

Documentos

ISSB 0104-6187

Novembro, 98

Número, 80



Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente
Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro
Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente
Alberto Duque Portugal

Diretores
*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha
Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres*

Chefias da Agrobiologia
*Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves
Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto
Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto*

DOCUMENTO Nº 80

ISSN 0104-6187

Novembro 98

**Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas
Temperaturas em Plantas**

Jean Luiz Simões de Araújo

Márcia Margis-Pinheiro

Norma Golvea Rumjanek

Seropédica – RJ

1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à:

Embrapa..Agrobiologia

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Avílio Antônio Franco e José Ivo Baldani

*Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix
e/ou Sérgio Alexandre Lima*

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

ARAÚJO, J.L.S. de; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N.G. **Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas.**

Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 27p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 80).

ISSN 0104-6187

1. Planta. 2. Proteína. I. Margis-Pinheiro, M., colab. II. Rumjanek, N.G., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 630

S U M Á R I O

RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
ESTRESSE TÉRMICO E AS PROTEÍNAS HSPS.....	6
ALTAS TEMPERATURAS E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS HSPS EM PLANTAS	8
CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA DAS HSPS.....	9
CARACTERIZAÇÃO DAS HSPS	13
FUNÇÃO DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE HSPS.....	14
AQUISIÇÃO DE TERMO-TOLERÂNCIA PELAS PLANTAS	16
ALGUMAS CONSIDERAÇÕES RELACIONADAS AOS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA SÍNTese DE HSPs	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
REFERÊNCIAS.....	20

Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas

Jean Luiz Simões de Araújo¹

Márcia Margis-Pinheiro²

Norma Golvea Rumjanek³

Resumo

As plantas são submetidas freqüentemente a diferentes estresses ambientais. Em condições tropicais, o estresse provocado pelas altas temperaturas têm merecido destaque, principalmente devido os efeitos deletérios em processos vitais para o desenvolvimento vegetal e consequentemente diminuição dos níveis de produtividade. A resposta ao choque térmico é uma das respostas mais conservadas entre os eucariontes sendo caracterizada pela indução de um grupo de genes específicas, que codificam proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSPs), em detrimento das proteínas sintetizadas em condições normais. Apesar de não ter sido ainda totalmente elucidado o possível papel bioquímico de algumas HSPs, numerosas evidências apontam que existe uma correlação entre a presença das HSPs e a aquisição de termo-tolerância em diversas espécies de plantas. Entretanto, há necessidade do melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta a altas temperaturas, para a seleção e/ou melhoramento de genótipos com capacidade de tolerar esse estresse ambiental. A partir do momento que os genes envolvidos com essa característica sejam conhecidos, há atualmente, a possibilidade de transferência de genes entre diferentes espécies e desta forma introduzir genes

¹ Bolsista de Pós-Graduação, Embrapa Agrobiologia.

² Professora adjunto – Laboratório de genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

³ Pesquisadora Ermbrapa Agrobiologia, Caixa postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica-RJ.

exógenos e/ou alterar a expressão dos genes endógenos, de forma a manter os níveis de produtividade, mesmos em condições de estresses como altas temperaturas.

Introdução

O estresse promovido por temperaturas elevadas pode ocasionar inúmeras alterações bioquímicas e metabólicas a célula incluindo: inativação enzimática em diversas vias metabólicas, redução da atividade fotossintética no cloroplasto e diminuição da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Em plantas, os dois maiores sítios de danos decorrentes das altas temperaturas são o cloroplasto e a mitocôndria (Blum, 1988, citado por Vierling & Nguyen, 1990). Muitas reações do processo de fotossíntese e respiração estão associadas com as membranas dessas organelas; a síntese de ATP, por exemplo, está diretamente relacionada com o transporte unidirecional de prótons através do sistema de membranas (Brauer et al., 1991). Assim, quando o tecido é danificado, a permeabilidade da membrana aumenta, alterando a difusão de eletrólitos (Chen et al., 1982), o que resulta em uma diminuição no rendimento da síntese de ATP. Além do efeito sobre a membrana, a inativação enzimática decorrente da exposição a altas temperaturas tem sido considerada responsável pela redução do crescimento da planta (Levit, 1980, citado por Chen et al., 1982) A conformação estável das proteínas é resultado da soma de um grande número de interações fracas não covalentes incluindo pontes de hidrogênio, forças de van der Waal, ligações iônicas e interações hidrofóbicas. Todas estas interações são afetadas de maneira complexa por condições ambientais, incluindo altas temperaturas, determinando a desnaturação e a degradação enzimática e consequentemente, provocando alteração ou perda da atividade catalítica (Daniel et al., 1996).

O impacto provocado por altas temperaturas em processos complexos como a fotossíntese e respiração, é dependente do genótipo da planta e condições de cultivo (Chaisompongpan et al., 1990). As plantas adaptadas a regiões com diferentes regimes de temperatura, apresentam consideráveis alterações na fotossíntese, fluidez das membranas, estatus de água, resposta

estomatal, fertilidade do pólen e síntese de proteínas diante das alterações do regime térmico (Heuss-LaRosa et al., 1987). Além disso, de maneira geral dificilmente o estresse provocado por altas temperaturas ocorre de maneira isolada em condições de campo, pelo contrário, freqüentemente está associado com o estresse hídrico, o que acarreta uma diminuição da evapotranspiração e consequentemente elimina um dos principais mecanismos através do qual a planta diminui a temperatura da folha (Blum, 1985; Howarth & Ougham, 1993). Assim esses fatores associados resultam na intensificação dos efeitos deletérios decorrentes das altas temperaturas (Trolinder & Shange, 1991).

O presente trabalho tem como objetivo apresentar as diversas contribuições feitas nos últimos anos, relacionadas aos aspectos bioquímicos e moleculares da resposta a altas temperaturas nos vegetais, bem como caracterizar os principais grupos de proteínas envolvidos nesta resposta e traçar um perfil das principais linhas de trabalhos que vêm sendo desenvolvidas nesta área.

Estresse Térmico e as Proteínas HSPs

A resposta celular frente a estresses ambientais, como metais pesados, infecção por patógenos, altas ou baixas temperaturas, anaerobiose, estresse salino, deficiência hídrica, está intimamente relacionada com alterações no padrão de expressão gênica e síntese de proteínas específicas. Entretanto, não obstante o elevado grau de conservação da resposta, há especificidade de síntese protéica de acordo com o tipo de estresse; por exemplo, determinadas proteínas sintetizadas durante estresse térmico não são induzidas por estresse oxidativo provocado por ozônio (EcKey-Kaltenback et al., 1997) ou estresse hídrico (Colmenero-Flores et al., 1997). Foi sugerido, portanto, que a indução destas proteínas ocorra através de uma resposta a mudanças específicas não sendo comum para todos os estresses (Vierling, 1991). Um grupo particular de proteínas denominado proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins-HSPs) tem merecido destaque, principalmente por constituírem uma resposta comum nos mais distintos organismos, sendo conservada ao longo de toda a escala evolutiva. Dessa maneira, esta resposta pode ser observada, desde

arqueobactérias, eubactérias (Lindquist & Graig 1988), fungos, plantas, animais (Vierling 1991) inclusive seres humanos (Rizzo et al., 1998) onde podem estar relacionadas com a resposta do sistema inume.

Além disso, mesmo em relação às proteínas induzidas por choque térmico (HSPs) existem diferenças entre os grupos sintetizados durante distintos tratamentos. As HSPs de 100 kDa, assim como as proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (Low Molecular Weight-LMW HSPs) normalmente não são detectadas na ausência de estresse térmico (Boston et al., 1996, Waters, et al., 1996), ao passo que alguns componentes do grupo de 60, 70 e 90 kDa (HSPs de alto peso molecular) podem ser expressos de forma constitutiva, e têm sua síntese elevada durante o período de estresse. Por outro lado, Pareek et al., (1995) verificaram, em plântulas de arroz, que as HSPs 104 e mesmo HSPs de 90 kDa foram induzidas como consequência de estresse salino, hídrico, baixas temperaturas, e aplicação de ácido abscísico exógeno, não sendo detectadas em condições normais.

O conjunto de resultados obtidos até o momento sugerem que as HSPs de alto peso molecular possuem uma função celular básica, mesmo na ausência de estresse, enquanto as LMW HSPs estão diretamente relacionadas com a sobrevivência e recuperação de estresses térmicos, assim como processos específicos de desenvolvimento (Waters et al., 1996).

As vias metabólicas que são essenciais para a aquisição de tolerância a estresse hídrico levam, invariavelmente, à síntese de metabólicos osmoticamente ativos e proteínas específicas que atuam no controle do fluxo de água, na remoção de radicais livres e renaturação de proteínas (Bolnet & Jensen, 1996). Apesar de não ter sido ainda completamente elucidada a base molecular e fisiológica para tolerância a altas temperaturas, numerosas linhas de evidências apontam a síntese de HSPs como um componente importante na aquisição de termo-tolerância e termo-adaptação (Lin et al., 1984; Huss-LaRosa et al., 1987; Sivaramakrishnan et al., 1990). De acordo com Parsell & Lindquist (1993), três observações fortalecem esta hipótese: (a) a indução de HSPs tem sido caracterizada como uma resposta extremamente rápida e intensa; (b) a indução de HSPs reflete uma condição de estresse para o

organismo e ocorre a temperaturas variadas de acordo com o organismo; e (c) a síntese de HSPs está correlacionada com a indução de tolerância a extremos de temperatura numa ampla variedade de células e organismos. Desta forma, assim como na aquisição de tolerância ao estresse hídrico, a síntese de determinados metabólicos pode conferir capacidade de tolerância a altas temperaturas.

Altas Temperaturas e Regulação da Expressão dos Genes das HSPs em plantas

Um outro aspecto importante da resposta a altas temperaturas, esta relacionado com os mecanismos de ativação dos genes que codificam as HSPs. Numerosas evidências, mostram que muitas HSPs em plantas tem sua síntese regulada a nível transcripcional em resposta ao estresse térmico (Gurly & Key, 1991; Mager & Kruijff, 1995). No entanto , ao contrário do que ocorre nos microrganismos onde a transcrição desses genes é mediada pelo fator sigma, que interage com a polimerase de RNA, em plantas a resposta dos genes para síntese de HSPs, é intermediada por proteínas específicas denominadas fatores de transcrição (Heat Shock Factors-HSFs). Os HSFs ligam-se a pequenos segmentos de DNA altamente conservados, os elementos de ação em cis (Heat Shock Elements-HSEs), presentes na região promotora do gene, antes da região TATA box, (Mager & Kruijff, 1995; Mager & Ferreira, 1993; Waters et al., 1996). Em contraste ao alto grau de conservação da seqüência dos HSEs na região promotora, os HSFs de diferentes espécies apresentam pouca similaridade em termos de seqüência de aminoácidos (Takahashi et al., 1992). Em plantas, múltiplas famílias gênicas codificam a síntese dos HSFs. Esses genes mostram grande similaridade estrutural no domínio de ligação aos HSEs, entretanto, fora desta região, são totalmente diferentes. Em tomate, três genes codificando HSFs já foram clonados, enquanto em soja e *Arabidopsis* mais de quatro já foram isolados (Waters et al., 1996). A presença de múltiplos HSFs assim a como a regulação diferenciada sugerem que estes fatores de transcrição possam regular a resposta dos genes para síntese de HSPs diante de outros sinais, além de

altas temperaturas. Apesar dos sinais que induzem a síntese dos HSFs ou sua capacidade de ligar-se ao DNA serem específicos para cada HSF, a maneira pela qual estes sinais resultam na ativação dos HSFs ainda não é conhecida (Mager & Kruijff, 1995). Entretanto, o mecanismo de ativação desses genes é conservado para todos os eucariontes (Waters et al., 1996) e o modo de interação entre os HSFs e HSEs em plantas superiores é similar ao que ocorre em células animais. Os HSFs inativos estão presentes em concentrações suficientes na célula e são rapidamente ativados através de modificações pós-tradução em resposta a elevação da temperatura. Estas modificações incluem a formação de oligômeros de HSFs e aquisição da capacidade de ligação aos HSEs, e dessa maneira, proporcionam um aumento extremamente rápido na transcrição dos genes das HSPs (Lindquist & Craig, 1988). Almoguera et al., (1997) sugeriram, a partir estudos de mutagênese nos HSEs de tabaco, a coexistência de dois mecanismos de regulação da expressão das LMW HSPs, um dependente e outro independente dos HSFs, controlando a expressão dos genes em diferentes estágios durante a embriogenese da planta. Por outro lado, Prandl et al., (1998) demonstraram que a superexpressão do HSF3 em plantas transgênicas de Arabdopsis causa a síntese de HSPs mesmo a 250 C e promove um aumento da termo-tolerância.

Classificação e ocorrência das HSPs

Diversas HSPs têm sido descritas em eucariontes, sendo classificadas de acordo com seu peso molecular (kDa), em diferentes grupos: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, e um complexo grupo com peso entre 15 e 30 kDa, designada como HSPs de baixo peso molecular (LMW HSPs) (Vierling 1991).

Em animais, insetos e leveduras, a síntese de HSPs de alto peso molecular (60 a 110 kDa) é predominante, enquanto em plantas apesar destas classes também serem sintetizadas, grande parte da capacidade de tradução é direcionada para a síntese de LMW HSPs (Jinn et al., 1993; Vierling, 1991). Em contraste com alguns animais onde foram identificadas apenas 4 LMW HSPs diferentes, as plantas podem sintetizar de 12 a 27 polipeptídios distintos, dependendo da espécie (Mansfield et al., 1987; DeRocher et al., 1991).

Análises genéticas indicam que em plantas, as LMW HSPs são codificadas por seis famílias de genes bem definidas. Cada família codifica proteínas localizadas em compartimentos celulares diversos, incluindo citoplasma (classes I e II), cloroplasto (classe III), endomembranas (classes IV e V) e mitocôndria (classe VI) (LaFayette et al., 1996; Waters et al., 1996). Análises evolucionárias sugerem que estas famílias surgiram por duplicação gênica e divergiram antes da disseminação das angiospermas (Waters et al., 1996). Estas proteínas apresentam uma considerável heterogeneidade em ponto isoeletroico, peso molecular, estabilidade e nível de expressão (Lunn et al., 1993). Os genes que codificam LMW HSPs de diversas classes já foram isolados de diversas espécies vegetais incluindo: trigo (McEwain & Spiker 1989), arroz (Lee et al., 1995), milho (Nieto-Sotelo et al., 1990; Jorgensen & Nguyen 1994), ervilha (Lenne et al., 1995), soja (LaFayette et al., 1996) dentre outras.

Em plantas, o grupo das LMW HSPs tem merecido atenção especial, devido principalmente a sua abundância (podendo alcançar 1 a 2% da proteína total da folha) e diversidade (Waters et al., 1996; Lin et al., 1984., Chou et al., 1989). Numerosos trabalhos têm investigado a síntese destas proteínas e sua relação com a aquisição de termo-tolerância entre diferentes espécies, e dentro da mesma espécie. Park et al., (1996) mostraram que a alteração no padrão de síntese de LMW HSPs em diferentes variedades de *Agrostis palustries*. Na variedade tolerante, a indução de três HSPs foi diretamente associada com a adaptação a altas temperaturas. Em estudos realizados com linhagens de milho contrastantes em relação a tolerância a estresse hídrico e térmico, verificou-se diferenças no padrão de síntese de HSPs. Uma HSP de 45 kDa foi observada apenas nas plantas tolerantes (Ristic et al., 1991). Também em milho, Jorgensen et al. (1992) através da tradução *in vitro* do RNAm obtido de plantas estressadas, observaram maior diversidade de LMW HSPs em linhagens mais tolerantes. Análises genéticas posteriores revelaram polimorfismo e diferenças quantitativas na síntese de HSPs em linhagens com diferentes níveis de tolerância a altas temperaturas (Jorgensen & Nguyen, 1995). Além disso, diferenças no padrão de síntese de HSPs dentro da mesma

espécie foram também observadas em trigo (Weng & Ngyuen, 1992), tomate (Feder & O`Connel, 1990) e sorgo (Jorgensen et al., 1992). Em todos estes casos, mesmo com a utilização de diferentes técnicas, foi observado que a presença de HSPs específicas e/ou o aumento dos níveis de determinados grupos de HSPs estão sempre associados com os genótipos mais tolerantes a altas temperaturas ou outros estresses ambientais como deficiência hídrica. Em outros organismos também se observa comportamento semelhante, por exemplo, em leveduras a indução de HSP 104 correlacionou positivamente com a tolerância a altas temperaturas e elevadas concentrações de etanol, no entanto, não teve efeito sobre a tolerância a altos níveis de metais pesados (Sanchez et al., 1992). De acordo com estes autores, o efeito dos metais pesados sobre a célula é fundamentalmente diferente do produzido por altas temperaturas ou etanol.

Apesar da grande maioria das LMW HSPs serem sintetizadas apenas em condições de estresse, também já foi observada a expressão de LMW HSPs específicas em condições normais, durante determinadas fases de desenvolvimento da planta, principalmente em dicotiledôneas (Mansfield & Key 1987). Foi também observada a expressão dessas proteínas durante fases específicas do desenvolvimento reprodutivo ou vegetativo (Coca et al., 1994; Almoguera et al., 1992), bem como durante a embriogenese zigótica em tabaco (Almoguera et al., 1997)

Os demais grupos também foram muito estudados em diversos organismos, incluindo plantas. As HSPs de 60 kDa foram originalmente identificadas como uma proteína capaz de se ligar a ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco) no cloroplasto. Nos eucariontes são proteínas mitocondriais e cloropásticas codificadas pelo núcleo. Apesar de terem sido observadas em praticamente todas as espécies de plantas. Poucas proteínas homólogas a HSP60 foram descritas em outros compartimentos celulares em eucariontes (Vierling, 1991). Em milho, os níveis de HSP60 aumentam de duas a três vezes, quando as plântulas são expostas a 4 horas de estresse térmico (Prasad & Hallberg, 1989). Prasad & Stewart (1992), isolaram um clone de cDNA que codifica HSP60 de *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* expresso em

altos níveis durante a germinação das sementes, além de também ser induzido por altas temperaturas. Durante o processo de biogênese da mitocôndria, a presença desta HSP60 é necessária como auxiliar no transporte rápido de protéicas oligoméricas, codificadas pelo núcleo que precisam chegar até a matriz mitocondrial (Cheng et al., 1990).

Os genes que codificam HSP do grupo de 70 kDa (HSP70) foram os primeiros a serem isolados e extensivamente estudados em diversos organismos. São proteínas presentes em diversos compartimentos celulares, no citoplasma e lúmen do retículo endoplasmático. Diversas evidências têm mostrado que este grupo de proteínas é codificado essencialmente por oito genes compreendidos em quatro grupos ou famílias de genes, com uma identidade a nível de nucleotídios entre 50 a 96% (Vierling 1991). Os membros da multi-família gênica são diferentemente expressos. Além disso, os eucariontes também apresentam genes de HSP70 que não exibem aumento de expressão durante o período de estresse. Duck et al., (1989) verificaram em *Lycopersicum esculentum*, a expressão dessas proteínas em órgãos vegetativos e reprodutivos mesmo na ausência de estresse. Enquanto em espinafre, Guy & Li, (1998) confirmaram a existência de uma família multigênica com pelo menos 12 membros, que apresentam diferenças estruturais na organização das seqüências codantes e não-codantes de cada gene, bem como no padrão de expressão nas diferentes organelas celulares, tecidos e condições abióticas. Este estudo ilustra a complexidade e, consequentemente, a dificuldade de interpretação do papel de qualquer um dos membros da família, quando analisado isoladamente. As HSPs 70 foram altamente conservadas entre todos os organismos durante todo o período evolutivo, apresentando em torno de 65% de similaridade entre si. Dentre todas as proteínas conhecidas até o momento as HSP70 são consideradas as mais conservadas durante o período evolutivo (Craig et al., 1993; Vierling, 1991).

Assim como HSPs 70, os membros da classe da HSP90 também são altamente conservados nos diversos organismos, sendo um grupo de proteínas abundantes principalmente no citoplasma (Craig et al., 1993). Apesar de não haver muitos estudos específicos com plantas, genes que codificam proteínas

homólogas à HSP 90 em milho, *Brassica* e *Arabidopsis* já foram isolados. As HSPs 90 são facilmente identificadas através de síntese de proteína *in vivo* com aminoácidos marcados com radioisótopos. Em outros eucariontes, as HSPs 90 são abundantes em condições normais mas tem sua síntese aumentada durante o estresse (Vierling, 1991). Em *S. cerevisiae*, apesar da HSP90 ser constitutivamente expressa em nível basal baixo, há um aumento de 10 a 15 vezes após indução da síntese durante o período de estresse térmico (Craig et al., 1993).

Muitos eucariontes, incluindo plantas, sintetizam uma classe de HSP de alto peso molecular entre 100 a 110 kDa, as quais não são geralmente, detectadas em condições normais de crescimento e o aumento da síntese parece ser limitada apenas às primeiras horas seguidas ao estresse (Vierling, 1991). No entanto, Singla & Grover (1994) verificaram que em arroz, altos níveis de HSP 104 persistem por quase 16 horas após as plantas terem sido submetidas a 45°C por 24 horas, ou até 4 horas, após quatro horas de estresse a 45°C. Além disso, os genes que codificam HSP 101 isoladas de plantas de soja e de *Arabidopsis* complementam leveduras mutantes com deleção no gene da HSP 104, capacitando-as novamente ao crescimento sob altas temperaturas (Lee et al., 1994; Schirmer et al., 1994). Entretanto, diversos autores verificaram que apenas a síntese de HSP 104 não é suficiente para a termo-tolerância, sendo necessários a presença de outros componentes (revisado por Vierling, 1991).

Caracterização das HSPs

Em contraste ao alto grau de similaridade verificado para HSP70, as LMW HSP são bem menos similares. No entanto, uma análise de seqüência de LMW HSP de representantes de dicotiledôneas (*Glycine max* e *Arabidopsis thalina*) e monocotiledôneas (*Triticum aestivum*) revela que as LMW HSP são mais diretamente relacionadas com membros da mesma classe, do que com outras HSPs da mesma espécie (Waters et al., 1995). A comparação entre as seqüências de aminoácidos de duas LMW HSPs de ervilhas pertencente classe I (HSP 18,1 e HSP 17,9) com a seqüência de LMW HSPs de classe I, isoladas

de 9 diferentes espécies, demonstrou similaridade entre essas proteínas de 80,1 a 92,9% (DeRocher et al., 1991). De acordo com Lee et al., (1995) e Jorgernsen & Guyer (1994) genes de LMW HSPs isolados de arroz também apresentam elevado grau de similaridade, podendo variar entre 66 e 87% quando comparada a seqüência de aminoácidos de LMW HSPs isolado de 7 espécies diferentes. McElwain & Spiker, (1989) isolaram um gene de trigo que codifica HSP 16,9 kDa classe I, que apresentou similaridade, com LMW HSPs de soja, de 74% a nível de DNA e de 83% a nível de aminoácido. Esta observação corrobora a hipótese de que as famílias de LMW HSPs, surgiram de duplicações gênicas relativamente antigas, seguidas por divergências subsequentes. Estas duplicações gênicas que proporcionaram o surgimento de múltiplas famílias gênicas de LMW HSPs, provavelmente ocorreram antes da diferenciação entre mono e dicotiledôneas a pelo menos 150 milhões de anos (Doyle & Donoghue, 1993).

Função dos principais grupos de HSPs

A presença de diferentes famílias de HSPs em mais de um compartimento celular, pode indicar que essas proteínas participam em processos bioquímicos básicos, entretanto, a função exata das diferentes HSPs ainda não foi determinada (Vierling, 1991). Diversos autores tem mostrado a correlação da síntese de HSP com aquisição de tolerância a estresse ambientais tais como altas temperaturas.

A conservação dessas proteínas durante todo o processo evolutivo, também sugere sua participação em processos fundamentais no funcionamento da célula em altas temperaturas (Cooper & Ho, 1983). Estudos que mostram participação das HSPs em processo celulares básicos na ausência de estresse, fornecem informações em relação às suas funções durante o período de estresse.

Recentes estudos demonstram que HSP 90, HSP 70 e HSP 60 facilitam uma grande diversidade de processos importantes tais como: correta conformação protéica, transporte protéico através de membranas, assimilação de proteínas oligoméricas e modulação de atividades receptoras (Wu et al.,

1993, Vierling, 1991). Como discutido anteriormente, as proteínas do grupo da HSP100 são essenciais para aquisição de termo-tolerância em leveduras (Sacher et al., 1992) e genes de plantas homólogos a HSP 100 complementam deleções em leveduras, além de serem críticos para termo-tolerância em plantas (Sanchez & Lindquist, 1990; Lee et al., 1994; Schirmer et al., 1994).

Estudos realizados com soja revelaram que existe uma correlação entre a manutenção da fosforilação oxidativa e a presença de HSPs entre 15 e 30 kDa, mesmo quando mitocôndrias são submetidas a 42,50 C (Chou et al., 1989). Clarke & Critchley (1994), observaram que em, plantas C4 (sorgo, milheto e *Urochloa panicoides L.*), a inibição da síntese protéica pelo tratamento com ciclohexamida, durante o choque térmico, promove uma diminuição drástica na eficiência da fotossíntese, sugerindo que a síntese de HSP tem um papel de proteção no cloroplasto. Por outro lado, duas classes de LMW HSPs são capazes de proporcionar a renaturação e retomada da atividade enzimática *in vitro*, podendo funcionar como moléculas “chaperones” (Lee et al., 1995). O termo “moléculas chaperones” tem sido utilizado para designar um grupo específico de proteínas que interagem com proteínas desnaturadas com objetivos diversos, tais como: facilitar a conformação correta de polipeptídios recém sintetizados, promover a formação e manutenção de conformações protéicas específicas, modular a atividade protéica, facilitar o transporte protéico através das membranas mantendo o substrato na forma desnaturada, prevenir agregação ou desnaturação protéica, além de promover a sua renaturação. Estas últimas funções são particularmente importantes para as células submetidas a altas temperaturas (Boston et al., 1996), sendo que muitas evidências atuais sugerem estas funções para as HSPs. Dessa maneira, proteínas recombinantes sintetizadas a partir de cDNA de LMW HSPs isolados de plantas, foram capazes de promover a reativação de enzimas desnaturadas quimicamente, evitar a agregação e a inativação induzida pelo calor, além de reverter a inativação do substrato protéico. Baseado nestas observações, Waters et al., (1996) sugeriram que as LMW HSPs funcionam *in vivo* como um tipo de moléculas “chaperone”, interagindo particularmente com

proteínas desnaturadas, prevenindo a agregação e inativação irreversível da proteína e desta forma contribuem para o desenvolvimento de termo-tolerância. A atividade como “chaperones” foi inicialmente verificada para os grupos de HSPs de 90, 70 e 60 kDa (Schmitz et al., 1996; Craig et al., 1993; Gething & Sambrook, 1992). No entanto, ao contrário das HSPs de alto peso molecular, as LMW HSPs não requerem ATP ou outro fator para sua atividade como “chaperone” (Jacob et al., 1993; Lee et al., 1995). Recentes pesquisas indicam que quase, se não todas as proteínas celulares interagem com moléculas “chaperones” durante algum período de sua permanência na célula. Aparentemente, diferentes sistemas de “chaperones” são requeridos para síntese, transporte, maturação e degradação de proteínas em todos os compartimentos celulares (Boston et al., 1996).

Aquisição de Termo de Tolerância pelas Plantas

Apesar da capacidade de tolerar altas temperaturas ser um fenômeno complexo e controlado por diversos mecanismos interrelacionados, a diferença na expressão gênica entre plantas sensíveis e plantas tolerantes indicam que a tolerância a determinados estresses como hídrico e térmico é conferida através de mecanismos relacionados com alteração na expressão de genes específicos (Bohnert & Jensen, 1996). A síntese de HSPs tem sido correlacionada com a aquisição de tolerância à altas temperatura (Lin et al., 1984), o que tem proporcionado um considerável interesse sobre o papel das HSPs na tolerância ao calor em vários sistemas biológicos incluindo, mamíferos, insetos, leveduras e plantas (Lindquist, 1986). Lin et al., (1984) observaram que a aquisição de termo-tolerância em soja está relacionada não apenas com a síntese, mas também com a sua localização em organelas como núcleo, mitocôndria, e ribossomos. Enquanto, em trigo, Weng & Nguyen (1992) verificaram que cultivares mais tolerantes a altas temperaturas apresentam diferenças qualitativas e quantitativas na expressão de diversos grupos de HSPs. Diferenças qualitativas na síntese de HSPs também foi observada entre linhagens de milho com níveis diferentes de resistência à seca e a temperaturas altas (Ristic et al., 1991).

Em plântulas de soja foram encontradas várias HSPs associadas seletivamente ao núcleo, à mitocôndria ou à membrana plasmática. Um grupo complexo de HSPs com peso molecular entre 15 a 18 kDa e 70 kDa já foi localizado nesses compartimentos celulares durante o choque térmico (Chou et al., 1989). A localização intracelular de HSPs, depende da temperatura a que as células foram submetidas durante o choque térmico (Lin et al., 1984). A natureza da associação em soja não é conhecida, no entanto, Chou et al., (1989) demonstraram que LMW HSPs (15 a 18 kDa) e possivelmente uma HSP de 70 kDa, quando associadas com a mitocôndria, proporcionaram proteção à fosforilação oxidativa quando a mitocôndria foi submetida a 42°C. Além disso, Heckathorn et al., (1998) verificaram que a presença de LMW HSPs em cloroplastos de tomate protege o fotossistema II da desnaturação e consequentemente proporciona o funcionamento completo da cadeia transportadora de elétrons, durante o choque térmico. Estas evidências sugerem que o papel das HSPs, está relacionado com a proteção da célula, assegurando o funcionamento de processos vitais, sobretudo aqueles envolvidos com a produção de energia durante o período que a planta é submetida a altas temperaturas (Lin et al., 1984). Portanto, as HSPs constituem um componente importante na aquisição de termo-tolerância (Heckathorn et al., 1988)

Estudos realizados com trigo (Vierling & Nguyer, 1990), milho (Ristic et al., 1991) e tomate (Feder & O'Crnell, 1990) demonstraram que podem ocorrer diferenças dentro de cada espécie quanto a síntese e acúmulo de distintas HSPs. Além disso, o padrão de resposta ao calor, no que refere-se à síntese de HSPs é diferente entre as espécies. Comparando a diversidade de HSPs em sorgo e cevada, Clarke & Critchley (1990), observaram que o sorgo, uma planta C4 subtropical, possui maior diversidade de HSPs, se comparada com a cevada, espécie C3 de região temperada. Em ambas as espécies foi verificada a presença de HSPs entre 17 a 24 kDa, associadas à membrana do tilacóide, durante o período inicial do choque térmico. Em raízes de milho, o padrão de síntese protéica é drasticamente alterado após 20 minutos a 40°C, ocorrendo indução da síntese de diferentes HSPs, variando entre 18 a 87 kDa, no

entanto, a síntese normal de proteínas continua, exceto para aquelas produzidas em pequenas quantidades (Cooper & Ho, 1983).

Apesar da expressão de HSPs em condições de laboratório já ter sido estudada extensivamente, poucos estudos enfocaram a resposta ao estresse térmico em plantas intactas, em condições de campo. Burke et al., (1978) trabalhando com algodão em condições de campo, observaram que folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico acumularam polipeptídeos (HSPs) com peso molecular de 100, 94, 89, 75, 60, 58, 37, e 21 kDa, semelhantes aos acumulados após 3 horas a 40°C. Chen et al., (1990) avaliaram o acúmulo de HSP21, tanto a nível de RNAm quanto a nível de proteína, em plântulas intactas de ervilha mantidas em câmara de crescimento e submetidas a um aumento gradual de temperatura chegando até 40°C. Neste estudo, os autores observaram que tanto em folha quanto em raízes, a HSP21 apresentou uma meia vida de 52+/-12,7 horas. Por outro lado, para HSP 18,1 (classe I) também de ervilha a meia vida foi de 37,7 +/- 8h (DeRocher et al., 1991). A elevada estabilidade destas proteínas após o período de estresse, segundo estes autores, sugere que HSPs tenham um papel fundamental na aquisição de termo-tolerância. Ainda nesta mesma linha, a análise do acúmulo de transcritos que codificam HSPs, em plantas de soja mantidas no campo demonstram que a produção de HSPs é parte de uma resposta normal da planta a altas temperaturas (Kimpel & Key 1985).

Algumas considerações relacionadas aos métodos para avaliação da síntese de HSPs

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas para avaliação de termo-tolerância em plantas, no entanto, os resultados nem sempre são claros. Algumas destas técnicas, avaliam o potencial de tolerância através da medição da estabilidade da membrana plasmática (Martineau & Specht 1979a; Martineau & Specht 1979b), ou resposta fotossintética (evolução de O₂). Entretanto, Chaisompongpan et al., (1990) não observaram correlação entre estas duas técnicas quando seis genótipos de feijoeiro foram avaliados.

Muitos estudos para avaliação da síntese de HSPs tem sido realizados através da marcação do tecido submetido ao choque, com aminoácidos radioativos, extração das proteínas seguido por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) simples ou em duas dimensões (2D SDS-PAGE). Apesar de altamente informativos, dois aspectos dificultam a utilização destas técnicas como rotina. Inicialmente, a complexidade e o tempo envolvido impossibilita a avaliação de muitas amostras, dificultando o acompanhamento da síntese de HSPs em muitos genótipos (Adham et al., 1991). Além disso, a quantidade de material radioativo necessária também impossibilita a realização de experimentos com numerosos tratamentos.

Técnicas imunológicas podem oferecer maior rapidez e menor complexidade, neste caso o aspecto limitante esta relacionado à obtenção de quantidades substanciais de HSPs para produção de anticorpos (Yeh et al., 1995). O estudo da expressão gênica através da extração de RNA mensageiro e hibridização com sondas específicas, conhecido como northern blot oferece algumas vantagens em relação as anteriormente descritas: permite avaliar um número maior de amostras; é extremamente sensível; quantidades de RNAm de 1pg podem ser detectadas de acordo com nível de marcação e tempo de exposição (Current Protocols in Molecular Biology 1993), e apesar de também utilizar compostos radioativos, as quantidades são bem menores do que no caso da marcação do tecido *in vivo*.

Em nossos estudos utilizando a técnica de northern blot tendo como sonda para LMW HSP um cDNA isolado de trigo (McElwain & Spiker 1989), foi possível fazer uma avaliação do nível de expressão desse grupo específico de proteínas em diferentes cultivares de feijoeiro e correlacionar o nível de expressão com a capacidade de tolerância a altas temperaturas dos genótipos analisados (Simões-Araújo, 1997).

No entanto, deve-se ter em mente que a técnica de northern blot detecta apenas os transcritos, ou seja, o acúmulo do RNAm, e a expressão de uma proteína pode estar sujeita também a uma regulação pós-transcricional. Portanto não é possível afirmar com plena convicção que o elevado acúmulo

de um transcrito necessariamente levará a uma alta produção da respectiva proteína. Dessa forma, o ideal seria um estudo utilizando uma combinação de técnicas tais como northern blot, técnicas imunológicas e/ou géis do tipo 2D SDS-PAGE para uma avaliação mais completa.

Considerações Finais

Não obstante a complexidade dos mecanismos envolvidos na aquisição de termo-tolerância em plantas, os quais podem envolver a inter-relação de diversas vias metabólicas, bem como a expressão de diferentes genes e/ou famílias gênicas, se faz necessário o melhor entendimento das bases moleculares dos mecanismos envolvidos nesta resposta. Dessa forma será possível, contribuir de maneira significativa, para a seleção e melhoramento de genótipos com alta capacidade de tolerar os efeitos deletérios provocados pelas altas temperaturas. Além disso, com o advento dos avanços obtidos nas técnicas de engenharia genética e de DNA recombinante há, atualmente, a possibilidade de transferência de genes entre espécies aparentadas ou não, e desta forma introduzir genes exógenos e/ou alterar a expressão dos genes endógenos relacionados com a tolerância ao calor, de forma a manter os níveis de produtividade, mesmos em condições de estresses ambientais como, altas temperaturas.

Referências

- ADHAM, K. G.; WILKINSON, M. C.; SMITH, C. J.; LAIDMAN, D. L. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Heat-shock Protein 70 in plants. **Food & Agricultural Immunology**, v.3, p.29-36, 1991.
- ALMOGUERA, C. & JORDANO, J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low molecular weight heat shock proteins and lea mRNAs. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.781-792, 1992.
- BOLNET, H. J. & JENSEN S. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, vol.14, p89-97, 1996.

- BOSTON, R. S., VIITANEN, V.P. & VIERLING, E. Molecular chaperones and proteins foldins in plants. *Plant Molecular Biology*, v.32, p. 191-222, 1996.
- BRAUER, D., LOPER, D., SHUBERT, C. & TU, S. Effects of temperature on the coupled activities of the vanadate-sensitive proton pump from maize root mirosomes. **Plant Physiol.**, v.96, p. 1114-1117, 1991.
- BURKE, J. J., HATFIELD, J. L., KLEIN, R. R. & MULLET, J. E. Accumulation of Heat Shock Protein in Field-Grown Cotton. **Plant Physiol.**, v.78, n.2, p.394-398, 1985.
- BLUM, A. Breeding crop varieties for stress environments. **Critical Reviews in Plants Sciences**, v.3, n.3, p.199-237, 1985.
- CLEN, H. H., SHEN, Z. Y., & LI, P. H. Adaptability of Plants to High Temperature Stress. **Crop Science**, v.22, n.4, p.719-725, 1982.
- CHAIMONGPAN, N.; LI, P. H.; DAVIS, D. W. & MARKHART III, A. H. Photosynthetic response to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimation potential. **Crop Science**, v.30, p.100-104, 1990.
- CHOU, M., CHEN, Y. M., & LIN, C. Y. Termotolerance of Isolated Mitochondria Associated With Heat Shock Proteins. **Plant Physiol.**, v.89, n.2. p.617-621, 1989.
- CLARKE, A. K., CRITCHLEY, C. Synthesis of early Heat Shock Proteins in young Leaves of Barley and Sorgum. **Plant Physiol.**, v.94, n.2, p.567-576, 1990.
- COCA, M. A.; ALMOGUERA, C. & JORDANO, J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.479-492. 1994.
- COOPER, R. & HO, T. D. Heat Shock Proteins in Maize. **Plant Physiol.**, v.71, n.2, p.215-222, 1983.
- CRAIG, E. A.; GAMBILL, B. D & NELSON, R. J. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Protein Biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, n.3, p.402-414, 1993.

- DANIEL, M.; DINES, K. & PETACH, H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. **Biochemical Journal**, v.317, p.1-11, 1996.
- ECKEY-KALTENBACK, H.; KIERFER, E.; GROSSKOPF, E.; ERNST, D. & SANDERMANN, H. Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of small heat shock protein by ozone and heat stress. **Plant Molecular Biology**, vol 33, p343-350, 1997.
- DEROCHER, E. A.; HELM, K. W.; LAUZON, L. M & VIERLING, E. Expression of a Conserved Family of Cytoplasmic Low Molecular Weight Heat Shock Proteins during Heat Stress and Recovery. **Plant Physiol**, v.96, p.1038-1047, 1991.
- DOYLE, J. A., DONOGHUE, M. J. Phylogenies and angiosperm diversification. **Palobiology**, v.19, p.141-167, 1993.
- DUCK, N. C.; McCORMICK, S. & WINTER, J. Heat shock proteins hsp70 cognate gene expression in vegetative and reproductive organs of *Lycopersicum esculentum*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.86, p.3674-3678, 1989.
- FEDER, S. E. & O'CONNELL, M. A. Expression of Heat Shock Response in a Tomato, Interspecific Hibrid is not Intermediate between the Two Parental Responses. **Plant Physiol**, v.93, v.3, p.1140-1146, 1990.
- GURLEY, W. B. & KEY, J. L. Transcriptional regulation of Heat-shock response: A plant perspective. **Biochemistry**, v.30, p.1-11, 1991.
- GUY, C. L. & LI, Q.-B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **The Plant Cell**, vol.10, p 539-556, 1998.
- HEUSS-LAROSA, K.; MAYER, R. R.; CHERRY, J. H. Syntesis of only two Heat Shock Proteins is required for thermoadaptation in cultures cowpea cells. **Plant Physiol**, v.85, p.4-7, 1987.
- HECKATHORN, S. A.; DOWNS, C. A.; SHARKEY, T. D. & COLOMAN, J. S. The small, methionine-rich chloroplast heat shock protein protects photosystem II electron transport during heat shock. **Plant Physiol**, vol. 116, p. 430-444, 1998.

- JACOB, U.; GAESTEL, M.; ENGEL, K. & BUCHNER, J. Small Heat shock Proteins are molecular Chaperones. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.3, p.1517-1520, 1993.
- JORGENSEN, J. A.; WENG, J.; HO, T-H. D. & NGUYEN, H. T. Genotype-specific Heat Shock Proteins in two maize inbreds. **Plant Cell Reports**, v.11, p.576-580, 1992.
- JORGENSEN, J. A. & NGUYEN, H. T. Isolation, sequence and expression of a cDNA encoding a class I Heat Shock Protein (HSP17,2) in maize. **Plant Science**, v.97, p.169-175, 1994.
- JORGENSEN, J. A. & NGUYEN, H. T. Genetic analyses of Heat Shock Proteins in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.38-46, 1995.
- JINN, T. L.; WU, S.-H.; YEH, K.-W.; HSIEH, M.-H.; YEH, Y.-C.; CHEN Y.-M.; LIN, C.-Y. Immunological Kinship of Class I Low Molecular Weight Heat Shock Proteins and thermostabilization of Soluble Proteins in vitro among Plants. **Plant Cell Physiol**, v.34, n.7, p.1055-1062, 1993.
- KIMPEL, J.A. & KEY J.L. Presence of Heat Shock Protein mRNAs in Field Grown Soybeans. **Plant Physiol**, v.79, p.672-678, 1985.
- LaFAVETTE, P. R.; NAGAO, R. T.; O'GRADY, K.; VIERLING, E. & KEY, J. L. Molecular characterization of cDNA encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. **Plant Molecular Biology**, v.30. p.159-169, 1996
- LEE, Y-R. J., NAGAO, R. T. & KEY, J. L. A Soybean 101-kD Heat Shock Protein Complements a Yeast HSP104 Deletion Mutant in Acquiring Thermotolerance . **The Plant Cell**, v.6, p.1889-1897, 1994.
- LEE, J. G.; POKALA, N. & VIERLING, E. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.18, p.10432-10438, 1995.
- LENNE, C.; BLOCKS, M. A.; GARIN, J.; DOUCE, R. Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small Heat Shock Protein in pea leaves. **Biochemistry Journal**, v.311, p.805-813, 1995.

- LIN, C-Y.; ROBERTS, J. K. & KEY, J. L. Acquisition os thermotolerance in soybean seedling, synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. **Plant Physiol.**, v.74, p.152-160, 1984.
- LINDQUIST, S. The Heat Shock Response. Annu. Rev. **Biochemistry**, v.55, p.11511-11591, 1986.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. The Heat Shock Proteins. Annu. Rev. **Genetics**, v.22, p.631-677, 1988.
- MANSFIELD, M. A.; KEY, J. L. Synthesis of the Low Molecular Weight Heat Shock Proteins in Plants. **Plant Physiol.**, v.84, p. 1007-1017, 1987.
- MAGER, W. H. & FERREIRA, M. P. Stress response of yeast. **Biochemestry Journal**, v.290, p.1-13, 1993.
- MAGER, W. H. & KRUIJFF, A. J. J. Stress induced transcriptional actication. **Microbiological Reviews**, v.59, n.3, p.509-531, 1995.
- MARGIS-PINHEIRO, M. Lis chitinases de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var. *saxa*): Clonage des ADNc de deux chitinases acides induites par stress chimique ou par infection virale. Etude de leur structure et de l'expression de leurs genes en reponse a diverse types de stress. Universite Louis Pasteur Strasbourg I, Tese de Doutorado, 1993.
- MARTINEAU, J. R.; SPECHT, J. E. Willians, J. H. & SULLIVAN, C. Y. Temperature tolerance in soybean. I. Evaluation of technique for assessing cellular membrane thermostability. **Crop Science**, v.19, p.75-78, 1979.
- MARTINEAU, J. R. & SPECHT, J. E. Temperature tolerance in soybean. II. Evaluation of segregating populations for membrane thermostability. **Crop Science**, v.19, p.79-81, 1979.
- McELWAIN E. F. & SPIKER, S. Molecular and Physiological Analysis of a Heat Shock Response in Wheat. **Plant Physiol.**, v.99, p.1455-1460, 1989.
- McELWAIN E. F. & SPIKER, S. A Wheat cDNA clone which is homologous to the 17 Heat-shock gene family of soybean. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.4, p.1764, 1989.
- NIETO-SOTELO, J.; VIERLING, E. & HO, D. T-H. Cloning, Sequence Analysis, and Expression of cDNA Encoding a Plastid-Localized Heat Shock Proteins in Maize. **Plant Physiol.**, v.93, p.1321-1328, 1990.

- PARK, S-Y.; SHIVAJI, R.; KRANS, J.V. & LUTHE, D. S. Heat-shock response in heat-tolerance and nontolerant variants os agrostis palustris Huds. **Plant Physiol.**, v. 111, p.515-524, 1996.
- PARSELL, D. A. & LINDQUIST, S. The funtion of Heat-shock Proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. **Ann. Rev. Genetics**, v.27, p.437-496, 1993.
- PRANDL, R.; HINDERHOFER, K.; EGERS-SHUMACHER, G. & SCHOFFL, F. HSF3, a new heat shock factor from Arabidopsis thaliana, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. **Molecular General Getetic**, vol 258:3, p 269-278.
- PRASAD, T. K.; HALLBERG, R. L. Identification and metabolic characterization of the Zea mays mitochondrial homolog of the Escherichia coli groEl protein. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.609-618, 1989.
- PRASAD, T. K. & STEWART, C. cDNA clones encoding Arabidopsis thaliana and Zea mays mitocondrial champeronin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.873-885, 1992.
- RIZZO, M.; ALEVY, Y.G.; SUNDARESAN, S.; LYNCH, J.; TRULOCK, E.P. COOPER, J.D.; PATTERSON. G.A. & MOHANALUMAR, T. Increased expression of HDJ-2 (heat shock protein 40) and heat shock portein 70 in biopsy specimens of transplanted human lungs. **Jounal Heart Lung Transplant** , 17:3, p341-349.
- RISTIC, Z.; GIFFORD, D. J. & CASS, D. D. Heat Shock Proteins in two lines of Zea mays L. that differ in drought and heat response. **Plant Physiol**, v.97, p.1430-1434, 1991.
- SANCHEZ, Y. & LINDQUIST, S. HSP104 required for thermotolerance. **Science**, , v.248, p.1112-1115, 1990.
- SANCHEZ, Y.; TAULIEN, J. BORKOVICH, K.A. & LINDQUIST, S. HSP104 is required for tolerance to many forms of stress. **The EMBO Journal**, Oxford v.11, n.6, p.2357-2364, 1992.
- SCHMITZ, G.; SCHMITZ, M. & FEIRABEND, J. Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence,

- phylogenetic descendence and analysis of its mRNA and proteins expression. **Plant Molecular Biology**, v.30, p. 479-492, 1996.
- SCHIRMER, E. C.; LINDQUIST, S. & VIERLING, E. An Arabidopsis Heat Shock Protein complements a thermotolerance defect in yeast. **The Plant Cell**, v.6, p.1899-1909, 1994.
- SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Avaliação da síntese de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) em diferentes cultivares de feijoeiro sob altas temperaturas. Tese de Mestrado. UFRRJ, 1997.
- SINGLA, S. L., & GROVER, A. Detection and Quantitation of a Rapidly accumulating and Predominant 104 kDa Heat Shock Polypeptide in Rice. **Plant Science**, Calcutta, v.97, p.23-30, 1994, 1991.
- SIVARAMAKRISHNAN, S.; PATELL, V. Z. & SOMAN, P. Heat Shock Proteins of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.) Cultivars with Differing Heat Tolerance at Seedling Establishment Stage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, p.249-245, 1990.
- TAKAHASHI, T.; NAITO, S. & KOMEDA, Y. The Arabidopsis HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic Arabidopsis plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of heat-shock response. **The plant Journal**, v,2 n.5, p. 751-761. 1992.
- TROLINDER, N. L. & SHANG, S. In vitro selection and regeneration of cotton resistant to high temperature stress. **Plant Cell reports**, v.10, p.448-452, 1991.
- VIERLING, E. The role of Heat Shock Proteins in Plants. **Ann. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biology**, v.42 p.579-620, 1991.
- Vierling, R. A. & Nguyen H. T. Heat Shock Protein Sythesis and Accumulation in Diploid Wheat. **Crop Science**, v.30. n.6, p.1337-1342, 1990.
- WENG, J. NGUYEN, H. T. Differences in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.941-946, 1992.

- Wu, D. H., Laindman, D. L. & Smith, C. J. Heat Shock Protein 70 Levels in Temperatue Stressed Mung Bean Shoots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v, 44, n.259, p.457-461, 1993.
- WATERS, E. R. The molecular evolution of the small Heat Shock Proteins in **Plants. Genetics**, v.141, p.785-795, 1995.
- WATERS, E. R., LEE, G.J. & VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, p. 325-338, 1996.
- YEH, C.-H.; YEH, K.-W.; WU, S.-H.; CHANG, P.-F. L.; CHEN, Y.-M.; LIN, C.-Y. A Recombinant Rice 16.9-kDa Heat Shock Protein Can Provide Thermoprotection in vitro. **Plant Cell Physiol.** v.36, n.7, p.1341-1348, 1995.