



ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO, MEDIADA POR FITO- HORMÔNIOS, DAS UREASES DE SOJA

Daniel Henrique Strassburger¹
Roberta da Silva e Silva²
Arlete Beatriz Becker Ritt³

Resumo

Ureases, enzimas níquel-dependentes, presentes em plantas, bactérias e fungos, mas não em animais. Em vegetais, atuam na defesa contra fitopatógenos, principalmente fungos e bactérias, sendo sintetizadas pelas plantas em resposta ao ataque desses patógenos. Apesar de ser postulado que ureases, além de desempenhar papel de defesa, estão envolvidas no metabolismo e biodisponibilidade de nitrogênio, pouco se conhece sobre a regulação da sua expressão em plantas. Na leguminosa *Canavalia ensiformis* uma família gênica de ureases foi induzida pelo ácido abscísico. Diante disso, o principal objetivo desse projeto será avaliar, através de método fenol-nitroprussiato, a atividade da enzima urease, em plântulas de diferentes cultivares de soja. Para tanto, sementes de soja serão germinadas, seguido de extração e quantificação de proteínas e, quantificação da atividade ureolítica nessas plântulas. Resultados preliminares indicam que há pequenas diferenças na quantidade de proteínas presentes nas plântulas dos cultivares testados, mas, pequenas diferenças são percebidas quando se faz a análise quantitativa de urease através do método de fenol-nitroprussiato. Estudos adicionais deverão ser realizados para confirmação dos dados prévios encontrados. Futuramente, a correlação, com testes de herbivoria e tratamentos com diferentes fitohormônios, em plantas, poderá nos mostrar qual a rota metabólica é mais eficiente na síntese de ureases, após um ataque de insetos.

Palavras-chave: proteínas; quantificação; atividade ureolítica

INTRODUÇÃO

Urease (EC 3.5.1.5) é uma ureia amidohidrolase. Essa enzima, dependente de níquel (DIXON et al,1975) é responsável por catalisar a reação de hidrólise da ureia à amônia e

¹ Aluno do curso de graduação Agronomia Bolsista PROBITI/FAPERGS – dani-elhs@hotmail.com

² Aluna PPGBioSaúde– robertasilva@cavg.ifsul.edu.br

³ Professora Agronomia, Biomedicina, PPGBioSaúde e PPGGTA-MP – arlete.ritt@ulbra.edu.br

carbamato. O carbamato, por sua vez, se decompõe formando outra molécula de amônia e dióxido de carbono. São amplamente distribuídas no reino vegetal, fungi e monera, porém não são sintetizadas por animais (CARTER et al, 2009; KRAJEWSKA, 2009). O papel dessas enzimas em plantas é atribuído, principalmente, ao reaproveitamento de nitrogênio a partir da ureia proveniente de algumas rotas metabólicas. Além da biodisponibilidade do nitrogênio, essas enzimas participam também da proteção contra patógenos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; BECKER-RITT et al, 2007 e 2012; MENEGASSI et al, 2008).

As ureases embrião-específica de soja, (*Glycine max* - SBU), a urease majoritária de *C.ensiformis* (JBU) apresentam propriedades fungicidas em concentrações inferiores a 1 micromolar, afetando fungos fitopatogênicos (BECKER-RITT et al, 2007; BECKER-RITT; CARLINI, 2012). Essa atividade antifúngica apresenta uma certa espécie-especificidade em relação à fonte da proteína bem como ao tipo de fungo, afetando somente fungos pertencentes às classes Ascomycetos e Basidiomycetos, e é independente da atividade ureolítica. O efeito fungicida pode ser observado por microscopia eletrônica de varredura, o que possibilita visualizar as lesões da parede ou membrana celular encontrada nos fungos estudados (BECKER-RITT et al, 2007).

A soja

Glycine max (L.) Merrill, soja, é nativa da Ásia sendo considerada uma das culturas mais antigas daquela área, com relatos de cerca de 5000 anos atrás, originária das regiões norte e central da China (COSTA,1996). No Brasil, a mais antiga referência na literatura sobre experiências com soja data de 1882, na Bahia (ALMEIDA; CANECCHIO FILHO, 1987). No Rio Grande do Sul, há relatos de que a implantação da cultura da soja ocorreu a partir de 1917, no município de Santa Rosa (VERNETTI et al,1983).

Doenças estão entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja. Aproximadamente 40 doenças da soja causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2011).

Ureases presentes na soja (*Glycine max* (L) Merrill)

A soja possui duas isoenzimas de urease que apresentam 87% de identidade quanto a sequência dos aminoácidos: uma embrião-específica, gene *Eu1* e outra ubíqua, gene *Eu4*, ambas também similares à urease de *C. ensiformes* (KERR et al,1983; TORISKI et al, 1994). Alguns estudos apontam que a urease não desempenha uma função importante em plantas porque a ureia, seu principal substrato, é um metabólito da excreção de nitrogênio em

animais, mas não em plantas. No entanto, há evidências de que a relação comensal entre bactérias e plantas seja uma contribuição significativa para o perfil de urease em plantas. Em soja, a planta disponibiliza níquel ativo para que as bactérias possam sintetizar urease (POLACCO et al, 1993).

As ureases são consideradas proteínas de defesa, podendo ter sua expressão regulada por fitohormônios, como demonstrado por Pires-Alves et al (2003), onde genes de ureases foram induzidos por ácido abscísico na leguminosa *Canavalia ensiformis*.

Considerando que as ureases vegetais, além de estarem envolvidas no metabolismo de nitrogênio em plantas, também desempenham função de defesa nas mesmas, mecanismo esse ainda não totalmente elucidado e, conhecendo-se as rotas metabólicas desencadeadas pelos diferentes fito-hormônios, pretendemos, usando fito-hormônios, avaliar a expressão dos diferentes genes de urease no desenvolvimento de plantas de soja.

O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade ureásica em diferentes cultivares de soja e buscar selecionar cultivares que apresentem diferentes atividades ureásicas.

METODOLOGIA

Análise qualitativa de urease

Método “Chip seed assay”. Os valores serão expressos de acordo com essa alteração de cor, sendo G0: sem alteração, G4: alteração pH - rosa (pink)

Extratos proteicos foliares

Proteínas solúveis extraídas em NaPB 10 mM, pH 7,5 contendo 1 mM de β -mercaptoetanol e, quantificadas pelo método de Bradford (1976).

Atividade ureásica

Método fenol-nitroprussiato (WEATHWEBURN, 1967).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados qualitativos da presença de urease, mensurados a partir do ensaio “Chip seed assay” demonstram que há diferenças nas quantidades de uréase encontradas nas sementes. Cultivares apresentam desde quantidades muito baixas até quantidades elevadas, de acordo com gradações: G0 à G4 que foram determinadas visualmente pela diferença de coloração apresentada no ensaio, em decorrência da alteração de pH no meio reacional, onde G0: sem alteração e G4 alteração total da coloração (de amarelo para rosa).

A quantificação de proteínas, pelo Método de Bradford, dos cultivares analisados, indica que esses valores variam entre 2,82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o cultivar CD2737RR e 3,87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

para o cultivar Ativa, esta com um conteúdo proteico 35% maior em relação ao cultivar CD2737RR.

Quando analisamos a atividade ureásica, através do método fenol-nitruressiato, uma mensuração quantitativa, há diferenças entre os cultivares analisados. O cultivar CD2737RR, que apresentou a menor quantidade de proteínas, também apresenta uma menor atividade ureolítica: 0,33 U/min/mg proteína, quando comparada com os demais cultivares, que é o caso do cultivar Ativa: 0,38 U/min/mg proteína.

Os resultados, encontrados até o momento, estão reunidos na tabela 1. Analisando-os, podemos perceber pequenas diferenças em relação à quantidade de proteínas presentes nas sementes dos cultivares testados. Diferenças maiores são percebidas quando se faz a análise quantitativa de urease através do método de fenol-nitroprussiato.

Tabela 1: Resumo quantificações parciais

CULTIVAR	Qualitativo Urease	Proteínas µg/µL	Quantitativo Urease
RS-7	3	ND	ND
RS-10	1	ND	ND
BRS	2	ND	ND
FT. SARA	3	ND	ND
IAS-5	4	ND	ND
CD 201	1	ND	ND
CD 203	2	ND	ND
INTACTA	4	3,34 µg/µL	0,36 U/min/mg proteína
POTÊNCIA	4	3,43 µg/µL	0,36 U/min/mg proteína
CD2737	ND	2,82 µg/µL	0,33 U/min/mg proteína
ATIVA	ND	3,87 µg/µL	0,38 U/min/mg proteína
CD248	ND	3,19 µg/µL	0,35 U/min/mg proteína

ND: não determinado

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos adicionais deverão ser realizados com o intuito de confirmar os dados prévios encontrados, bem como para elencarmos cultivares de soja que apresentem diferenças significativas nesses quantitativos.

AGRADECIMENTOS

A FAPERGS pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. C.; CANECCHIO-FILHO, V. **Principais Culturas-V. II.** Campinas:1987.

BECKER-RITT, A. B.; CARLINI, C. R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Biopolymers: Peptide Science*, v.98, 384 p., 2012

BECKER-RITT, A. B. et al. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, v.50, p.971-983, 2007.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v.40, p.1515-39, 2002.

CARTER, E. L. et al. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, v.1, p.207-221, 2009.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre:1996.

DIXON, N.E. et al. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. *Journal Analytical Chemistry Society*, v.97, p.4130-4131, 1975.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção 15**. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012-2013, out. 2011.

KERR, P.S. et al. D.D. Soybean leaf urease: a comparison with seed urease. *Physiology Plant*, v.57, p.339-345, 1983.

KRAJEWSKA B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B-Enz*, v.59, p.9-21, 2009.

MENEGASSI, A. et al.. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physico-chemical characterization and antifungal properties of the protein. *J. Agric. Food Chem*, v.56, p.4399-405, 2008.

PIRES-ALVES, M. et al. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol*, v.44, p.139-45, 2003.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M.A. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology*, v.145, p.65-103, 1993.

TORISKY R.S. et al. A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol. Gen. Genet*, v.242, p.404-414, 1994.

VERNETTI, F.J. **Soja: genética e melhoramento**. 1983.

WEATHWEBURN, M.W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. Laboratory of Hygiene, **National Health and Welfare**, Ottawa, Canada, 1967.