



Correlação entre termotolerância e o marcador HSP70 em *Curvularia pallescens*.

Eloá Mangabeira Santos, Luis Felipe da Sailva Xavier, Amanda Souto Machado, Henrique Maia Valério

Introdução

Na natureza, a maioria das plantas desenvolvem relações simbióticas com fungos endófitos que lhes proporcionam condições abióticas favoráveis e tolerância ao estresse biótico [1]. Também há condições de temperaturas extremas e outras tensões tais como condições hídricas desfavoráveis, que promovem a ativação da maquinaria de transcrição e tradução para ativar a síntese de proteínas de choque térmico (heat shock proteins - HSPs)[2]. Em condições de estresse do tipo choque térmico ou hipóxia, a expressão da proteína HSP é aumentada para proteger a célula estabilizando os peptídeos com erro de enovelamento ou não enovelados, dando condições à célula para reparo ou possibilitando novo enovelamento das proteínas danificadas [3].

Proteína de choque térmico 70 (HSP70) tem desempenhado um papel fundamental na indução de tolerância térmica em muitos sistemas biológicos. Síntese elevada de HSP70 em resposta a estresses diversos tais como calor, anóxia, isquemia, etanol e metais pesados têm sido correlacionada com a proteção contra o estresse posterior mais severo e tolerância cruzada a tensões diferentes [4,5].

Portanto, o aprofundamento dos conhecimentos acerca da HSP é essencial para que além de utilizá-la como marcador inicial de injúrias, se possa compreender melhor os mecanismos de defesa exercidos pelos fungos endófitos associados às plantas sob condições adversas.

Material e métodos

A. Descrição do fungo

Foi utilizado o fungo da família Pleosporaceae, o *Curvularia pallescens* Boedijn (fig. 1A), da coleção de fungos endófitos pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Montes Claros. Este endófito foi isolado da espécie arbórea *Goniorrhachis marginata* Taub., uma espécie arbórea da família das Leguminosae-Caesalpinioideae, de nome popular Itapicurú, localizadas no Parque Estadual da Mata Seca (PEMS/IEF-MG) no município de Manga-MG.

B. Crescimento em diferentes temperaturas

Foi realizado um repique da colônia de 6cm de diâmetro e será avaliado o crescimento do fungo cultivadas em meio contendo o Agar Batata Dextrose (ABD) em diferentes temperaturas: 25 °C , 30 °C e 40 °C. O crescimento será medido aos 3, 5, 10 e 15 dias.

C. Extração de DNA

Para iniciar a extração do DNA foi triturada a biomassa que cresceu em Caldo Sabouraud Dextrosado em nitrogênio líquido até formar um pó, que em seguida transferiu-se para tubos de microcentrifuga onde se adicionou 1mL de tampão de extração.

D. Eletroforese

O gel de agarose 1% (p/v) e tampão TBE 1x (Tris/ ácido Bórico/ EDTA) foi corrido por 1 hora em cuba horizontal e posteriormente os géis foram corados com brometo de etídio (10µM/µL) e visualizados sob luz UV para verificação da integridade e pureza do DNA e logo após armazenados a - 20 °C.



E. Amplificação da Sequência Codificadora HSPs

A amplificação da sequência do gene codificador de termotolerância, utilizou seqüências de genes marcadores, HSP70 (213pb) primer1: 5'-CAGTCGATGGGACCAGCCGTC. Primer 2: 5'-CAGCTGTTAGTTCGACCTCCTC-3' obtidos a partir de projetos de sequenciamento de genomas (MORGENSTERN *et al.*, 2012). As amplificações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems; modelo 96-well termo cycler) com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, para temperatura de anelamento será avaliado as temperaturas de 54°C, 54,5°C, 55°C e 56°C por 2 minuto e 72°C por 1,30 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Resultados e Discussão

A. Crescimento da *Curvularia pallescens* em diferentes temperaturas

O fungo cresceu em toda a placa. Observou-se que a elevação de temperatura influenciou no crescimento do fungo, quando comparadas as temperaturas de 25°C com 78,05cm (fig.1B) e 30°C com 79,13cm (fig.1D) nesta obteve um crescimento maior no fim dos 15 dias. Já em temperatura de 40°C (fig.1B) o crescimento foi lento tendo a colônia alcançado 6,16 cm (fig.1E), e inicialmente percebeu-se que houve crescimento vertical do fungo na placa e a coloração apresentou gradativamente mais escurecida em relação com o aumento de temperatura. De acordo com Mustafa *et al* [1], nos estudos com a *Curvularia protuberata* foi observado que na cultura ocorreu a produção de uma proteína fúngica com pigmento de melanina, resultado este que pode estar envolvido com tolerância térmica.

B. Avaliação das Amplificação da Sequência Codificadora HSPs

A maioria dos amplicons com seqüências conhecidas eram homólogos a genes HSP70. A fig.1C apresenta a expressão da proteína de choque térmico da *Curvularia pallescens* em que melhor temperatura testada para anelamento foi a 54,5°C com 300pb, na temperatura de 54°C não obteve expressão, enquanto que na temperatura de 55°C e 56°C apresento outras bandas inespecíficas. Esse resultado está envolvido em uma relação simbiótica com as plantas e provável proteção contra estresse térmico. Análises do perfil de expressão de alguns genes candidatos sugerem possível envolvimento de osmoprotetoras como trealose, glicina betaína, e taurina na resposta ao estresse de calor [1,6].

Considerações finais

No estudo observou-se que o fungo endofítico *C. pallescens* possui mecanismos para crescimento em altas temperaturas e que expressa, nestas condições, o gene para proteína de choque térmico (hsp70).

Referências

- [1] MUSTAFA R. *et al.* Roossinck. Teasing apart a three-way symbiosis: Transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.401. 225–230p. 2010
- [2] BORCHIPELLINI C, BOURY-ESNAULT N, VACELET J. Phylogenetic Analysis of the Hsp70 Sequences Reveals the Monophyly of Metazoa and Specific Phylogenetic Relationships Between Animals and Fungi. **Mol. Biol. Evol.** 15(6):647–655. 1998
- [3] RITOSSA F.A. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **Ann Med.** v 24:249p.2008.
- [4] WELCH WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol Rev** ; v 72:1.063p. 2002
- [5] SATO H, YAMAGUCHI M, SHIBASAKI T *et al.* Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. **Biochem Pharm** . v 49.2005.
- [6] MONTERO-BARRIENTOS, M., CARDOZA, R.E., GUTIÉRREZ, S., MONTE, E. The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. **Curr. Genet.** 52, 45–532007



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

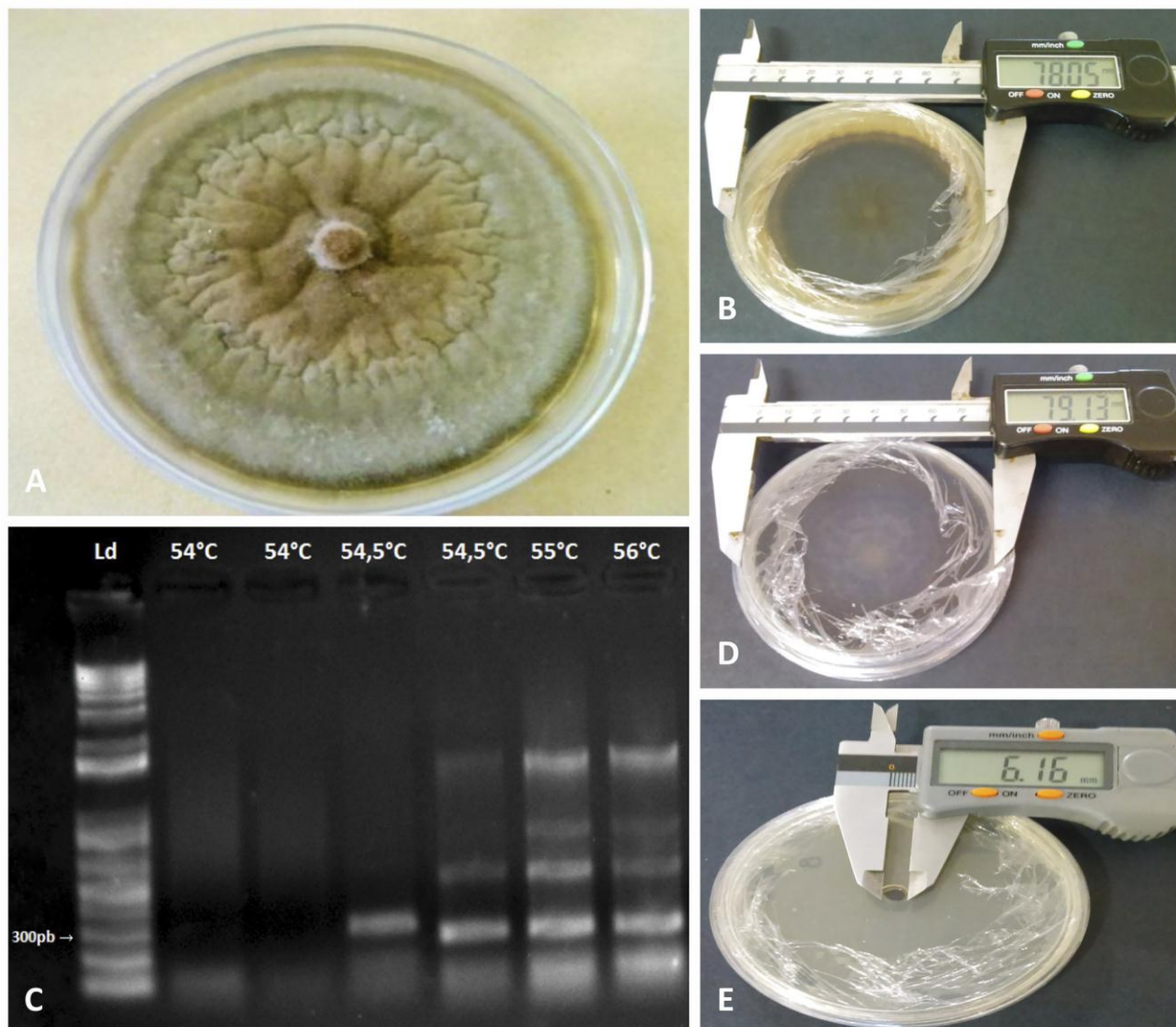


Figura 1: Apresentação da *C. pallescens* em placa na fig.1A (78,05cm), análise do crescimento à temperatura de 25°C fig.1B (78,05cm), na temperatura de 30°C fig.1D, e com temperatura de 40°C fig.1E (6,16cm). A imagem da fig.1C apresenta a imagem em gel de agarose da apresenta a expressão da proteína de choque térmico (HSP70) nas temperaturas de 54°C, 54,5°C, 55°C e 56°C.