



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 são proteínas de defesa que apresentam atividades entomotóxicas e fungicidas, sendo sintetizadas por plantas em resposta ao ataque de patógenos. Apesar de ser postulado que ureases estão envolvidas no metabolismo e biodisponibilidade de nitrogênio, pouco se sabe sobre sua regulação 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 soja. Para tanto, sementes de diferentes cultivares de soja serão germinadas e, a atividade ureolítica será mensurada nessas plântulas. Em nossos resultados preliminares, percebemos que há pequenas diferenças na quantidade de proteínas presentes nas sementes dos cultivares testados, pequenas diferenças são percebida quando se faz a análise quantitativa de urease através do método de fenol-nitroprussiato. Outros estudos deverão ser realizados para confirmar os dados prévios encontrados. Futuramente, a correlação, com testes de herbivoria, 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 metalo-enzima dependente de níquel (DIXON et al,1975) é responsável por catalisar a reação de hidrólise da ureia à amônia e 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).

O mecanismo de ação das ureases e peptídeos derivados, em insetos, ainda não está totalmente elucidado, mas, sugerem um comprometimento da diurese e balanço de eletrólitos (STANISÇUASKI, 2012). Tanto a urease majoritária da *C. ensiformis* quanto a urease embrião específica da soja mostraram também ter atividade inseticida, atuando em concentrações semelhantes à canatoxina, da ordem de 0,05% p/p (FOLLMER et al, 2004a e 2004b).

As ureases embrião-específica de soja, (*Glycine max* - SBU), a urease majoritária de *C.ensiformis* (JBU) apresentam propriedades fungicidas em concentrações inferiores a 1

¹ Aluno do curso de 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

micromolar, afetando fungos fitopatogênicos (BECKER-RITT et al, 2007; BECKER-RITT; CARLINI, 2012). A atividade antifúngica mostra uma certa espécie-especificidade em relação à fonte da proteína e ao tipo de fungo, afetando somente fungos pertencentes às classes Ascomycetos e Basidiomycetos, e é independente da atividade ureolítica, (FOLLMER et al, 2001).

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

A soja pertence à família Fabaceae Lindl.- antiga Leguminosae - que inclui, aproximadamente, 670 gêneros e 18 mil espécies. O gênero *Glycine* divide-se em dois subgêneros, o subgênero *Glycine* que é composto de espécies perenes, e o subgênero *Soja* que possui duas espécies anuais: *G.max*, a soja cultivada, e *G.soja*, a soja silvestre (LANGE, 2008).

A soja, cujo nome científico é *Glycine max* (L.) Merrill, 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. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura. 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).

De 1970 a 2007, a produção global da soja aumentou de 44 a 236 milhões de toneladas do grão (EMBRAPA, 2007). Na safra 2010/11, a produção mundial de soja foi de 263,7 milhões de toneladas (www.cnpso.embrapa.br).

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

A soja possui duas isoenzimas de urease que apresentam cerca de 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). A urease embrião-específica, sintetizada apenas durante o desenvolvimento do embrião, apresenta maior atividade específica ($1\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). (HOLLAND et al, 1987; POLACCO; WINKLER, 1984; POLACCO et al, 1985; TORISKY; POLACCO, 1990).

Estudos demonstraram que, plantas de soja desprovidas de urease ubíqua, apresentam acúmulo de uréia nas folhas e raízes, bem como, o comprometimento do emprego da ureia como fonte de nitrogênio (MEYER-BOTHLING; POLACCO, 1987; POLACCO et al, 1989; POLACCO; HOLLAND, 1993).

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).

O aumento na síntese dos fito-hormônios estão associados à resposta de plantas aos estresses bióticos e abióticos (CREELMAN; MULLET, 1995). As ureases são consideradas

proteínas de defesa, podendo ter sua expressão regulada por fito-hormônios, 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 preliminares estão organizados e tabulados. A tabela 1 apresenta os resultados qualitativos da presença de urease, mensurados a partir do ensaio “Chip seed assay”. As diferentes gradações: G0 à G4 foram determinadas pela diferença de coloração apresentada no ensaio, onde G0: sem alteração e G4 alteração total da coloração (de amarelo para rosa).

Tabela 1: Gradação qualitativa de urease

CULTIVAR	G0	G1	G2	G3	G4
RS-7				X	
RS-10		X			
BRS			X		
FT. SARA				X	
IAS-5					X
CD 201		X			
CD 203			X		
INTACTA					X
POTÊNCIA					X

Na tabela 2, a quantificação de proteínas, dos cultivares analisados, é apresentada. Os valores variam entre 2,82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o cultivar CD2737 e 3,87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o cultivar Ativa, esta com um conteúdo proteico 35% maior em relação ao cultivar CD2737.

Tabela 2: Quantidade de proteína nas cultivares de soja analisadas

CULTIVAR	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS
CD2737	2,82 µg/µL
ATIVA	3,87 µg/µL
POTÊNCIA	3,43 µg/µL
CD248	3,19 µg/µL
INTACTA	3,34 µg/µL

Quando analisamos a atividade ureásica, através do método fenol-nitruprussiato, uma quantificação quantitativa, há diferenças entre os cultivares analisados (Tabela 3) A cultivar CD2737, que apresentou a menor quantidade de proteínas, também apresenta uma menor atividade ureolítica, quando comparada com os demais cultivares.

Tabela 3: Análise quantitativa da atividade ureásica dos cultivares

CULTIVAR	QUANTITATIVO ATIV. UREÁSICA
CD2737	0,33 U/min/mg ptn
ATIVA	0,38 U/min/mg ptn
POTÊNCIA	0,36 U/min/mg ptn
CD248	0,35 U/min/mg ptn
INTACTA	0,35 U/min/mg ptn

Todos os resultados parciais encontrados estão reunidos na tabela 4. Analisando os mesmos, podemos perceber que há diferenças em relação à quantidade de proteínas presentes nas sementes dos cultivares testados. Uma pequena diferença também é percebida quando se faz a análise quantitativa de urease através do método de fenol-nitroprussiato.

Tabela 4: 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 ptn
POTÊNCIA	4	3,43 µg/µL	0,36 U/min/mg ptn

CD2737	ND	2,82 µg/µL	0,33 U/min/mg ptn
ATIVA	ND	3,87 µg/µL	0,38 U/min/mg ptn
CD248	ND	3,19 µg/µL	0,35 U/min/mg ptn

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 oportunidade recebida.

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.
- CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceeds National Academic Science**, v.92, p.4114-4119, 1995.
- 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. **Circular Técnica 43**. O complexo agroindustrial da soja brasileira. setembro, 2007.
- EMBRAPA. **Cultura da soja**. www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29
Acesso em: 19/07/2013.
- EMBRAPA. **Sistemas de Produção 15**. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012-2013, out. 2011.
- FOLLMER, C. et al. Canatoxin, a toxic protein of jackbeans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, v.360, p.217-224, 2001.
- FOLLMER, C. et al.. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal Biochemistry**, v.271, p.1357-63, 2004a.
- FOLLMER, C.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) Urease Isoforms by Immobilized Metal Affinity Chromatography and

- Characterization of Insecticidal Properties Unrelated to Ureolytic Activity. **Plant Science**, v.167, p.241-46, 2004b.
- HOLLAND, M.A. et al. Development genetics of soybean urease isozymes. **Development Genetics**, v.8, p.375-387, 1987.
- 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.
- LANGE, C.E. Soja: uma história de sucesso. In: Barbieri, R.L.; Stumpf, E.R.T. Origem e evolução de plantas cultivadas. **Embrapa Informação Tecnológica**: Brasília, 2008.
- 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.
- MEYER-BOTHLING, L. E.; POLACCO, J. C. *Mutacional analysis of the embryo-specific urease locus of soybean*. **Molecular and General Genetics**, v.209, p.439-44, 1987.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol**, v.59, p.451-480, Rev.1995.
- 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.
- POLACCO, J. C. et al. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. **Molecular General Genetics**, v.217, p.257-62, 1989.
- POLACCO, J.C.; KRUEGER, R.W.; WINKLER, R.G. Structure and possible ureide degradating function of the ubiquitous urease of soybean. **Plant Physiol**, v.79, p.794-800, 1985.
- POLACCO, J.C.; WINKLER, R.G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? **Plant Physiol**, v.74, p.800-803, 1984.
- REAL-GUERRA, R. et al. Biochemical and Structural Studies on Native and Recombinant *Glycine max* UreG: A Detailed Characterization of a Plant Urease Accessory Protein. **Plant Molecular Biology**, v.78, p.461-75, 2012.
- STANISÇUASKI, F. E CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, v.4, p.55-67, 2012.
- 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.
- TORISKY, R.S.; POLACCO, J.C. Soybean roots retain the seed urease isoenzyme synthesized during embryo development. **Plant Physiol**, v.94, p.681-689, 1990.
- 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.