



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

GIOVANA CONTARELLI LAMONICA

PRODUTIVIDADE EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA PARA ENZIMA UREASE

SÃO CARLOS-SP

2022

Giovana Contarelli Lamonica

Trabalho de conclusão de curso
apresentada ao departamento de botânica
da Universidade Federal de São Carlos,
para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Sarah Caroline Ribeiro de Souza

Co-orientadora: Ana Teresa Lombardi

São Carlos- SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

BANCA EXAMINADORA

Membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de conclusão de curso da candidata Giovana Contarelli Lamonica, realizada em 28/04/2022:

Prof. Dr. Ana Teresa Lombardi (Co-orientadora)

Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Alberto Carvalho Peret

Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Inessa Lacativa Bagatini

Universidade Federal de São Carlos

não dá para te explicar. Eu perco qualquer palavra quando eu penso em nós. Mas sempre fomos nós, família.
as cinco pontas da estrela.
nunca conheci algo melhor que nós

nunca nem vou.

é calor
mas também frio
é amor
mas também raiva
é carinho
mas também firmeza
é tudo
 é todo o mundo.

é meu mundo.
tudo o que eu já vivi
tudo que ainda vou viver.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha professora e orientadora, professora Sarah, que lá no começo de 2020 iniciou essa aventura comigo que foi a produção do meu trabalho de conclusão de curso. Também agradeço ao seu filho, Caio, que nasceu durante a produção do trabalho e com certeza deixou sua marca na minha produção.

Gostaria de agradecer aos meus amigos que foram portos seguros durante toda a trajetória. Mais especificamente, Eduardo, Camila, Lavínia, Bruna e Gabriela, cada um, a sua maneira, foi essencial para conclusão desse trabalho.

Agradeço ao meu namorado, Breno, que esteve junto comigo em cada etapa do trabalho de conclusão de curso.

Agradeço aos alunos do laboratório de fisiologia vegetal, Júlia Thomaz e Ana Júlia Fernandes que me ajudaram e apoiaram para execução de um trabalho de melhor qualidade.

Agradeço à UFSCar, por oferecer um curso de primeira linha e me formar como profissional.

E por último, à minha família. Meus irmãos, Henrique e Marcelo por todo apoio e meus pais por sempre me encorajarem a fazer o melhor que eu posso.

RESUMO

As plantas necessitam de nitrogênio em todas as fases do desenvolvimento, sendo que este é considerado um nutriente essencial. O nitrogênio pode ser absorvido do solo, principalmente na forma de compostos inorgânicos, nitrato e amônia. Contudo, a ureia é um composto nitrogenado orgânico que também pode ser absorvido pelas plantas, sendo hidrolisado em amônia e gás carbônico pela enzima urease. Em soja, são encontrados dois tipos principais de urease, a urease ubíqua, presente em todos os tecidos vegetais e a urease embrio-específica, presente nos grãos e em embriões em desenvolvimento. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações no crescimento e no rendimento de plantas de soja mutantes para a urease, assim como analisar os níveis de alguns compostos nitrogenados nas folhas. Para tal, foram cultivadas plantas de soja mutantes dos seguintes genótipos: *eu1-a*, *eu3-a*, *eu4-a*, *eu1-a/eu4-c* e *Williams 82*. Após atingirem o estágio de formação das sementes e vagens, as plantas foram coletadas e foram feitas análises biométricas e bioquímicas. Com relação aos parâmetros de crescimento, foram observadas algumas diferenças entre os genótipos, principalmente entre o *eu4-a* em relação aos demais. Nas análises bioquímicas apenas o conteúdo de nitrato diferiu entre os mutantes. De maneira geral, podemos concluir que existem diferenças no crescimento dos genótipos mutantes e controle e, a princípio, o controle *Williams 82* parece ser o mais produtivo. No entanto, sugerimos que mais estudos sejam feitos para avaliar a produtividade dos mutantes.

Palavras-chave: Urease; Ureia; Nitrogênio; Proteína; Nitrato.

ABSTRACT

Plants need nitrogen at all stages of development, which is considered an essential nutrient. Nitrogen can be absorbed from the soil, mainly in the form of inorganic compounds, nitrate, and ammonia. However, urea is an organic nitrogenous compound that plants can also absorb, being hydrolyzed into ammonia and carbon dioxide by the enzyme urease. In soybeans, two main types of urease are found, the ubiquitous urease, present in all plant tissues, and the embryo-specific urease, present in grains and in developing embryos. The objective of this work was to investigate possible changes in the growth and yield of urease mutant soybean plants, as well as to analyze the levels of some nitrogen compounds in the leaves. For this, mutant soybean plants of the following genotypes were cultivated: *eu1-a*, *eu3-a*, *eu4-a*, *eu1-a/eu4-c*, and Williams 82. After reaching the stage of seed and pod formation, the plants were collected and biometric and biochemical analyzes were performed. Regarding the growth parameters, some differences were observed between the genotypes, mainly between *eu4-a* concerning the others. In the biochemical analyses, only the nitrate content differed between the mutants. In general, we can conclude that there are differences in the growth of mutant and control genotypes and, at first, the Williams 82 control seems to be the most productive. However, we suggest that more studies be done to evaluate the productivity of the mutants.

Keywords: Urease; Urea; Nitrogen; Protein; Nitrate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Amônio, Ureia e Urease	10
1.2 Produtividade em soja	11
1.3 Urease em soja	11
2 OBJETIVOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Análises biométricas	14
3.1.1 Biomassa total.....	14
3.1.3 Área foliar	15
3.2 Análises Bioquímicas	15
3.2.1 Análise de proteínas.....	15
3.2.2 Análise de amônia.....	16
3.2.3 Análise de nitrato.....	16
3.3 Delineamento estatístico	16
4 RESULTADOS.....	16
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	21
7 REFERÊNCIAS.....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 A) Reação enzimática da urease B) ativação da apo-urease pelas proteínas acessórias. (Witte, 2011) 12
- Figura 2 Massa foliar seca (A); Área foliar (B); Massa seca da raiz (C); Massa seca das vagens (D) Massa seca do caule (E); Altura do caule (F); Número de vagens (G); Número de sementes por planta (H) nos diferentes mutantes. As barras representam o erro padrão e as letras representam as diferenças entre os genótipos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) 17
- Figura 3 Dosagem de amônia (A); Proteínas totais (B); Dosagem de nitrato (C) nos diferentes mutantes. As barras representam o erro padrão e as letras as diferenças entre os genótipos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) 19

1. INTRODUÇÃO

1.1 Amônio, Ureia e Urease

O nitrogênio é um macronutriente essencial para as plantas, tendo impacto direto em seu crescimento, desenvolvimento e rendimento. Entre os compostos nitrogenados, estão o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+). O nitrato é o composto em maior quantidade no solo, podendo ser absorvido pelas raízes (O'Brien et al., 2016). O amônio tem como elemento principal o nitrogênio, sendo um dos compostos nitrogenados preferenciais para as plantas, porém, tanto em ambientes naturais quanto em cultivo, o suprimento de amônio muitas vezes é reduzido (O'Brien et al., 2016).

As plantas podem obter amônio a partir de três principais formas: por absorção direta do solo, por síntese endógena ou a partir absorção de ureia e sua conseguinte hidrólise, catalisada pela urease. A ureia presente no solo é proveniente da adubação ou das excretas dos animais e a amônio diretamente absorvido é proveniente da conversão da ureia por bactérias do solo (Witte, 2011). A síntese endógena da ureia ocorre a partir da hidrólise da arginina pela enzima arginase, resultando em ornitina e ureia. Esta reação ocorre na mitocôndria e a ureia resultante do processo é transportada ao citosol e depois é hidrolisada pela urease (Witte, 2011).

A urease (EC. 3.4.1.5, ureia amidohidrolase) é uma metaloenzima de grande importância histórica e também no meio agrícola (Farrugia, Macomber e Hausinger, 2013). A urease foi a primeira enzima a ser cristalizada de fonte vegetal e a primeira proteína que contém sítio ativo composto por níquel a ser descoberta (Polacco, Mazzafera e Tezotto, 2013). A absorção direta da ureia do solo ocorre a partir de transportadores transmembrana, otimizando a tomada de nitrogênio (Kojima, Bohner e Wirén, Von, 2006). As subunidades UreA, UreB e UreC formam um polipeptídeo único de 90 kDa (Witte, 2011).

A reação realizada pela urease ocorre em duas etapas, sendo a segunda mais rápida que a primeira (Witte, 2011). Primeiramente, a quebra da ureia resulta em amônia e carbamato. Em seguida, há a formação de uma segunda molécula de amônia e dióxido de carbono. (Witte, 2011). A hidrólise da amônia é energeticamente favorável, considerando que a reação não catalisada é extremamente lenta. (Polacco,

Mazzafera e Tezotto, 2013) (Figura 1). Em plantas, a urease possui sítio ativo composto por duas moléculas de Níquel (Ni^{2+}) e depende de proteínas acessórias para adição do Ni ao centro ativo e para ativação enzimática (Real-Guerra, Staniscuaski e Regina, 2013). A ausência ou inativação de qualquer uma das proteínas acessórias resulta na não ligação do níquel à urease e a conseguinte inativação da enzima (Polacco et al., 1999). A ativação da urease por tal proteína acessória, envolve a carboxilação de uma Lisina do sítio ativo e a adição de dois íons Níquel (Witte, 2011).

1.2 Produtividade em soja

De acordo com dados da Embrapa, atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, contando com uma produtividade média de 3362 kg por hectare. No país, 124.845 milhões de toneladas foram produzidas na safra de 2019/2020 (<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>).

Segundo Freitas et al (2018), em cultivo em casa de vegetação, a produtividade de grãos de soja do genótipo Eu3 (controle) é de aproximadamente 9 gramas por planta. Quando estas plantas são adubadas com níquel, a produtividade aumenta, evidenciando possível deficiência oculta do nutriente. Nas mesmas condições, plantas de soja urease-negativas (*eu3-a*), apresentam decréscimo do rendimento de grãos quando fertilizadas com níquel. Ainda no mesmo estudo, em plantas Eu3, a fertilização com níquel afetou positivamente a fotossíntese, considerando a maior efetividade do fotossistema II e maior conteúdo relativo de clorofila (Freitas et al., 2018).

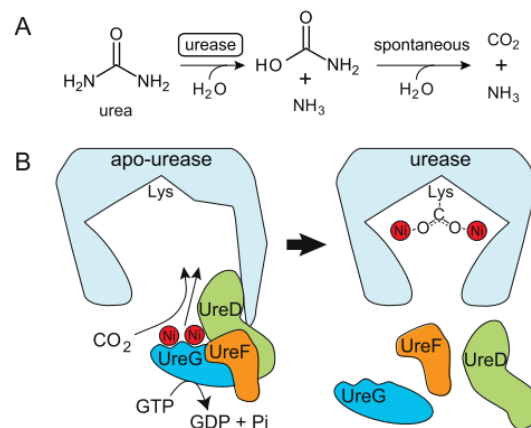
1.3 Urease em soja

Duas ureases são conhecidas em soja, a urease embrio-específica e a urease ubíqua (Souza, de et al., 2020). A urease embrio-específica está presente nas sementes e a ubíqua ocorre em todos os tecidos vegetais. As duas isoenzimas diferem em sua bioquímica, principalmente quanto a valores de K_m e de pH ótimo e cada uma delas é codificada por um gene específico. A urease embrio-específica é codificada pelo gene *Eu1* que contém 7736 pares de bases, enquanto a urease ubíqua é codificada pelo gene *Eu4*, composto por 7278 pares de bases. A determinação dos

genes codificantes foi determinada a partir da análise de plantas mutantes para cada isoenzima (Real-Guerra, Staniscuaski e Regina, 2013; Torisky e Polacco, 1990).

As proteínas acessórias necessárias para ativação da urease são a UreG, UreF e UreD, sendo que a UreG é a responsável pela ligação do Ni²⁺ a apoenzima. As três proteínas e a apo-urease formam um complexo para incorporação do níquel, havendo dissociação do mesmo após a ativação enzimática (Witte, Rosso e Romeis, 2005). Mutações para qualquer uma das três proteínas resulta na ausência da atividade ureolítica (Real-Guerra, Staniscuaski e Regina, 2013). No genoma da soja, sabe-se que o gene *Eu3* é o codificante da proteína UreG, o gene *Eu2* codifica a proteína acessória UreF.

Figura 1. A) Reação enzimática da urease B) ativação da apo-urease pelas proteínas acessórias. (Witte, 2011)



Mutantes foram criados para as ureases e para as proteínas acessórias, ambas resultando na ausência da atividade da enzima. O mutante *eu1-a* (*eu1-sun/eu1-sun*) não apresenta atividade da urease embrio-específica (Elise Meyer-Bothling e Polacco, 1987). Já o mutante *eu4-a* (*eu4-a/eu4-a*) não possui atividade da urease ubíqua. Ambos os genes estão em cópia única no genoma, portanto a mutação infere atividade praticamente nula destas enzimas (Torisky et al., 1994). Mutantes para as proteínas acessórias também geram interferência na atividade ureolítica, sendo conhecidos o mutante *eu3* (*eu3/eu3*) para a proteína UreG e o *Eu2* (*eu2/eu2*) para UreF (Elise Meyer-Bothling e Polacco, 1987) (Tabela1). O mutante *eu3-a* é totalmente negativo para urease, sendo que apresenta mutação na proteína UreG, acarretando na não inserção de e a conseguinte não atividade da enzima (Polacco et al., 2011). O mutante

para as duas ureases, *eu1-a/eu4-a*, apresenta atividade enzimática reduzida, porém não totalmente ausente (Stebbins et al., 1991; Torisky e Polacco, 1990).

Tabela 1. Genes para ureases em soja (Polacco *et al.*, 2011).

Locus	Gene	Número Glyma	Urease afetada devido a mutação	Referências
<i>Eu1</i>	Urease embrio-específica	Glyma0g2780/urease	Urease embrio-específica	Meyer-Bothling and Polacco, 1987; Torisky et al., 1994
<i>Eu4</i>	Urease ubíqua	Glyma11g37250/urease	Urease ubíqua	Meyer-Bothling and Polacco, 1987; Torisky et al., 1994; Goldraij et al., 2003
<i>Eu3</i>	UreG	Glyma08g08970/UreG	Urease ubíqua e embrio-específica	Freyermuth et al., 2000
<i>Eu2</i>	UreF	Glyma02g44440/UreF Glyma14g04380/UreF Glyma02g20690/UreD Glyma20g17990/UreD	UreF	(Polacco <i>et al.</i> , 2011)

Visto que a urease é uma enzima intrínseca a ciclagem do nitrogênio na planta, ela é de extrema importância em todos os estágios do metabolismo vegetal. Havendo interferência na produtividade da soja, o estudo da enzima é relevante para avaliação das lavouras e como a sua atividade, ou não, interfere na produtividade.

A hipótese deste trabalho é de que as mutações para atividade da enzima urease alterem o rendimento das plantas de soja, havendo provável mudança na biomassa e nos grãos dos mutantes.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a produção de biomassa e a produtividade de plantas de soja em diferentes mutantes para a urease. Também temos como objetivo observar e analisar o perfil de alguns metabólitos nitrogenados nas folhas das plantas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Federal de São Carlos, no Departamento de Botânica. O campus da universidade se situa na cidade de São Carlos, no interior do estado de São Paulo. Foram utilizadas sementes dos mutantes *eu4-a* (mutante para urease ubíqua), *eu1-a* (mutante para urease embrio-específica), *eu1-a/eu4-c* (duplo mutante para as duas ureases) e *eu3-a* (mutante para proteína acessória UreG). O controle foram sementes da linhagem Williams 82, genótipo utilizado para obtenção dos mutantes.

3.1 Condições de cultivo

As plantas foram cultivadas em sacos de muda pretos de dois litros de capacidade, contendo vermiculita como substrato, em casa de vegetação, sob condições naturais de luz e temperatura.

Foram plantadas 4 sementes em cada saco de muda, em um total de 40 sacos, sendo 8 sacos de cada genótipo. Após a germinação, as plantas foram desbastadas ficando apenas uma planta por saco. Os sacos foram colocados de forma aleatória dentro da estufa. De cada 8 sacos por genótipo, quatro plantas foram usadas para análises biométricas e as outras quatro para análises bioquímicas.

As plantas foram regadas apenas com água corrente até a terceira semana após a germinação. Após isso, duas vezes por semana as plantas eram irrigadas com 200 ml de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938), contendo nitrato como fonte de nitrogênio, e com água quando necessário.

Após 74 dias de cultivo, quando as plantas atingiram o estágio R5, elas foram coletadas para as análises.

3.2 Análises biométricas

3.2.1 Biomassa total

Assim que coletadas, as plantas foram separadas em caule, folhas, raiz e vagens. Em seguida, foram colocadas na estufa a cerca de 50° C onde permaneceram aproximadamente uma semana. Após a secagem total do material vegetal, foi feita pesagem de cada parte de cada planta. Também foi feita a contagem de vagens e sementes por planta.

3.2.2 Área foliar

O cálculo da área foliar foi realizado com auxílio do programa LeafByte, no qual há o cálculo da área da folha a partir de fotos. O aplicativo determina a área foliar comparando-a com área já conhecida.

3.3 Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foram realizadas extrações de dois tipos: MCW e NaOH

A extração MCW foi feita a partir de um reagente contendo metanol, clorofórmio e água (12:5:3), utilizando 2 ml para cada 200 mg de folhas frescas ou congeladas.

Tubos de ensaio foram separados e identificados por planta e genótipo e adicionadas as respectivas folhas, já pesadas, em cada um. Em seguida, foi adicionado 2 ml do reagente MCW em cada tubo. Após agitados, os tubos foram para geladeira até o dia seguinte. Então, a parte líquida de cada tubo foi transferida para outro tubo de ensaio e acrescidas de 0,5 ml de clorofórmio e 0,75 ml de água. Os tubos foram novamente para a geladeira e no dia seguinte apenas o sobrenadante (fração hidroalcolica) foi coletado em tubos do tipo eppendorf de 2ml. Posteriormente, as amostras foram mantidas dentro de uma capela de exaustão “overnight” para concentrar as amostras. Após isso, foram armazenadas no freezer até a utilização. Estes extratos foram utilizados para as dosagens de amônia e de nitrato.

Para a extração NaOH, foram utilizadas 200 mg de folhas frescas e colocadas em tubos de ensaios identificados. Foi adicionado 2 ml de NaOH 0,1M em cada tubo e agitados. Os tubos foram deixados na geladeira até o dia seguinte e o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf e armazenados no freezer. Estes extratos foram utilizados para análise de proteínas totais.

3.3.1 Análise de proteínas

Para esta análise, foram utilizados os extratos NaOH 0,1M. Foi utilizado 2,5 ml do reagente de Bradford (Bradford, 1976) em cada tubo e 50 microlitros de cada amostra (extração). Os tubos foram deixados no escuro por 5 minutos e depois foi feita leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A

quantificação de proteínas totais foi feita utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

3.3.2 Análise de amônia

Para esta análise, foram utilizados extratos MCW. Foram utilizados um reagente I de fenol e nitroprussiato de sódio e um reagente II composto de NaOH, Na₂HPO₄.12H₂O e NaOCl. Para reação, foi adicionado 100 microlitros de amostra em cada tubo, 0,5 ml do reagente I e 0,5 ml do reagente II. Os tubos foram deixados em banho maria a 37° C por 35 minutos. Cada amostra foi lida no espectrofotômetro a comprimento de onda de 625 nm. Sulfato de amônio foi usado como padrão (Felker, 1977; Mitchell, 1972).

3.3.3 Análise de nitrato

Foram utilizados extratos MCW feitos com folha seca. Em cada tubo, foram acrescidos 0,05 ml de amostra, 200 ml de reagente de ácido salicílico preparado anteriormente, os tubos foram agitados e deixados em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente. Após passado o tempo, 4,75 ml de reagente pré-preparado de NaOH foram adicionados. Assim que os tubos resfriaram, foi feita leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm (Cataldo et al., 1975). A curva padrão foi feita utilizando KNO₃.

3.4 Delineamento estatístico

O experimento foi realizado com oito repetições de cada um dos genótipos. Quatro réplicas foram usadas para as análises biométricas e as outras quatro para as análises bioquímicas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05\%$) para comparação entre os genótipos em cada análise.

4. RESULTADOS

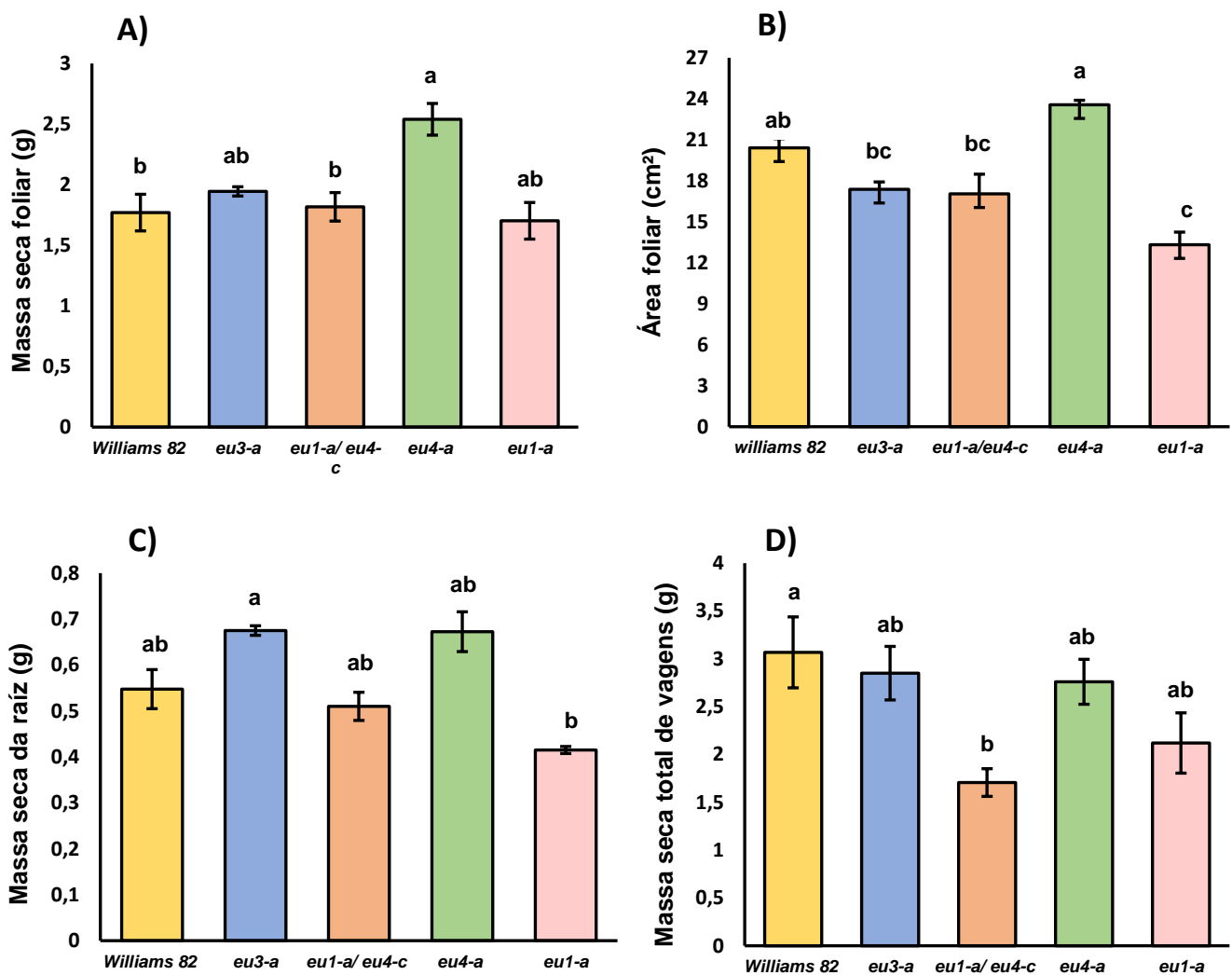
Com relação as análises de crescimento, foram observadas diferenças entre os genótipos nos parâmetros: massa seca de folhas, massa seca de raiz, massa seca de vagens e área foliar. A massa seca do caule, altura, número de vagens e número de sementes por planta foi similar entre todos os genótipos. O genótipo *eu4-a* apresentou maior massa seca de folhas, bem como maior área foliar, diferindo

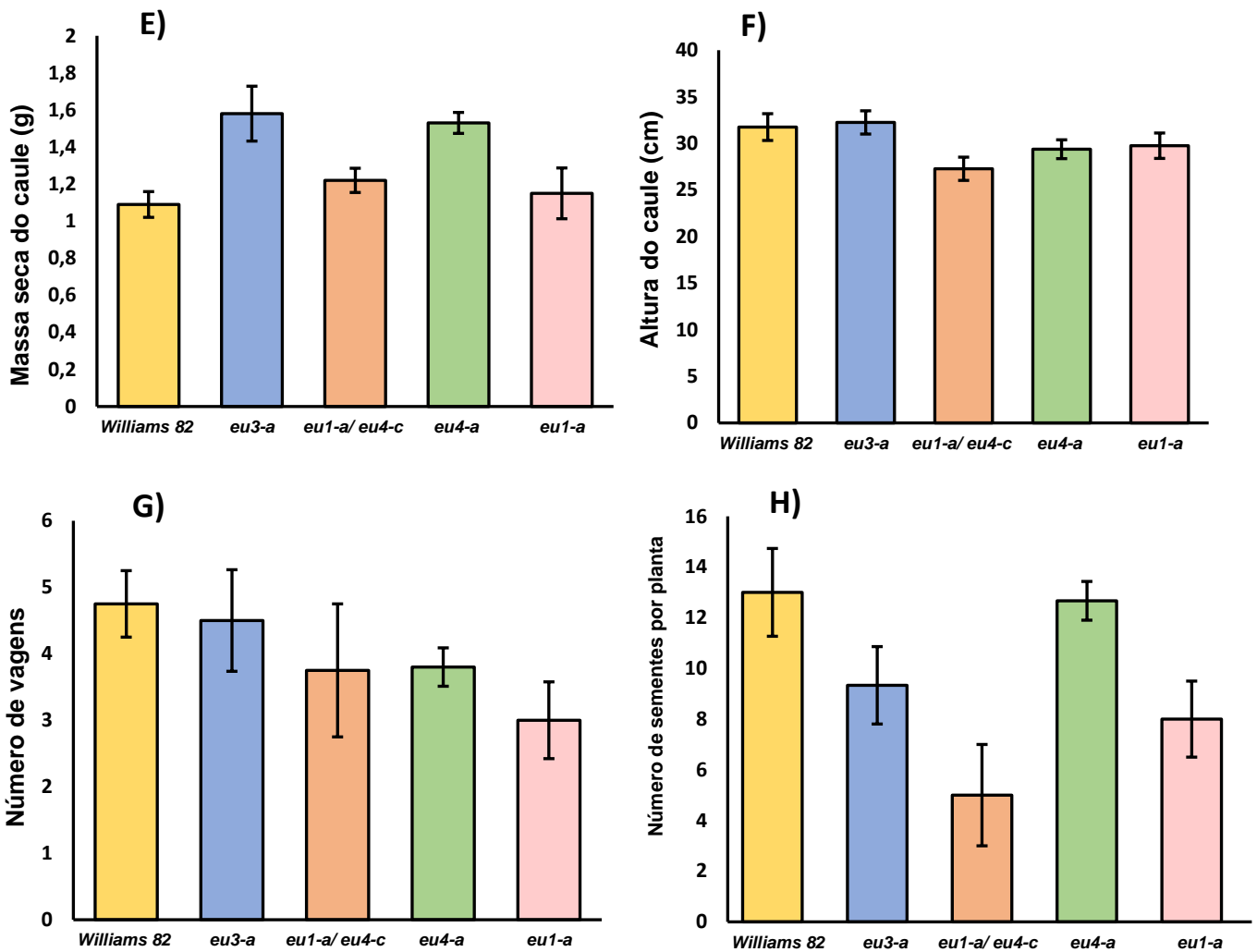
estatisticamente do controle, Williams 82, apenas na massa seca de folhas, considerando nível de significância “p” de 0,05. Em contrapartida, o mutante *eu1-a* apresentou menor valor de área foliar, menor, estatisticamente, que o controle e os genótipos Williams 82 e *eu1-a/eu4-c*, os menores valores de massa seca de folhas (Figura 2A e 2B).

A massa seca das raízes também diferiu entre os genótipos, sendo o *eu3-a* o genótipo com maior massa seca de raiz e o mutante *eu1-a*, o menor. (Figura 2C).

Em relação a massa seca das vagens, o genótipo Williams 82 foi o que obteve maior massa. O mutante com menor massa foi o *eu1-a/eu4-c* (Figura 2D).

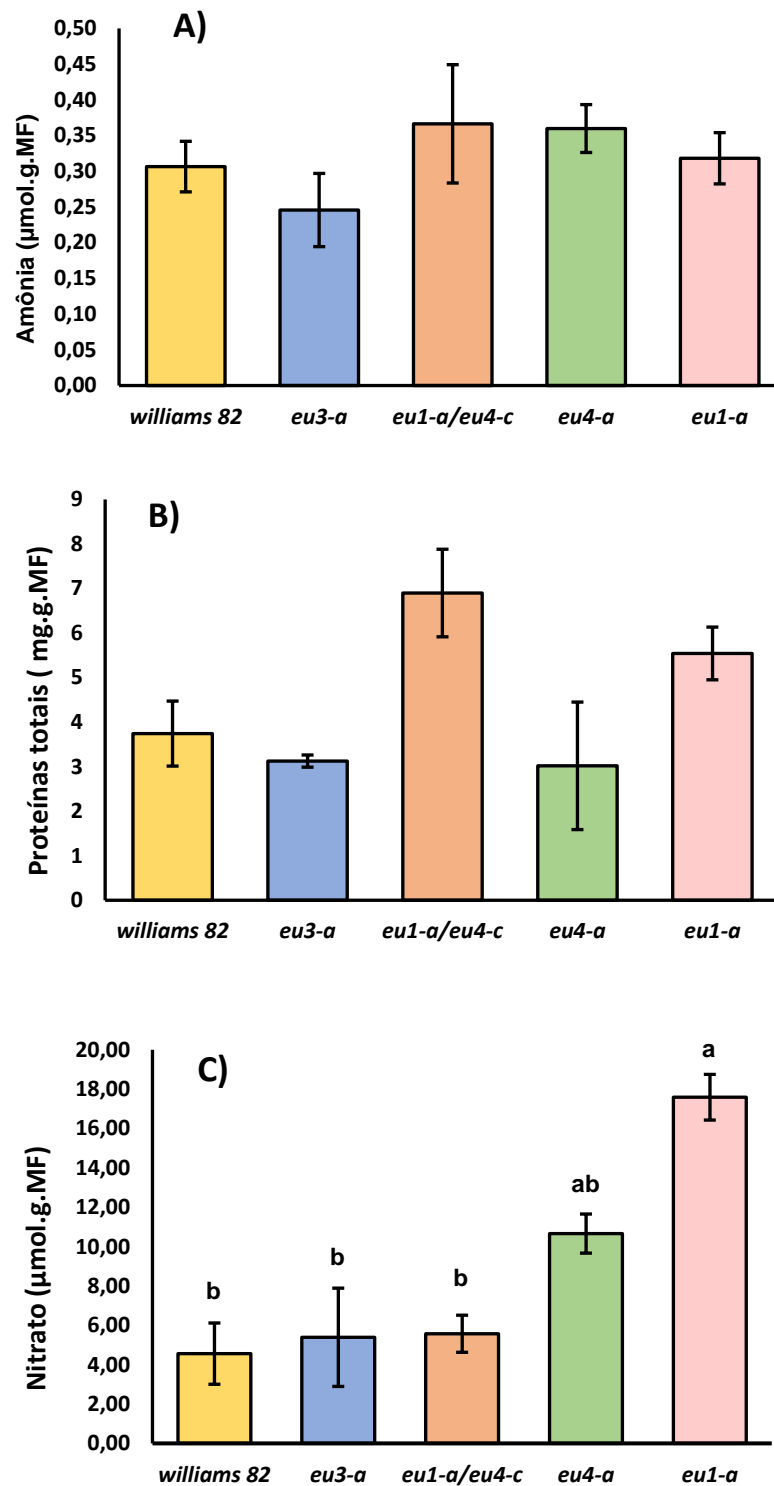
Figura 2. Massa foliar seca (A); Área foliar (B); Massa seca da raiz (C); Massa seca das vagens (D) Massa seca do caule (E); Altura do caule (F); Número de vagens (G); Número de sementes por planta (H) nos diferentes mutantes. As barras representam o erro padrão e as letras representam as diferenças entre os genótipos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)





Com relação aos parâmetros bioquímicos, a dosagem de amônia não apresentou diferença entre os mutantes, assim como a análise de proteínas totais. A dosagem de nitrato revelou diferença entre os genótipos, sendo que o mutante o *eu1-a* apresentou a maior quantidade de nitrato quando comparado com os genótipos Williams 82, *eu3-a* e *eu1-a/eu4-c*.

Figura 3. Dosagem de amônia (A); Proteínas totais (B); Dosagem de nitrato (C) nos diferentes mutantes. As barras representam o erro padrão e as letras as diferenças entre os genótipos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, procuramos verificar se existem diferenças na produtividade entre diferentes genótipos mutantes de soja para a enzima urease através das análises realizadas, assim como no perfil de alguns compostos nitrogenados.

Foi possível observar que os parâmetros de crescimento diferiram entre os genótipos, e, diferente do esperado, nem todos os parâmetros avaliados foram melhores no controle, o genótipo Williams 82. Considerando apenas a massa seca de folhas, também encontramos que a mesma foi menor em Williams 82 quando comparado com o mutante *eu4-a*. Em relação aos outros genótipos, não houve diferença. Por outro lado, a massa seca de vagens foi maior em Williams 82 e menor em *eu1-a/eu4-c*. Considerando estes resultados, pode-se inferir que o genótipo Williams 82 apresentou maior produtividade, uma vez que sua massa seca de vagens é maior, mesmo com uma biomassa de folhas menor.

Considerando o número de vagens e a quantidade de sementes por planta, parâmetros que não diferiram estatisticamente entre os genótipos, e a massa das vagens, onde o genótipo controle, Williams 82, apresentou a maior massa, observamos que, provavelmente, houve diferença no tamanho das sementes e não no seu número. Dessa forma, Williams 82 apresentou vagens com sementes maiores do que os genótipos demais.

Levando em conta o mutante *eu4-a*, que obteve a maior massa seca foliar e a maior área foliar, este genótipo não apresentou maior massa seca de vagens, ou número o maior de vagens, demonstra que maior investimento em biomassa da parte aérea não significa maior produtividade, não havendo maior produção de grãos. Quando levamos em conta todos os parâmetros de crescimento, o genótipo *eu4-a* foi o que apresentou maior desenvolvimento da parte aérea.

O mutante *eu3-a*, quando comparado com o duplo mutante *eu1-a/eu4-c*, apresentou bom desempenho em relação a massa foliar, área foliar e biomassa de vagens, mesmo não possuindo nenhuma atividade ureolítica (Polacco et al., 2011). Isso nos mostra que, provavelmente, a mutação na enzima é mais danosa do que a mutação na proteína UreG.

No trabalho de Souza e colaboradores (2020), que investigou alterações no crescimento, metabolismo do nitrogênio e na expressão gênica em plantas de soja *Eu3* (homozigoto dominante para *UreG* derivado do genótipo Williams 82) e o mutante *eu3-a* (homozigoto recessivo), não foram observadas diferenças em relação aos parâmetros de crescimento e produtividade das plantas. Contudo, o nosso estudo é pioneiro em comparar os parâmetros de crescimento no estágio reprodutivo em outros genótipos mutantes para enzima.

Considerando os metabólitos de nitrogênio, não foram observadas diferenças entre os genótipos nos teores de amônia. Geralmente, a amônia é encontrado em baixas concentrações nas folhas, devido a sua toxicidade (Esteban *et al.*, 2016) . Mesmo em situações de estresse, como alagamento, não foram observadas alterações nos teores de amônia no mutante *eu3-a* (dados não publicados).

Já em relação ao teor de nitrato, foi observado maior teor nos mutantes *eu1-a* e *eu4-a* em relação aos demais. Estes dois mutantes correspondem a urease ubíqua e embrionária, consecutivamente. O acúmulo de nitrato pode estar relacionado a uma maior demanda de nitrato nas folhas destes genótipos, devido ao provável acúmulo de nitrogênio em ureia. No entanto, não foi observado maior teor de nitrato no mutante *eu3-a*, que é totalmente urease negativo.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, houve diferenças na produtividade entre os genótipos, sendo que o controle, Williams 82, aparentemente foi o mais produtivo em relação a biomassa de grãos, mas não em relação à biomassa vegetativa. Sugerimos mais estudos para avaliar a produtividade de plantas de sojas mutantes para urease.

7. REFERÊNCIAS

- CATALDO, D. A.; HAROON, M. H.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.
- ELISE MEYER-BOTHLING, L.; POLACCO, J. C. Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 209, n. 3, p. 439–444, 1987.
- ESTEBAN, R.; ARIZ, I.; CRUZ, C.; FERNANDO, J. Plant Science Review : Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant Science**, v. 248, p. 92–101, 2016.
- FARRUGIA, M. A.; MACOMBER, L.; HAUSINGER, R. P. Biosynthesis of the urease metallocenter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13178–13185, 2013.
- FELKER, P. Microdetermination of Nitrogen in Seed Protein Extracts with the Salicylate-Dichloroisocyanurate Color Reaction. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1080, 1977.
- FREITAS, D. S.; RODAK, B. W.; RODRIGUES, A.; BELL, R. W. Hidden Nickel Deficiency ? Nickel Fertilization via Soil Improves Nitrogen Metabolism and Grain Yield in Soybean Genotypes. v. 9, n. May, p. 1–16, 2018.
- KOJIMA, S.; BOHNER, A.; WIRÉN, N. VON. Molecular mechanisms of urea transport in plants. **Journal of Membrane Biology**, v. 212, n. 2, p. 83–91, 2006.
- MITCHELL, H. L. Micro determination of Nitrogen in Plant Tissues. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 55, n. 1, p. 01–03, 1972.
- O'BRIEN, J. A. A.; VEGA, A.; BOUGUYON, E.; KROUK, G.; GOJON, A.; CORUZZI, G.; GUTIÉRREZ, R. A. A. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. **Molecular Plant**, v. 9, n. 6, p. 837–856, 2016.
- POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K.; GERENDÁS, J.; CIANZIO, S. R. Soybean genes involved in nickel insertion into urease. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 336, p. 1149–1156, 1999.
- POLACCO, J. C.; HYTEN, D. L.; MEDEIROS-SILVA, M.; SLEPER, D. A.; BILYEU, K. D. Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3599–3608, 2011.
- POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion - Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant Science**, v. 199–200, p. 79–90, 2013.
- REAL-GUERRA, R.; STANISCUASKI, F.; REGINA, C. Soybean Urease: Over a Hundred Years of Knowledge. **A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships**, 2013.
- SOUZA, S. C. R. DE; SODEK, L.; POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P. Urease deficiency alters nitrogen metabolism and gene expression in urease-null soybean without affecting growth or productivity under nitrate supply. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 3, p. 1–11, 2020.
- STEBBINS, N.; HOLLAND, M. A.; CIANZIO, S. R.; POLACCO, J. C. Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. **Plant Physiology**, v. 97, n. 3, p. 1004–1010, 1991.
- TORISKY, R. S.; GRIFFIN, J. D.; YENOFKY, R. L.; POLACCO, J. C. A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 242, n. 4, p. 404–414, 1994.

TORISKY, R. S.; POLACCO, J. C. Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2, p. 681–689, 1990.

WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 431–438, 2011.

WITTE, C. P.; ROSSO, M. G.; ROMEIS, T. Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1155–1162, 2005.