância de *P. involutus* pode estar associada à origem do isolado: região de clima temperado. Os isolados de *Pisolithus* são procedentes de regiões do Brasil onde as variações de temperatura, principalmente as altas temperaturas, podem atuar como indutor de mecanismos fisiológicos de adaptação.

A técnica de incorporar aminoácidos marcados para avaliar as alterações na síntese de proteínas tem sido usada no estudo de vários organismos, incluindo os

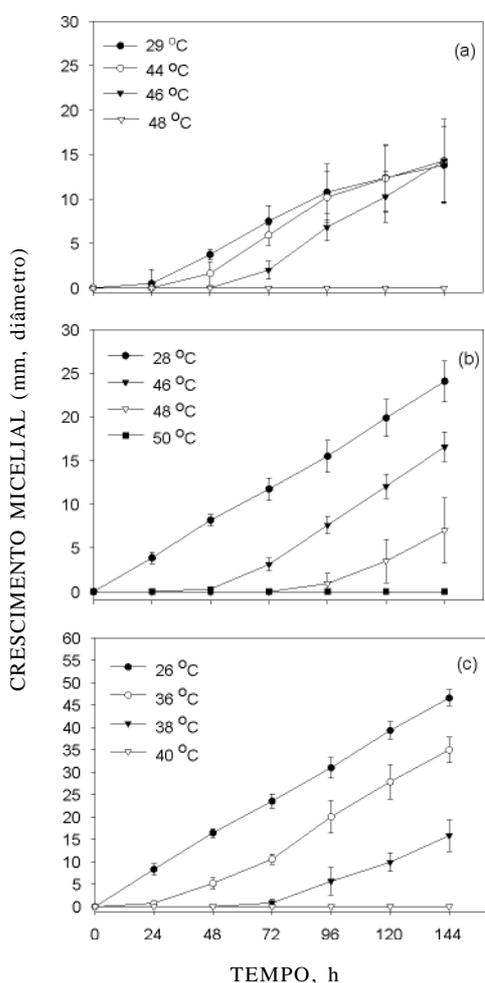


Figura 2. Crescimento micelial de dois isolados de *Pisolithus* sp. e um de *Paxillus involutus* após as condições de temperaturas supra-ótimas. (a) isolado RV82; (b) isolado RS24; e (c) *P. involutus*. Os isolados foram expostos por duas horas às temperaturas indicadas para cada isolado e incubados à temperatura ótima de crescimento por 144 horas. As barras indicam os intervalos de confiança a 5% ($n = 4$) em cada tempo de avaliação.

de síntese de proteínas simbiose-específicas, durante o estabelecimento da associação micorrízica (Hilbert et al., 1991). Os experimentos com ^3H -leucina demonstram que os isolados de fungos ectomicorrízicos alteram a síntese de proteínas quando expostos a

choque térmico, em relação à temperatura ótima de crescimento (Quadro 1). Nos isolados de *Pisolithus*, o aumento foi diretamente proporcional ao tempo de exposição à temperatura de choque térmico. No entanto, o isolado de *P. involutus* não apresentou aumento na incorporação de leucina tritiada no micélio em condições de choque térmico, havendo inclusive diminuição significativa quando exposto à condição de choque térmico por 60 e 120 min (Quadro 1).

Os resultados do processo de fracionamento das proteínas solúveis marcadas com ^3H -leucina e separadas na fração de 50–70 % de sulfato de amônio confirmam o aumento de ^3H -proteínas em condições de choque térmico para os isolados de *Pisolithus* sp. (Quadro 2). Esse aumento não foi observado no isolado de *P. involutus* em nenhuma das frações analisadas neste trabalho. Em plantas, Jinn et al. (1989) também constataram aumento de proteínas marcadas com ^3H -leucina na fração de 50–70 % de sulfato de amônio.

Pela eletroforese de proteínas (SDS-PAGE), obtidas durante o processo de fracionamento do extrato de proteínas solúveis com 50–70 % de sulfato de amônio, observa-se que os isolados de *P. tinctorius* se diferenciam quanto à síntese de proteínas em resposta ao choque térmico (Figura 4). O isolado RS24 mostra um perfil com a síntese de várias proteínas, com destaque para as de massa molecular de 86, 60, 55, 42 e 30-33 kDa, e que a síntese é proporcional ao tempo de exposição à condição de choque térmico (Figura 4a). O isolado RV82, em resposta rápida ao choque térmico, faz a síntese de proteínas de baixa massa molecular, especificamente as de 28, de 26 e de 15 a 18 kDa (Figura 4b). Resultados de Ferreira et al. (2005) comprovaram que essas proteínas de baixa massa molecular, marcadas com leucina radioativa (^3H -leucina) em gel de poliacrilamida, são sintetizadas quando da exposição do micélio ao choque térmico. Neste isolado também se observa a síntese de proteínas de massa molecular de 70 kDa. No isolado de *P. involutus* não foram observadas alterações na síntese de proteínas em resposta ao choque térmico.

A análise de proteínas em gel de duas dimensões (2 D-PAGE) demonstra que os isolados de *Pisolithus* se diferenciam quanto à síntese de peptídeos em resposta ao choque térmico (Figura 5). O isolado RV82 apresenta acúmulo de proteínas de massa molecular de 70 e de 15 a 18 kDa (Figura 5a, b). Neste isolado também se observa a síntese de outras proteínas de massa molecular de 60, 55 e 35 kDa, quando submetido ao choque térmico. Em relação ao isolado RS24, observa-se a síntese de novos peptídeos, em condições de choque térmico (Figura 5c, d), de massa molecular entre 50 e 55 kDa, dos quais um apresenta baixo ponto isoeletrico (pH 3,8). No isolado também se observa a síntese de novos peptídeos de baixa massa molecular, de 12 a 18 kDa (Figura 5d), quando comparado com o controle. Alguns relatos têm sugerido que a indução de HSPs é particularmente dependente do estado fisiológico e do tipo de célula exposta à

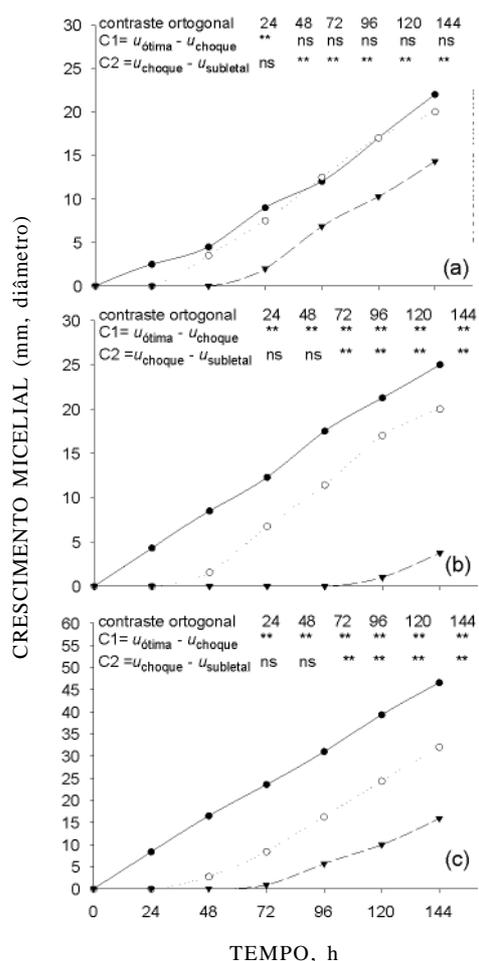


Figura 3. Crescimento micelial de dois isolados de *Pisolithus* sp. e um de *Paxillus involutus* após as condições de temperaturas supra-ótimas durante o período de incubação de 144 h. (a) isolado RV82; (b) isolado RS24; e (c) isolado de *Paxillus involutus*. Os contrastes ortogonais foram: contraste ortogonal C1 indica a diferença entre as médias de crescimento micelial na temperatura ótima (círculo cheio) e a de choque térmico seguido da exposição à temperatura subletal (círculo vazio) em cada 24 h; e contraste ortogonal C2 indica a diferença entre as médias de crescimento micelial na temperatura de choque térmico seguido da exposição à temperatura subletal (círculo vazio) e à temperatura subletal (triângulo cheio) em cada 24 h. Os asteriscos (**) indicam diferença entre os contrastes ortogonais a 1 %, enquanto as letras (ns) indicam a não-significância em cada ponto.

Quadro 1. Incorporação total de ^3H -leucina em micélio de dois isolados de *Pisolithus* sp. (RS24 e RV82) e de um isolado de *Paxillus involutus* sob condições de temperatura ótima e de choque térmico

Condição de choque térmico	Incorporação total de ^3H -leucina (cpm)	
	Temperatura ótima	Temperatura de choque térmico
Isolado RS24	28 °C	40 °C
30 min	71.565	86.526 **
60 min	113.210	189.636 **
120 min	124.435	195.515 **
Isolado RV82	29 °C	42 °C
30 min	187.653	196.840 ns
60 min	221.806	247.540 **
120 min	222.486	294.080 **
<i>P. involutus</i>	26 °C	36 °C
30 min	32.755 ns	32.261
60 min	35.094 **	31.613
120 min	66.745 **	42.673

Os isolados foram cultivados por 12 dias à temperatura ótima de crescimento. A marcação radioativa foi feita pela adição de aminoácido radioativo (^3H -leucina) aos 15, 30 ou 60 min iniciais, nas condições de choque térmico de 30, 60 ou 120 min, respectivamente. Os dados foram analisados por contrastes ortogonais a 1 % (**, significativo; NS, não-significativo) entre o controle (temperatura ótima) e as temperaturas de choque térmico, utilizando três repetições para cada tratamento.

Quadro 2. Incorporação específica de ^3H -leucina (cpm mg^{-1} proteína) em proteínas solúveis no micélio de dois isolados de *Pisolithus* sp. (RS24 e RV82) e em *Paxillus involutus*, obtidas da fração com 50–70 % de saturação com sulfato de amônio

Condição	^3H -leucina (cpm mg^{-1} proteína)	
	Temperatura ótima ⁽¹⁾	Choque térmico ⁽¹⁾
	Isolado RS24	
30 min	17.666 ± 2.399	13.657 ± 1.157
60 min	22.935 ± 1.000	29.147 ± 1642
120 min	22.822 ± 2.256	35.279 ± 1.000
	Isolado RV82	
30 min	69.276 ± 1.105	71.985 ± 1.131
60 min	91.753 ± 1.204	96.538 ± 1.933
120 min	88.839 ± 0.984	115.680 ± 2.710
	<i>P. involutus</i>	
30 min	13.847 ± 660	13.438 ± 2.276
60 min	18.919 ± 366	16.491 ± 1.520
120 min	30.414 ± 562	26.491 ± 2.306

⁽¹⁾ Cada valor representa a média de três repetições, seguido do intervalo de confiança a 5 %.

condição de estresse térmico (Neidhardt et al., 1984; Schöffl et al., 1998). O acúmulo de HSPs na célula parece ser regulado de maneira que o aumento dessas proteínas venha a proteger a célula e conferir níveis de termotolerância mais altos (Schöffl et al., 1998; Ferreira et al., 2005).

A indução de proteínas de choque térmico de baixa massa molecular (sHSPs, *small heat shock proteins*) pode estar relacionada com a capacidade de cada isolado em recuperar o crescimento após a exposição ao estresse térmico (Figura 3). Diversas evidências na literatura mostram que as sHSPs podem atuar

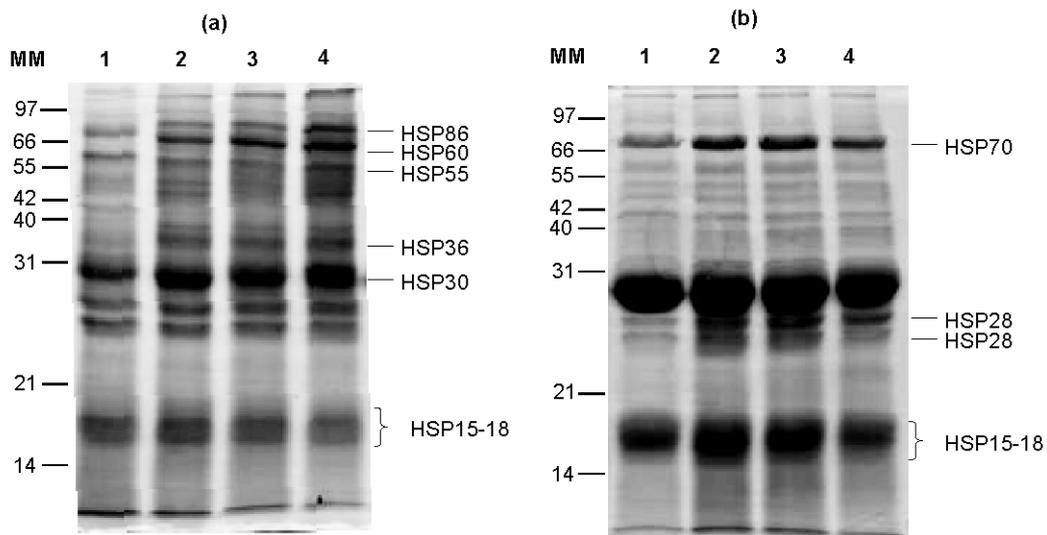


Figura 4. Análise de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida 14 % (SDS-PAGE) em *Pisolithus* sp. sob condições de temperatura de choque térmico. À direita de cada figura encontram-se as HSPs sintetizadas durante as condições de choque térmico nos isolados RS24 (a) e RV82 (b). Em cada canaleta foi adicionada a mesma quantidade de proteína (20 µg) precipitada com 50–70 % de sulfato de amônio: na canaleta 1, o controle; e na 2, 3 e 4, proteínas sintetizadas com 30, 60 e 120 min de choque térmico, respectivamente. À esquerda de cada figura encontram-se as proteínas com massas moleculares (MM) conhecidas. O gel SDS-PAGE foi corado com azul de “Comassie”.

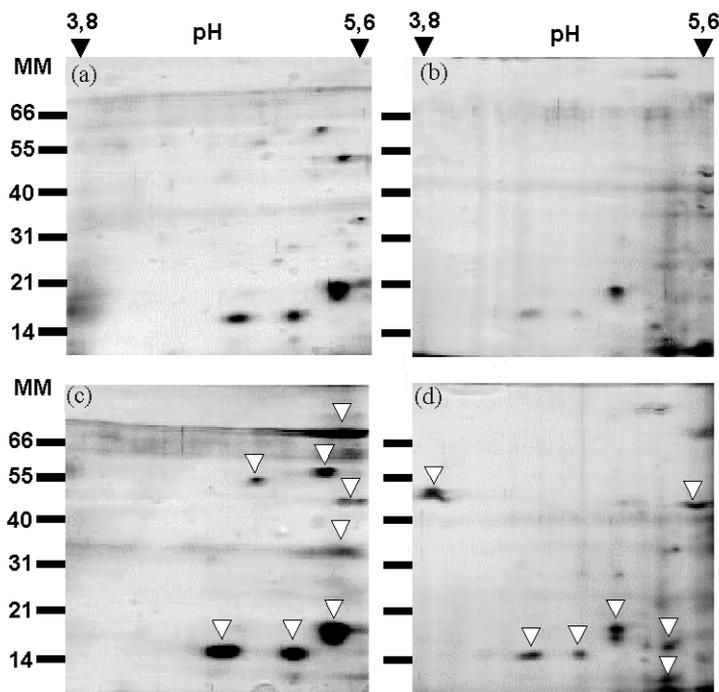


Figura 5. Análise de proteínas em gel de poliacrilamida 13 % (2-D PAGE) em isolados de *Pisolithus* sp. sob condições de temperatura ótima (a e c) e temperatura de choque térmico (b e d) de cada isolado por 60 min de exposição. As letras a e b são referentes ao isolado RV82, e as letras c e d, ao isolado RS24. As barras à esquerda de cada gel identificam as proteínas de massas moleculares conhecidas, com os respectivos valores. Acima desta figura é identificado o intervalo de pH resultante da focalização isoeletrica das proteínas. Em cada gel foi adicionada a mesma quantidade de proteínas (60 µg). As setas indicam as proteínas sintetizadas em condição de temperatura de choque térmico de cada isolado. Os géis foram corados com nitrato de prata, segundo Blum et al. (1987).

como chaperonas moleculares, ligando-se e impedindo a agregação de proteínas sensíveis ao calor durante condições de estresse por altas temperaturas (Vierling, 1991; Lee & Vierling, 2000; Eifert et al., 2005; Pivovarova et al., 2005). Estudos *in vitro* têm demonstrado que sHSPs impedem a formação de agregados de outras proteínas em altas temperaturas, por meio de um mecanismo independente de ATP (Jakob et al., 1993; Kim et al., 1998; Lee & Vierling, 2000). Experimentos realizados com sHSPs, em vários organismos, têm sugerido que essas proteínas estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (Cooper & Ho, 1987; Vierling, 1991). Por sua vez, as proteínas de alta massa molecular são responsáveis pela reativação de proteínas desnaturadas por algum tipo de estresse. Embora o mecanismo de ação dessas proteínas ainda não seja bem conhecido, estudos *in vitro* têm demonstrado que elas são dependentes da hidrólise de ATP (Glover & Lindquist, 1998). Os estudos também têm demonstrado que essas HSPs se acumulam em condições de choque térmico e que a indução dessas proteínas está associada positivamente com a aquisição de termotolerância em vários organismos, incluindo fungos filamentosos (Plesofsky-Vig & Brambl, 1985, 1993).

As alterações bioquímicas que ocorrem durante a exposição de células a altas temperaturas ainda não são conhecidas por completo. No entanto, a síntese de proteínas de estresse, especialmente as HSPs, parece ser um dos principais mecanismos de defesa da maioria dos organismos na tolerância a estresses transientes, que não comprometem a integridade das estruturas celulares (Neidhardt et al., 1984; Vierling, 1991; Feder & Hofmann, 1999; Sun et al., 2002; Sanmiya et al., 2004; Eifert et al., 2005; Pivovarova et al., 2005). Na literatura, outros mecanismos adicionais de tolerância têm sido relatados em microrganismos, a exemplo do acúmulo de trealose após exposição ao choque térmico (Ferreira et al., 2006). Nos fungos ectomicorrízicos analisados neste trabalho, pode-se inferir que o mecanismo de termotolerância que leva à síntese de HSPs está associado com a capacidade de recuperação do crescimento desses fungos após a condição de temperatura subletal.

CONCLUSÕES

1. Os fungos ectomicorrízicos estudados apresentaram respostas diferenciadas em relação ao crescimento micelial quando expostos a temperaturas supra-ótimas; os dois isolados de *Pisolithus* sp., RS24 e RV82, mostraram-se mais tolerantes a altas temperaturas, quando comparado com o isolado de *Paxillus involutus*.

2. Os isolados de *Pisolithus* sp. diferem quanto à síntese de proteínas de estresse no que se refere à

síntese de putativas HSPs de alta e de baixa massa molecular. Em resposta ao choque térmico, o isolado RV82 sintetiza, preferencialmente, as dos grupos HSP70, HSP28 e HSP26 e as HSP15-18, enquanto o isolado RS24 sintetiza as dos grupos de HSP86, HSP60, HSP55 e HSP35 e as HSP12-18.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (bolsa de estudo) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro (Projeto CAG nº 128/99); ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio institucional.

LITERATURA CITADA

- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- COOPER, P. & HO, T.H.D. Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.*, 84:1197-1203, 1987.
- EDKINS, A.L.; LUDEWIG, M.H. & BLATCH, G.L. A *Trypanosoma cruzi* heat shock protein 40 is able to stimulate the adenosine triphosphate hydrolysis of heat shock protein 70 and can substitute for a yeast heat shock protein 40. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, 36:1585-1598, 2004.
- EIFERT, C.; BURGIO, M.R.; BENNETT, P.M.; SALERNO, J.C. & KORETZ, J.F. N-terminal control of small heat shock protein oligomerization: Changes in aggregate size and chaperone-like function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1748:146-156, 2005.
- FEDER, M.E. & HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 61:243-282, 1999.
- FERREIRA, A.S.; TÓTOLA, M.R. & BORGES, A.C. Physiological implications of trehalose in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. under thermal stress. *J. Therm. Biol.*, (available online) September 2, 2006.
- FERREIRA, A.S.; TÓTOLA, M.R.; KASUYA, M.C.M.; ARAUJO, E.F.; & BORGES, A.C. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithus* sp. *J. Therm. Biol.*, 30:595-602, 2005.
- GLOVER, J.R. & LINDQUIST, S. Hsp 104, Hsp 70, and Hsp 40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94:73-82, 1998.

- HELM, K.W.; LEE, G.J. & VIERLING, E. Expression and native structure of cytosolic class II small heat-shock proteins. *Plant Physiol.*, 114:1477-1485, 1997.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G. & MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.*, 97:977-984, 1991.
- HSIEH, M.H.; CHEN, J.T.; JINN, T.L.; CHEN, Y.M. & LIN, C.Y. A class of soybean low molecular weight heat shock proteins. *Plant Physiol.*, 99:1279-1284, 1992.
- JAKOB, U.; GAESTEL, M.; ENGEL, K. & BUCHNER, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.*, 268:1517-1520, 1993.
- JENNINGS, D.H. *Stress tolerance of fungi*. New York, Marcel Dekker, 1993.p.45-68.
- JINN, T.L.; YEH, Y.C.; CHEN, Y.M. & LIN, C.Y. Stabilization of soluble proteins *in vitro* by heat shock proteins-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 30:463-469, 1989.
- KIM, R.; KIM, K.K.; YOKOTA, H. & KIM, S.H. Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95:9129-9133, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- LEE, G.J. & VIERLING, E. A small heat shock protein cooperate with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.*, 122:189-197, 2000.
- LEVITT, J. Chilling, freezing and high temperature stresses. In: *Responses of plants to environmental stresses*. 2.ed. New York, Academic Press, 1980. p.421-447
- LIN, C.Y.; ROBERTS, J.K. & KEY, J.L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.*, 74:152-160, 1984.
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E.A. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 22:631-677, 1988.
- LINDQUIST, S. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:1151-1191, 1986.
- MANS, R.J. & NOVELLI, G.D. Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94:48-53, 1961.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.*, 59:153-163, 1969.
- MOHSENZADEH, S.; SAUPE-THIES, W.; STEIER, G.; SCROEDER, T.; FRACELLA, F.; RUOFF, P. & RENSING, L. Temperature adaptation of house keeping and heat shock gene expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, 25:31-43, 1998.
- NEIDHARDT, F.C.; VANBOGELEN, R.A. & VAUGHN, V. The genetic and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 18:295-329, 1984.
- O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007-4021, 1975.
- OBERSON, J.; RAWYLER, A.; BRÄNDLE, R. & CANEVASCINI, G. Analysis of the heat-shock response displayed by two *Chaetomium* species originating from different thermal environments. *Fungal Genet. Biol.*, 26:178-189, 1999.
- PIVOVAROVA, A.V.; MIKHAILOVA, V.V.; IVAN S. CHERNIK, I.S.; CHEBOTAREVA, N.A.; LEVITSKY, D.I. & GUSEV, N.B. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 331:1548-1553, 2005.
- PLESOFSKY-VIG, N. & BRAMBL, R. Heat shock proteins in fungi. In: JENNINGS D.H., ed. *Stress tolerance of fungi*. New York, Marcel Dekker, 1993. p.45-68.
- PLESOFSKY-VIG, N. & BRAMBL, R. Heat shock response of *Neurospora crassa*: Protein synthesis and induced thermotolerance. *J. Bacteriol.*, 162:1083-1091, 1985.
- QUEITSCH, C.; HONG, S.W.; VIERLING, E. & LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12:479-492, 2000.
- SANCHEZ, Y. & LINDQUIST, S. Hsp 104 required for induced thermotolerance. *Science*, 248:1112-1115, 1990.
- SANCHEZ, Y.; TAULIEN, J.; BORKOVICH, K.A. & LINDQUIST, S. Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, 11:2357-2364, 1992.
- SANMIYA, K.; SUZUKI, K.; EGAWA, Y. & SHONO, M. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Letters*, 557:265-268, 2004.
- SCHLESINGER, M.J.; ALIPERTI, G. & KELLEY, P.M. The response of cells to heat shock. *Trends Biochem. Sci.*, 1:222-225, 1982.
- SCHÖFFL, F.; PRÄNDL, R. & REINDL, A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.*, 117:1135-1141, 1998.
- SUN, W.; MONTAGU, M.V. & VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1577:1-9, 2002.
- VIERLING, E. Roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 42:579-620, 1991.