



## **OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DE PLÂNTULAS DE SOJA**

Daniel H. Strassburger - Agronomia Bolsista PROBITI/FAPERGS

Roberta S e Silva Aluna – Doutoranda PPGBioSaúde

Arlete B. Becker-Ritt - Agronomia, Biomedicina, PPGBioSaúde e PPGGTA-MP -

### **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* a expressão de uma família gênica de ureases foi induzida pelo ácido abscísico. A soja, cujo nome científico é *Glycine max* (L.) Merrill, é nativa da Ásia sendo considerada uma das culturas mais antigas, com relatos de cerca de 5000 anos atrás, originária das regiões norte e central da China. No Brasil, a soja foi cultivada pela primeira vez em 1882, na Bahia. No Rio Grande do Sul, o cultivo da soja ocorreu a partir de 1917, no município de Santa Rosa. Doenças estão entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja. Cerca de 40 doenças são causadas na soja por fungos, bactérias, nematóides e vírus. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100%. Obtenção de cultivares mais resistentes a doenças e pragas torna-se necessário. Na última safra foram colhidos, apenas no Brasil, mais de 96 milhões de toneladas do grão, fazendo dessa *commodity* a mais importante do Brasil. Diante deste cenário, almejamos, a longo prazo, elucidar a(s) rota(s) metabólica(s) de síntese de ureases, uma proteína de defesa, em soja. O principal objetivo desse projeto será otimizar um protocolo para quantificação de proteínas totais em plântulas de soja e avaliar, através de método fenol-nitroprussiato, a atividade da enzima urease. Para tanto, sementes de diferentes cultivares de soja serão germinadas e, as quantidades de proteínas bem como atividade ureolítica serão mensuradas nessas plântulas. Nossos resultados preliminares apresentam pequenas diferenças nas quantidades

de proteínas presentes nos diferentes cultivares testados. Essas diferenças também são percebidas quando se faz a análise quantitativa de urease através do método fenol-nitroprussiato. Estudos adicionais deverão ser realizados para confirmação dos dados prévios encontrados. Futuramente, a correlação, com aplicação de fitohormônios e ensaios de herbivoria, em plântulas, poderão nos mostrar qual a(s) rota(s) metabólica(s) são mais eficientes na síntese de ureases, após o ataque de fitopatógenos.

Palavras-chave: proteínas. quantificação. atividade ureolítica.

## INTRODUÇÃO

Urease (EC 3.5.1.5) é uma amidohidrolase. Essa metalo-enzima dependente de níquel (DIXON et al,1975), 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 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 Ascomicetos e Basidiomicetos, 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 2014, a produção global da soja aumentou de 44 a 284 milhões de toneladas do grão (EMBRAPA, 2014). Na última safra, apenas no Brasil, foram colhidas mais de 96 milhões de toneladas do grão (CONAB, 2015).

### **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 ureia 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 fitohormônios está associado 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 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 (BECKER-RITT et al., 2007), mecanismo esse ainda não totalmente elucidado e, conhecendo-se as rotas metabólicas desencadeadas pelos diferentes fitohormônios, pretendemos, avaliar a expressão dos diferentes genes de urease no desenvolvimento de plantas de soja.

Para que isso seja possível, necessitamos padronizar um protocolo de extração e quantificação de proteínas e ureases presentes em cotilédones de soja, portanto, o principal objetivo deste trabalho é avaliar a atividade ureásica em diferentes cultivares de soja, disponíveis em nosso laboratório e, selecionar cultivares que apresentem diferenças nos parâmetros avaliados.

## 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  $\beta$ -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

<b>CULTIVAR</b>	<b>G0</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<b>RS-7</b>				X	
<b>RS-10</b>		X			
<b>BRS</b>			X		
<b>FT. SARA</b>				X	
<b>IAS-5</b>					X
<b>CD 201</b>		X			
<b>CD 203</b>			X		
<b>INTACTA</b>					X
<b>POTÊNCIA</b>					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 CD 2737 RR e 3,87  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para o cultivar Ativa, esta com um conteúdo proteico 35% maior em relação ao cultivar CD 2737 RR.

Tabela 2: Quantidade de proteína nas cultivares de soja analisadas

<b>CULTIVAR</b>	<b>QUANTIDADE DE PROTEÍNAS</b>
<b>CD 2737 RR</b>	2,82 µg/µL
<b>ATIVA</b>	3,87 µg/µL
<b>POTÊNCIA</b>	3,43 µg/µL
<b>CD 248 RR</b>	3,19 µg/µL
<b>INTACTA</b>	3,34 µg/µL

Quando analisamos a atividade ureásica, através do método fenol-nitruprussiato, uma mensuração quantitativa, há diferenças entre os cultivares analisados (Tabela 3). A cultivar CD 2737 RR, 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

<b>CULTIVAR</b>	<b>QUANTITATIVO ATIV. UREÁSICA</b>
<b>CD 2737 RR</b>	0,33 U/min/mg ptn
<b>ATIVA</b>	0,38 U/min/mg ptn
<b>POTÊNCIA</b>	0,36 U/min/mg ptn
<b>CD 248 RR</b>	0,35 U/min/mg ptn
<b>INTACTA</b>	0,35 U/min/mg ptn

Analisando os mesmos, podemos perceber que há diferenças em relação à quantidade de proteínas presentes nas sementes das cultivares testadas. Uma pequena diferença também é percebida quando se faz a análise quantitativa de urease através do método de fenol-nitroprussiato.

## 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 e que possam ser utilizados em ensaios futuros com o intuito de determinarmos a rota metabólica, através da qual ureases são sintetizadas, em plantas de soja.

## 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.

CONAB. **Acompanhamento safra brasileira de grãos**. v. 2 - Safra 2014/15, n. 10 - Décimo levantamento, Brasília, p. 81-86, julho 2015.

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. **Proced 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. **Cultura da soja**.

<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 21/08/2015.

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. **Journal Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 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. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.56, p.4399-405, 2008.

MEYER-BOTHLING, L. E.; POLACCO, J. C. *Mutational 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. **Microbiology**, 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 Physiology**, 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 Physiology**, v.79, p.794-800, 1985.

POLACCO, J.C.; WINKLER, R.G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? **Plant Physiology**, 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. **Molecular Gene Genetics**, v.242, p.404-414, 1994.

TORISKY, R.S.; POLACCO, J.C. Soybean roots retain the seed urease isoenzyme synthesized during embryo development. **Plant Physiology**, 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.