



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

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

¹Aluno do curso de graduação Agronomia – Bolsista – PROBITI/FAPERGS – dani-elhs@hotmail.com, ²Aluna PPGBioSaúde – robertasilva@cavg.ifsul.edu.br,

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

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.

OBJETIVOS

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., em diferentes cultivares de soja

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

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

Tabela 3: Análise quantitativa da atividade ureásica dos cultivares

CULTIVAR	QUANTITATIVO ATIV. UREÁSICA
CD 2737 RR	0,3312 U/min/mg ptn
ATIVA	0,38 U/min/mg ptn
POTÊNCIA	0,359 U/min/mg ptn
CD 248 RR	0,348 U/min/mg ptn
INTACTA	0,3552 U/min/mg ptn

Tabela 2: Quantidade de proteína nas cultivares de soja analisadas

CULTIVAR	QUANTIDADE DE PROTEÍNAS
CD 2737 RR	2,82 μ g/ μ L
ATIVA	3,87 μ g/ μ L
POTÊNCIA	3,43 μ g/ μ L
CD 248 RR	3,19 μ g/ μ L
INTACTA	3,34 μ g/ μ L

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados parciais encontrados, podemos perceber que há pequenas 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 fenol-nitroprussiato.

.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 ensaios quantitativos e, a longo prazo, submeter esses cultivares a ensaios de herbivoria ou indução através de fitohormônios, elucidar a rota metabólica de síntese de ureases em plantas de soja.