

LUCINETE REGINA COLOMBO

EFEITO DO ÁCIDO JASMÔNICO SOBRE LIPOXIGENASE DE
FOLHAS DE SOJA

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
OUTUBRO – 1999

LUCINETE REGINA COLOMBO

EFEITO DO ÁCIDO JASMÔNICO SOBRE LIPOXIGENASE DE
FOLHAS DE SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de março de 1999.

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof^a Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Conselheira)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

A Deus, a quem “pertence o poder e retribui a cada um, segundo sua obra”.
À minha família.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida, pela força e pela conquista.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo incentivo nos momentos difíceis e pela amizade.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao professor Maurilio Alves Moreira, pelas sugestões.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pelos ensinamentos e pelas sugestões.

Ao Newton Deniz Piovesan, pela colaboração e pelo convívio.

À minha família, minha gratidão, minha admiração e meu respeito, por tudo.

À minha amiga Virgínia, pelo convívio e pela amizade.

Ao meu amigo Carlos Priminho, pelo incentivo.

Ao Júlio César de Mattos Cascardo, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas Valéria, Rita, Tatiana, Francine, Ines, Angélica, Willian, Fábio, Joselito, Cintia, Cristiano, Giordani, Marcelo, Márcio e Abelmon, pelo convívio.

Às amigas de residência Aparecida e Elisa.

Aos colegas do Curso de Fisiologia vegetal, pela agradável convivência.

Aos funcionários do BIOAGRO Márcia, Aloísio e Fausto, pelo apoio.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCINETE REGINA COLOMBO, filha de Hugo Colombo e Margarida Sala Colombo, nasceu em 5 de março de 1971, em Ocaçu, Estado de São Paulo, Brasil.

Em 1996, bacharelou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná.

Em março de 1997, ingressou no Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Material genético	12
3.2. Tratamento	12
3.3. Obtenção de extratos foliares	13
3.4. Determinação da atividade de LOX	13
3.4.1. Preparo da solução de linoleato de sódio	13
3.4.2. Atividade de LOX	14
3.5. Efeito do pH sobre a atividade de LOX	14
3.6. Efeito da temperatura sobre a atividade de LOX	15
3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de LOX	15
3.8. Determinação de proteínas totais no extrato bruto	16
3.9. Inibidores de proteases	16
3.9.1 Obtenção de extratos foliares.....	16
3.9.2 Determinação de inibidores de proteases.....	16

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Efeito de pH sobre a atividade de LOX	18
4.2. Efeito da temperatura sobre a atividade de LOX	21
4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} de LOX	24
4.4. Determinação de inibidores de proteases.....	29
5. RESUMO E CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

EXTRATO

COLOMBO, Lucinete Regina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 1999. **Efeito do ácido jasmônico sobre lipoxigenases de folhas de soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Maurilio Alves Moreira.

Este trabalho foi realizado com a variedade comercial de soja IAC-12 e a linha quase-isogênica dela derivada (IAC-12 TN), com ausência de lipoxigenase (LOX) em suas sementes, com dois objetivos básicos: verificar o efeito do ácido jasmônico sobre as LOX foliares e analisar se a eliminação genética das LOX das sementes não alterou o *pool* de LOX das folhas. Foram determinados parâmetros cinético-bioquímicos do *pool* de LOX dos dois genótipos, nos tempos de 12, 24 e 48 horas após o tratamento com ácido jasmônico. O pH ótimo foi semelhante entre os dois genótipos, em torno de 6,0. Observou-se também um segundo pico de atividade, em torno de pH 4,5. As análises de temperatura indicaram maior atividade em torno de 25°C para o valor de pH 6,0. O parâmetro cinético K_M aparente (K_M app) foi menor no tempo de 24 horas em ambos os genótipos, tratados ou não com ácido jasmônico. O genótipo IAC-12 exibiu maior K_M app quando tratado com ácido jasmônico, ao passo que IAC-12 TN apresentou menor K_M app quando tratado do que o controle, entretanto, em ambos os casos, as diferenças não foram acentuadas. Os dados obtidos indicaram que a remoção genética das LOX de semente de soja não influencia o *pool* de LOX foliares nem a sua resposta ao ácido jasmônico.

ABSTRACT

COLOMBO, Lucinete Regina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, October, 1999. **Effects of jasmonic acid on lipoxygenases in soybean leaves.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee Members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Maurílio Alves Moreira.

This work was carried out using the commercial soybean variety IAC-12 and a near isogenic line (NIL) derived from it (IAC-12 TN) and lacking seed lipoxygenases (LOX). This work had two main objectives: investigate the effect of jasmonic acid on the activity of soybean leaves LOX and analyze if the genetic elimination of seeds LOX caused any imbalance in the leaves LOX pool. Kinetic-biochemical parameters were evaluated for both genotypes, at 12, 24 and 48 hours after the jasmonic acid treatment. The optimum pH was similar for both genotypes, approximately 6.0. A second activity peak, around pH 4.5, was observed. Temperature analysis indicated a major activity at 25 °C, at pH 6.0. The apparent kinetic parameter K_M (K_M app), was lower at 24 hours for both genotypes, treated or not with jasmonic acid. The IAC-12 genotype exhibited higher K_M app when treated with jasmonic acid, conversely, IAC-12 TN showed lower K_M app, compared with the control, however, on both cases, the differences detected were very slight. The data obtained indicate that the genetic removal of soybean seeds LOX did not influence the leaves LOX pool and their response to jasmonic acid.

1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxirredutase, EC 1.13.11.12) (LOX) são isoenzimas da classe das oxirredutases que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados contendo a estrutura *cis*, *cis*-1,4-pentadieno. O oxigênio é introduzido nos carbonos 9 ou 13 dos ácidos linoléico ou linolênico, gerando os ácidos 9 ou 13 hidroperoxiloléico ou hidroperoxilolênico, respectivamente (MACK et al., 1987). Duas principais vias para o metabolismo de hidroperóxidos produzidos por essas isoenzimas, chamadas de “Via das Lipoxigenases”, vêm sendo propostas para plantas superiores (VICK e ZIMMERMAN, 1976; GRIMES et al., 1992; FARMER e RYAN, 1992), para as quais apenas alguns intermediários foram identificados até o momento.

SEKIYA et al. (1983), estudando atividade de LOX de folhas de 28 espécies de plantas, demonstraram que a soja está entre as que apresentam maiores atividades. HILDEBRAND et al. (1988) e ZHUANG et al (1992), examinando a expressão dessas isoenzimas em diferentes estádios de desenvolvimento da soja, verificaram que as maiores atividades ocorrem, em geral, nas folhas mais jovens. SARAVITZ e SIEDOW (1995) constataram que a concentração das isoenzimas LOX decresce acentuadamente com a idade das folhas, mas que as formas mais acídicas são mais abundantes em folhas com idade intermediária.

Em soja, os genes que codificam as LOX estão organizados em uma grande família multigênica contendo, pelo menos, oito membros. Destes, três são expressos na semente durante o seu enchimento; em tecidos vegetativos de soja são expressos cinco genes de LOX. A expressão diferencial desses genes poderia explicar as diversas funções atribuídas a essa classe de enzimas (BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al., 1998)

As isoenzimas LOX têm sido relacionadas com diversos processos fisiológicos em tecidos vegetais, como: crescimento e desenvolvimento (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991), senescência (ROUET-MAYER et al., 1992; MACRI et al., 1995), reserva vegetativa (TRANBARGER et al., 1991; BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al. 1998), germinação de sementes (KATO et al., 1992; PARK et al., 1994), defesa e resistência a pragas e patógenos (BELL e MULLET, 1993; MELAN et al., 1993; CROFT et al., 1993; SARAVITZ e SIEDOW, 1995; SARAVITZ e SIEDOW, 1996; HEITZ et al., 1997; BOHLAND et al., 1997; FIDANTSEF e BOSTOCK, 1998) e biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios, como o ácido jasmônico (ANDERSON et al., 1989; FARMER e RYAN, 1992).

O ácido jasmônico, composto derivado da “Via das Lipoxigenases”, é reconhecido como molécula sinalizadora sintetizada por plantas em resposta a ferimentos, herbivoria e ataque de patógenos (CREELMAN et al., 1992; FARMER e RYAN, 1992; ALBRECHT et al., 1993). Dentre os vários efeitos fisiológicos descritos para o ácido jasmônico e seus metil esterés em plantas de soja, podem ser citados: a regulação da expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa (ANDERSON et al., 1989), a transdução de sinais relacionados a estresses e indução gênica de inibidores de proteases (FRANCESCHI e GRIMES, 1991) e o aumento dos níveis dos transcritos e da atividade de LOX em plântulas e em folhas de soja (GRIMES et al., 1992; SARAVITZ e SIEDOW, 1996).

LOX de sementes de soja afetam as propriedades e a qualidade de produtos alimentícios derivados, uma vez que participam na formação de compostos, como aldeídos e ácidos de cadeia curta, responsáveis pelos sabores indesejáveis característicos desses produtos. O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que visa

aumentar a sua aceitabilidade na alimentação humana, eliminou geneticamente as isoenzimas LOX presentes na semente. Considerando que as isoenzimas LOX têm sido relacionadas com diversos processos fisiológicos em tecidos vegetais, torna-se necessário verificar se tal manipulação genética na semente não alterou processos fisiológicos que seriam normalmente desempenhados por LOX nas folhas.

O objetivo do presente trabalho foi determinar parâmetros bioquímicos e cinéticos do “pool” de LOX foliares na variedade comercial de soja (IAC-12) e na linha quase-isogênica dela derivada, com ausência de LOX em suas sementes (IAC-12 TN), submetidas à aplicação de ácido jasmônico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Lipoxigenases (linoleato:oxigênio oxidoredutase, E.C. 1.13.11.12) (LOX) referem-se a uma classe: oxirredutase que catalisa a adição de oxigênio molecular a moléculas poliinsaturadas contendo o sistema *cis*, *cis*-1,4-pentadieno (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Esse sistema comumente ocorre nos ácidos graxos di- e tri-insaturados, como o ácido linoléico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3), os quais são os principais substratos para as lipoxigenases de plantas superiores. O oxigênio é introduzido nos carbonos 9 ou 13 dos ácidos linoléico ou linolênico, gerando os ácidos 9 ou 13 hidroperóxidos linoléico ou linolênico, respectivamente (MACK et al., 1987). O ácido linolênico é o ácido graxo mais abundante na maioria dos tecidos das plantas, ao passo que o ácido linoléico é encontrado em maior concentração em sementes, sendo o mais utilizado como substrato nas determinações de atividade de LOX (HILDEBRAND et al., 1988). Nas sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57% dos ácidos graxos, e o ácido linolênico corresponde de 7 a 9% destes (KITAMURA et al., 1984).

LOX estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em plantas e animais superiores (HATAMAKA et al., 1982; MACK et al., 1987), bem como em fungos e leveduras (HILDEBRAND, 1989). Apesar de as LOX serem encontradas na maioria, se não em todos os tecidos de plantas e animais, seus níveis de expressão são variáveis. Múltiplas formas de

isoenzimas LOX estão freqüentemente presentes nos tecidos. O seqüenciamento de genes que codificam isoenzimas LOX em plantas e animais revelou regiões de grande homologia, indicando origem evolucionária comum entre LOX de plantas e animais (HILDEBRAND et al., 1988).

Estudos de localização subcelular revelaram que as LOX são enzimas solúveis localizadas predominantemente no citosol (SIEDOW, 1991; STEPHENSON et al., 1998), mas são encontradas também em cloroplastos (FEUSSNER et al., 1995; HEITZ et al., 1997), mitocôndrias (GROSSMAN et al., 1972), vacúolos (TRANBARGUER et al., 1991; STEPHENSON et al., 1998) e corpos lipídicos (FEUSSNER et al., 1995, 1996), assim como em associação com microsomos e membrana plasmática (DROILLARD et al., 1993; MACRÌ et al., 1995)

Nos vegetais, os hidroperóxidos oriundos da ação das LOX sobre os ácidos linoléico e linolênico podem sofrer a ação de diversas enzimas, o que leva a uma série de transformações, originando diferentes produtos, como os aldeídos, o ácido jasmônico e o ácido traumático. Em soja, o interesse pelas LOX está associado, em grande parte, à sua importância na determinação das características sensoriais de diversos produtos alimentícios. Em sementes com altos níveis de LOX e ácido linoléico, como a soja, a proporção de hexanal liberado é bastante elevada. O hexanal, um dos produtos indiretos da ação de LOX, mesmo quando presente em concentrações muito baixas da ordem de 5 ppb, possui odor altamente indesejável (HILDEBRAND, 1989), que é retido nos alimentos derivados da soja.

As sementes maduras de soja normalmente contêm três tipos de isoenzimas LOX (LOX 1, LOX 2 e LOX 3), as quais são codificadas por três genes simples, sendo dois deles ligados entre si (KITAMURA et al., 1984). As principais características bioquímicas das LOX de sementes de soja são apresentadas no Quadro 1 (CHRISTOPHER et al., 1972; BILD et al., 1977; HILDEBRAND e KITO, 1984; SHIBATA et al., 1987; HILDEBRAND et al., 1988; COELHO, 1993).

As três isoenzimas são proteínas globulares, solúveis em água e consistem de uma única cadeia polipeptídica (SIEDOW, 1991). Mostram alto grau de homologia entre si (no mínimo 70% na seqüência de aminoácidos),

Quadro 1 – Propriedades bioquímicas das isoenzimas lipoxigenases de sementes de soja

Parâmetros	Isoenzimas		
	LOX 1	LOX 2	LOX 3
Peso molecular	94.038	97.053	96.857
Ponto isoelétrico	5,68	6,25	6,15
pH (ótimo)	9,5	6,5	5,0 - 9,0
Especificidade do produto	95:5	50:50	65:35
	13HPO/9HPO*	13HPO/9HPO	13HPO/9HPO
Estabilidade	Alta	Baixa	Média
Especificidade pelo substrato	Ácidos graxos ionizados	Ácidos graxos não-ionizados	Ácidos graxos não-ionizados

* HPO = hidroperóxido.

ressaltando-se que as LOX-1 e -2 apresentam homologia de 81% com a sequência de aminoácidos (HILDEBRAND et al., 1988).

SEKIYA et al. (1983), estudando a atividade de LOX de folhas de 28 espécies de plantas, demonstraram que a soja está entre as que apresentam maiores atividades. HILDEBRAND et al. (1988) e ZHUANG et al. (1992), examinando a expressão dessas isoenzimas em diferentes estádios de desenvolvimento da soja, verificaram que as maiores atividades ocorrem, em geral, nas folhas mais jovens. SARAVITZ e SIEDOW (1995) constataram que a concentração das isoenzimas LOX decrescem acentuadamente com a idade das folhas, mas que as formas mais acídicas são mais abundantes em folhas com idade intermediária.

Em soja, os genes que codificam as LOX estão organizados em uma grande família multigênica contendo, pelo menos, oito membros. Destes, três são expressos na semente durante o seu enchimento; em tecidos vegetativos de soja são expressos cinco genes de LOX. A expressão diferencial desses genes poderia explicar as diversas funções atribuídas a essa classe de enzimas (BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al., 1998).

Por meio da técnica de cromatofocalização, GRAYBURN et al. (1991) identificaram três picos distintos de atividade de LOX em folhas de soja correspondentes a isoenzimas distintas. Os valores de pI das LOX desses três

picos foram de 6,67; 5,91; e 5,67. As curvas de pH dessas isoenzimas dos três picos revelaram valores de pH ótimo de 6,2; 5,5; e 8,5, respectivamente.

Diversas espécies vegetais vêm sendo estudadas com o objetivo de determinar as funções fisiológicas das LOX, a saber: soja (GRAYBURN et al., 1991; SARAVITZ e SIEDOW, 1995, 1997); trigo (BOHLAND et al., 1997), cevada (REINBOTHE et al., 1997), batata (GEERTS et al., 1994; FIDANTSEF e BOSTOCK, 1998), tomate (PEARCE et al., 1991; HEITZ et al., 1997), arroz (OTHA et al., 1991), tabaco (RICKAUER et al., 1997) e *Arabidopsis thaliana* (BELL e MULLETE 1993; MELAN et al., 1993), dentre outras.

Em diversas espécies vegetais foi detectado aumento na atividade de LOX em resposta a ferimento, e os produtos da “Via das Lipoxigenases” têm sido relacionados à resposta das plantas a esse estresse. Em plantas de soja que tiveram suas folhas submetidas a danos mecânicos, quatro novas isoenzimas LOX foram detectadas, observando-se tanto uma resposta local quanto uma sistêmica (SARAVITZ e SIEDOW, 1995). Além disso, após ferimento, dois genes que codificam as isoenzimas LOX7 e LOX8 de folhas de soja apresentaram aumento na sua expressão (SARAVITZ e SIEDOW, 1996). Outras espécies respondem ao ferimento, aumentando a expressão de LOX, como: *Arabidopsis thaliana* (BELL e MULLET, 1993), batata (GEERTS et al., 1994), tomate (HEITZ et al., 1997) e trigo (MAUCH et al., 1997).

Quando tecidos vegetais são danificados por patógenos ou mecanicamente ocorre degradação seqüencial de lipídios, o que resulta na formação de aldeídos voláteis de seis e nove carbonos (HATANAKA et al., 1982). A degradação inicia-se quando os ácidos graxos insaturados, linoléico e linolênico são dioxigenados em hidroperóxidos pela ação de LOX, os quais são clivados pela hidroperóxido liase, formando aldeídos (GARDNER, 1991). Produtos da ação das LOX podem atuar como agentes tóxicos à invasão de patógenos. Os aldeídos são capazes de inibir crescimento de fungos (VAUGHN e GARDNER 1993) e bactérias (CROFT et al., 1993). Assim, esses compostos podem representar papel importante na resistência de plantas a doenças.

A remoção dos primórdios florais ou vagens que funcionam como órgãos-dreno leva ao aumento de transcritos para múltiplas LOX em folhas de soja. KATO et al. (1993) verificaram acúmulo de mRNA para LOX 4, proteína

de reserva vegetativa de 94 KDa. BUNKER et al. (1995) observaram acúmulo de transcritos para quatro LOX vegetativas em folhas maduras de soja. Aparecimento de novas formas de LOX acídicas (SARAVITZ e SIEDOW, 1995) e aumento dos transcritos para LOX 7 e LOX 8 (SARAVITZ e SIEDOW, 1996) foram observados em folhas de soja após a remoção dos drenos reprodutivos. STEPHENSON et al. (1998) verificaram aumento dos níveis de mRNA em cinco LOX vegetativas em folhas de soja, em resposta à remoção das vagens. Estudos de imunolocalização indicaram que, com a remoção das vagens, isoformas específicas dessas isoenzimas acumularam-se no vacúolo das células do mesófilo paravenal e da bainha do feixe vascular, indicando que estas teriam papel no armazenamento temporário de nitrogênio, ao passo que outras funcionariam como enzimas ativas na partição de assimilados, visto terem acumulado no citosol das células do mesófilo paraveinal e da bainha do feixe vascular.

Um dos produtos da “Via das Lipoxigenases” é o ácido jasmônico, o qual é sintetizado a partir do ácido linolênico. Inicialmente, ele é sintetizado na forma de (+)-7-iso-ácido jasmônico, que apresenta alta atividade fisiológica, podendo ser rapidamente convertido para seu estereoisômero estável (-)-ácido jasmônico, o qual é menos ativo fisiologicamente (WASTERNACK e PARTHIER, 1997).

Os níveis de ácido jasmônico nas plantas variam em função do tecido e tipo de célula, do estágio de desenvolvimento e da resposta a diversos estímulos ambientais; em plantas intactas, geralmente varia de 10 ng a 3 µg por grama de matéria fresca. O ácido jasmônico é reconhecido como molécula sinalizadora sintetizada por plantas em resposta a ferimentos, herbivoria e ataque de patógenos (CREELMAN et al., 1992; FARMER e RYAN, 1992;).

Os níveis de ácidos linoléico e linolênico em folhas de plantas de tomate danificadas mecanicamente aumentam significativamente. O nível máximo é atingido uma hora após o ferimento, coincidindo com o aumento máximo nos níveis de ácido jasmônico (CONCONI et al., 1996). Os níveis de ácido jasmônico em plantas de aveia aumentam após 10 minutos do ferimento, atingindo o seu ponto máximo aos 30 minutos e declinando rapidamente a partir de então. Tratamento de suspensão de células de tabaco com o fungo

Phytophthora parasitica var. *nicotianae* induz aumento nos níveis de ácido jasmônico (RICKAUER et al., 1997).

Vários fatores podem atuar na transdução do sinal da região de ferimento até o complexo enzimático que leva à formação do ácido jasmônico. Em plantas de tomate e batata deficientes de ácido abscísico (ABA) submetidas a ferimento ou corrente elétrica não houve aumento nos níveis de ácido jasmônico e tampouco acúmulo de mRNA do inibidor de protease Pin2, que normalmente responde ao ácido jasmônico (HERDE et al., 1996). Tendo como base dados obtidos em plantas de tomate e batata por diversos autores, SEO et al. (1997) relataram que sistemina, ABA, etileno e corrente elétrica desempenham papel importante na resposta ao ferimento mediada por ácido jasmônico.

Dentre os vários efeitos fisiológicos descritos para o ácido jasmônico e seu metil éster em plantas de soja, podem ser citados: regulação da expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa (ANDERSON et al., 1989), transdução de sinais relacionados a estresses e a indução gênica de inibidores de proteases (FRANCESCHI e GRIMES, 1991) e o aumento dos níveis dos transcritos e da atividade de LOX em plântulas e folhas (GRIMES et al., 1992; SARAVITZ e SIEDOW, 1996).

O acúmulo de LOX em resposta a metil jasmonato em plântulas de soja ocorreu no vacúolo das células do mesófilo paraveinal das folhas primárias. Em outros órgãos, no entanto, LOX acumulou-se no vacúolo e nos plastídios de células epidérmicas e corticais (GRIMES et al., 1992). Plantas de soja tratadas com metil jasmonato tiveram em suas folhas, após 12 horas, aumento da expressão dos genes de LOX7 e LOX8, porém, após 24 horas, os níveis dos transcritos não foram significativamente diferentes dos do controle (SARAVITZ e SIEDOW, 1996). Os níveis basais de ácido jasmônico não se alteraram em folhas de soja ao longo de cinco semanas de contínua remoção das vagens, entretanto os níveis de mRNA da LOX vlxC e da proteína de reserva vegetativa vspB aumentaram em torno de seis vezes com relação ao controle, não sendo observado correlação entre os níveis desses transcritos e os de ácido jasmônico (BUNKER et al., 1995).

O efeito de jasmonatos na indução gênica de LOX foi também analisado em outras espécies. Em folhas de tomate, os níveis de mRNA *Tom*

LoxD alcançaram o máximo entre uma e duas horas após as plantas terem sido expostas a metil jasmonato (HEITZ et al., 1997). Em batatas, FIDANTSEF e BOSTOCK (1998), trabalhando com folhas destacadas, observaram máxima atividade de LOX utilizando a concentração de 90 μ M de metil jasmonato. Os transcritos de LOX apareceram seis horas após o início do tratamento, imediatamente antes do surgimento da atividade da enzima. A atividade permaneceu elevada até 96 horas após o tratamento. BELL e MULLET (1993) e MELLAN et al. (1993), trabalhando com *Arabidopsis thaliana*, constataram indução de LOX em resposta ao metil jasmonato.

Inibidores de proteases são prontamente induzidos quando plantas são feridas ou tratadas com metil jasmonato (MUELLER, 1997). Precursores octadecanóicos do ácido jasmônico, quando pulverizados na superfície foliar de plantas de tomate, ativam a síntese de inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992). Acredita-se que esses inibidores sejam componentes essenciais na resposta de resistência ao ataque de insetos e patógenos. Foi observado que um mutante de tomate, deficiente na biossíntese de ácido jasmônico, não acumula inibidor de proteases em resposta a ferimento e apresenta suscetibilidade ao ataque de insetos (HOWE et al., 1996).

Em folhas de batata, a proteína fosfatase é requerida para a expressão do gene de inibidor de protease *pin2* e de outros genes que são induzidos por jasmonato. Em raízes, a atividade dessa enzima não é necessária para a expressão de um gene de inibidor de protease homólogo a *pin2*, embora este também seja induzido por jasmonato. Esses dados indicam a existência de diferentes vias de transdução para os sinais do ácido jasmônico nesses dois órgãos (DAMMANN et al., 1997). Em batata, FIDANTSEF e BOSTOCK (1998), trabalhando com folhas destacadas, detectaram transcritos de inibidores de proteases PIN2 seis horas após o tratamento com ácido jasmônico, os quais se acumularam em altos níveis. Quando as folhas foram inoculadas com patógeno, não houve indução significativa de mRNA de PIN2.

FARMER e RYAN (1992) relataram que plantas de tomate produzem um oligopeptídeo de 16 aminoácidos (sistemina) quando feridas por insetos ou que ocorre liberação de polissacarídeo (oligouronídios) presente na parede celular de plantas atacadas por um patógeno. Assim, tanto a sistemina quanto o oligouronídeo possuiriam receptores específicos localizados na membrana

plasmática. Quando sistemina ou oligouronídio se ligassem aos respectivos receptores ocorreria ativação de uma lipase localizada na membrana plasmática, que liberaria ácido linolênico no citosol. Este ácido graxo seria, então, convertido em ácido jasmônico por meio da “Via das Lipoxigenases”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Neste trabalho foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade comercial IAC-12 e da linhagem derivada dessa variedade com ausência completa de LOX nas sementes (IAC-12 TN). Sementes de IAC-12 foram fornecidas pelo Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. A linhagem IAC-12 TN foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV e se encontrava, por ocasião deste estudo, no quinto retrocruzamento (RC₅F₃). As plantas foram cultivadas em condições de casa de vegetação, em vasos com capacidade para 4,0 kg de solo.

3.2. Tratamento

Plantas no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESSI, 1977) tiveram suas folhas pulverizadas com solução aquosa de ácido jasmônico (Sigma Chemical Co.) 50 µM contendo 0,05% de Tween 20. Essa solução foi preparada a partir de uma solução-estoque de ácido jasmônico 0,237 M em etanol. As plantas-controle foram pulverizadas com a mesma solução utilizada no preparo do ácido jasmônico. Doze, 24 e 48 horas após o tratamento, a

segunda folha trifoliolada foi coletada e imediatamente imersa em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C , para posterior avaliação da resposta. Todas as pulverizações foram feitas no início da manhã.

3.3. Obtenção de extratos foliares

Os extratos foliares foram obtidos a 4°C , de acordo com o método de OHTA et al. (1986), com modificações. Folíolos de plantas de soja do tratamento com ácido jasmônico e controle foram triturados, usando-se almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v). O homogenato obtido foi centrifugado a 17.200 g por 30 minutos, a 4°C . O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado na determinação da atividade de LOX pelo método espectrofotométrico (AXELROD et al., 1981) e na dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985).

3.4. Determinação da atividade de LOX

3.4.1. Preparo da solução de linoleato de sódio

Preparou-se uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, da seguinte maneira: a um frasco erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78,0 μL de ácido linoléico e 90 μL de Tween 20. Em seguida, homogenizou-se a solução, succionando-a com uma pipeta automática e evitando a formação de bolhas. Para clareamento da solução foram adicionadas gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL envolvido em papel-alumínio e o volume, completado para 25 mL com água deionizada fervida. A solução-estoque de linoleato de sódio foi dividida em alíquotas de 1,0 mL e armazenadas a -20°C .

3.4.2. Atividade de LOX

A atividade de LOX foi determinada tendo como substrato o ácido linoléico, segundo o método descrito por AXELROD et al. (1981). Por esse método, foi medido o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

A análise da atividade de LOX foi feita, adicionando-se a 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, 4,0 µL da solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM e 1,0 µL do extrato bruto foliar. A mistura foi agitada e a absorvância da solução, determinada a 234 nm, de 30 em 30 segundos, por um período de 2,5 min. Nessas mesmas condições, procedeu-se às reações-controle, as quais não continham o extrato bruto. Todas as incubações foram realizadas em triplicata.

A partir dos valores de absorvância foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, utilizando-se a seguinte equação:

$$V = \frac{A_{234}}{\epsilon.c.t} \quad (1)$$

em que

A_{234} = absorvância a 234 nm;

ϵ = coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido;

linoléico em 234 nm ($\epsilon = 25.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$);

t = tempo de reação (120 segundos); e

c = caminho ótico (1,0 cm).

3.5. Efeito do pH sobre a atividade de LOX

Nesta análise foram utilizados os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 M:

TAMPÃO	Faixa de pH
Ácido cítrico/fosfato dissódico	2,0-2,5
Ácido cítrico/citrato de sódio	3,0-3,5
Ácido acético/acetato de sódio	4,0-4,5

Ácido cítrico/citrato de sódio	5,0-5,5
Fosfato monossódico/fosfato dissódico	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
Ácido bórico/borato de sódio	9,0-10

A atividade de LOX em cada valor de pH foi determinada como descrito no item 3.4.2. Para cada valor de pH foram realizadas análises em triplicata. A partir das absorvâncias obtidas, calcularam-se as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico, utilizando a equação 1.

3.6. Efeito da temperatura sobre a atividade de LOX

O efeito da temperatura sobre a atividade de LOX foi determinado a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. Foi utilizado banho-maria para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas, como também espectrofotômetro com controle de temperaturas, para que estas se mantivessem estáveis durante as medidas de absorvância.

Em todas as temperaturas testadas, as reações foram determinadas em pH 4,5 (tampão acetato 50 mM) e pH 6,0 (tampão fosfato 50 mM). A atividade de LOX em cada temperatura foi determinada como descrito no item 3.4.2. Para cada valor de temperatura foram realizadas análises em triplicata.

As absorvâncias das soluções a 234 nm foram utilizadas para determinação da atividade de LOX pela equação 1.

3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de LOX

A atividade de LOX foi determinada em pH 6,0 (tampão fosfato 50 mM), à temperatura de 25°C, utilizando-se linoleato de sódio como substrato, nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $4,0 \times 10^{-5}$; $8,0 \times 10^{-5}$; $16,0 \times 10^{-5}$; $32,0 \times 10^{-5}$; $64,0 \times 10^{-5}$; e $128,0 \times 10^{-5}$ M. A atividade de LOX foi determinada pelo método descrito no item 3.4.2.

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio da regressão não-linear, tendo sido utilizado o programa de computação Enzifitter (LEATHERBARROW, 1987).

3.8. Determinação de proteínas totais no extrato bruto

As determinações de proteínas foram realizadas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão, na concentração de 2,0 mg/mL.

O reagente de trabalho para as determinações constituiu de solução de ácido bicinconínico (Sigma Chemical Co.) e solução de sulfato de cobre (II) – pentaidratado 4% (p/v).

Para as dosagens em triplicata, a 50 µL de extrato bruto adicionou-se 1,0 mL do reagente de trabalho [100:2 solução de ácido bicinconínico: solução de sulfato de cobre]. A solução foi colocada em banho-maria a 37°C, onde permaneceu por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo a absorvância lida a 562 nm.

3.9. Inibidores de proteases

3.9.1. Obtenção de extratos foliares

Para determinação dos teores de inibidores de proteases, extratos foliares foram obtidos a 4°C. Folíolos de plantas de soja do tratamento com ácido jasmônico e controle foram triturados em almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM, na proporção 1:3 (p/v). O homogenato obtido foi centrifugado a 17.200 g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos teores de inibidores de proteases e para dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985).

3.9.2. Determinação de inibidores de proteases

Inicialmente, foi preparada uma solução-estoque de tripsina pancreática bovina tipo III (Sigma Chemical Co.) em HCl 1 mM e uma solução-estoque de substrato sintético N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (D,L-BApNA) 60 mM em dimetilsulfóxido, ambas armazenadas a -20°C. A concentração da solução de BApNA utilizada nas análises foi de 1,2 mM em

tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM, a qual foi preparada na hora do uso, mantendo-se estável por cerca de duas horas.

A determinação dos teores de inibidores de tripsina nos extratos foliares foi feita com base na inibição da atividade de tripsina contida em uma solução-padrão. A atividade de tripsina foi feita pelo método descrito por ERLANGER et al. (1961). O extrato foliar (100 µL) foi primeiramente incubado em uma solução contendo 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, e CaCl₂ 20 mM e 50 µL da solução de tripsina 4,166 x 10⁻⁴ M. Na reação controle, o extrato foliar foi substituído pelo tampão Tris-HCl. A solução foi agitada levemente e deixada à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, procedeu-se à determinação da atividade de tripsina, misturando 0,5 mL da solução de incubação; 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, e CaCl₂ 20 mM; e 0,5 mL da solução de D,L-BApNA (1,2 x 10⁻³ M). A mistura foi agitada rapidamente, e sendo a absorvância da solução medida em espectrofotômetro a 410 nm durante dois minutos. As análises foram feitas em triplicata.

Os resultados foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{0,19 \times 1000 \times P} \quad (2)$$

em que

A = absorvância a 410 nm do controle enzimático - absorvância da amostra;

B = diluição da amostra;

0,19 = fator de tripsina, que é igual a 0,019, ou seja, absorvância a 410 nm resultante da hidrólise do substrato D,L-BApNA por 1 µg de tripsina, nas condições da análise (KAKADE et al., 1974); e

P = concentração de proteína em g/mL no extrato, determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do pH sobre a atividade de LOX

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentados os resultados da atividade de LOX em diferentes valores de pH, de extratos foliares de plantas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN, coletadas 24 horas após a pulverização de ácido jasmônico. Os resultados para os tempos 12 e 48 horas após a pulverização se mostraram semelhantes aos de 24 horas e, por isso, não foram apresentados.

A atividade máxima das LOX de folhas da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN, após o tratamento com ácido jasmônico e controle, foi obtida a pH 6,0. Além do pico máximo, observou-se um pico de atividade na faixa de pH mais acídica, em torno de 4,5.

Estudando LOX de folhas de plantas de soja no estágio V4 de desenvolvimento, LANNA et al. (1996) verificaram atividade ótima em pH 6,0 para as variedades IAC-100 e Cristalina. Uma linhagem de soja com ausência das três LOX da semente derivada de IAC-100 apresentou atividade ótima em pH 7,0. Os três genótipos também apresentaram menor atividade em pH 4,5. As pequenas diferenças entre os valores de pH ótimo determinados por LANNA et al. (1996) e aqueles aqui relatados particularmente para o material triplo nulo, deveram-se, muito provavelmente, aos diferentes genótipos

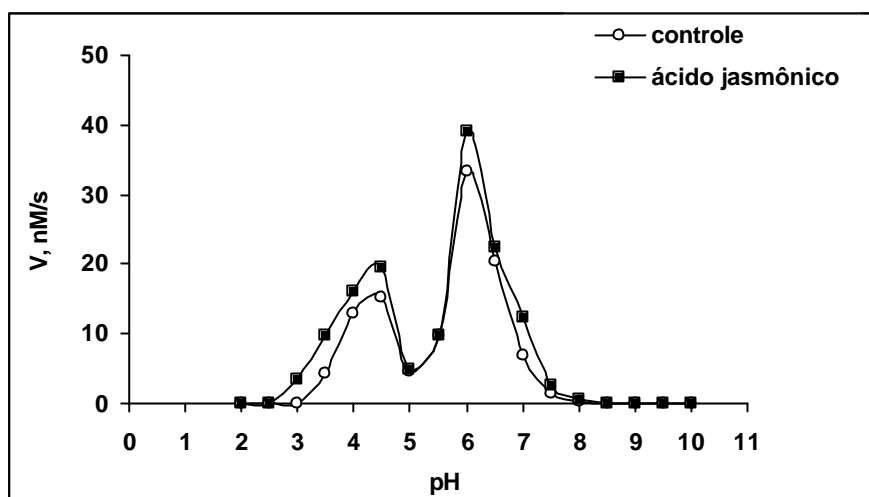


Figura 1 – Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-12 tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12 tratada com JA, 0,89 mg e IAC-12-controle, 0,83 mg/mL.

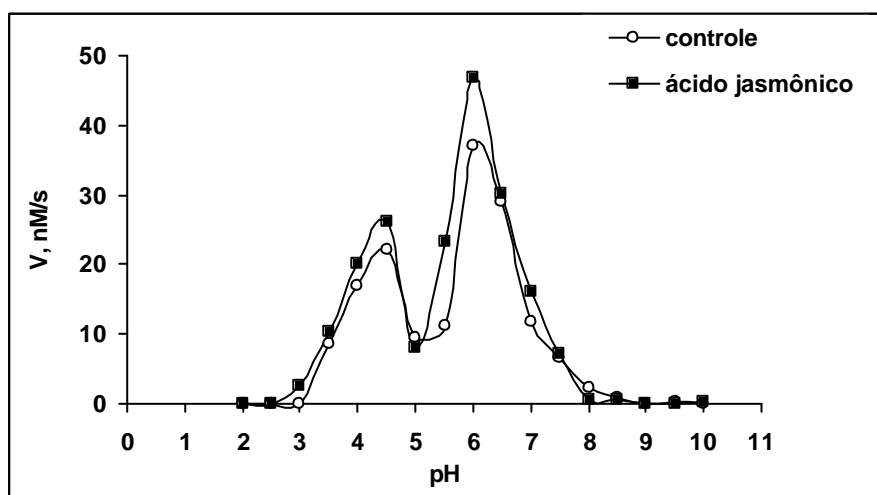


Figura 2 – Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de folhas de soja da linhagem IAC-12 TN tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12TN tratada com JA, 0,79 mg e IAC-12TN-controle, 0,96 mg/mL.

utilizados, aos diferentes graus de isogenia com relação aos progenitores recorrentes e, ou, ao estágio de desenvolvimento analisado.

O ácido jasmônico é reconhecido como molécula sinalizadora sintetizada por plantas em resposta a ferimentos, herbivoria e ataque de patógenos (CREELMAN et al., 1992; FARMER e RYAN, 1992). Analisando o efeito do ferimento em folhas da variedade IAC-100 e da linhagem derivada IAC-100 TN de soja, foram observados dois picos de atividade, a pH 4,5 e 6,0, sendo a resposta local mais pronunciada a pH 4,5 e a sistêmica, a pH 6,0 (VIEIRA, 1999).

GRAYBURN et al. (1991), isolando três frações ativas do extrato foliar de soja, concluíram que as LOX das frações 1 e 2, que apresentaram atividade ótima a pH 6,2 e 5,5, estariam localizadas no vacúolo. Já as LOX da fração 3, cuja atividade ótima foi a pH 8,5, estariam localizadas no estroma do cloroplasto. STEMPHENSON et al. (1998) verificaram a presença de LOX no vacúolo e citosol de células foliares de soja, concluindo que as LOX presentes no vacúolo não atuariam como enzimas ativas e sim como proteínas de reserva vegetativa, ao passo que as LOX localizadas no citosol atuariam como enzimas ativas no processo de partição de nitrogênio e outros assimilados.

A atividade específica nos diferentes valores de pH analisados após 24 horas da aplicação de ácido jasmônico tendeu a ser maior nas plantas tratadas com ácido jasmônico. Essa tendência é particularmente evidente quando se compara IAC-12TN tratada com o respectivo controle (dados não mostrados). Pelos dados apresentados na literatura (GRIMES et al., 1992), é provável que as plantas tenham respondido à aplicação de ácido jasmônico, aumentando a expressão de genes que codificam para LOX.

Em tecidos vegetais, as LOX estão envolvidas na via de síntese de ácido jasmônico, e este atua na ativação gênica de uma série de genes, dentre eles os que codificam para LOX. O acúmulo de transcritos de LOX em resposta a metil jasmonato em plântulas de soja ocorreu no vacúolo das células do mesófilo paraveinal das folhas primárias, ao passo que em outros órgãos LOX se acumulou no vacúolo e em plastídios de células epidérmicas e corticais. Além do aumento dos transcritos, houve aumento da atividade de LOX em resposta ao metil jasmonato (GRIMES et al., 1992).

4.2. Efeito da temperatura sobre atividade de LOX

O efeito da temperatura, a pH 6,0, sobre a atividade de LOX foliares da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN, após 24 horas de aplicação de ácido jasmônico, pode ser constatado nas Figuras 3 e 4. Os dados obtidos para os tempos de 12 e 48 horas se mostraram semelhantes aos de 24 horas, por isso foram omitidos. A atividade de LOX da variedade IAC-12 apresentou pequeno aumento a 25°C, decrescendo gradativamente até a temperatura de 50°C (Figura 3). No caso da linhagem tripla nula, houve pequena variação de atividade de LOX na faixa de temperatura de 20 a 50°C. Observou-se, no entanto, maior atividade a 25 e 40°C. Em ambos os casos, as plantas-controle apresentaram a mesma tendência das plantas tratadas com ácido jasmônico. No entanto, os valores obtidos nas plantas-controle foram, geralmente, menores que os das plantas tratadas (Figuras 3 e 4).

LANNA et al. (1996) obtiveram maiores atividades de LOX foliares a 25°C, a pH 6,0, nas variedades IAC-100 e Cristalina e na linhagem tripla nula derivada de IAC-100. VIEIRA (1999) também verificou que a atividade de LOX é mais acentuada a 25°C, tanto nas plantas feridas como nas plantas-controle da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN.

As análises do efeito da temperatura a pH 4,5 sobre a atividade de LOX foliares da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN, após a aplicação de ácido jasmônico, indicaram aumento gradativo da atividade de LOX com o aumento da temperatura, tanto nas plantas-controle como nas tratadas (Figuras 5 e 6). Portanto, é praticamente impossível separar o efeito da temperatura sobre a atividade de LOX da sua ação sobre a solubilidade do linoleato de sódio. É possível que tais resultados reflitam características bioquímicas do *pool* de LOX foliares nas condições testadas, no entanto se deve salientar que o substrato linoleato de sódio apresenta baixa solubilidade em pH ácido. Com o aumento da temperatura, deve ocorrer elevação da solubilidade do substrato, ocasionando incremento gradativo da atividade de LOX.

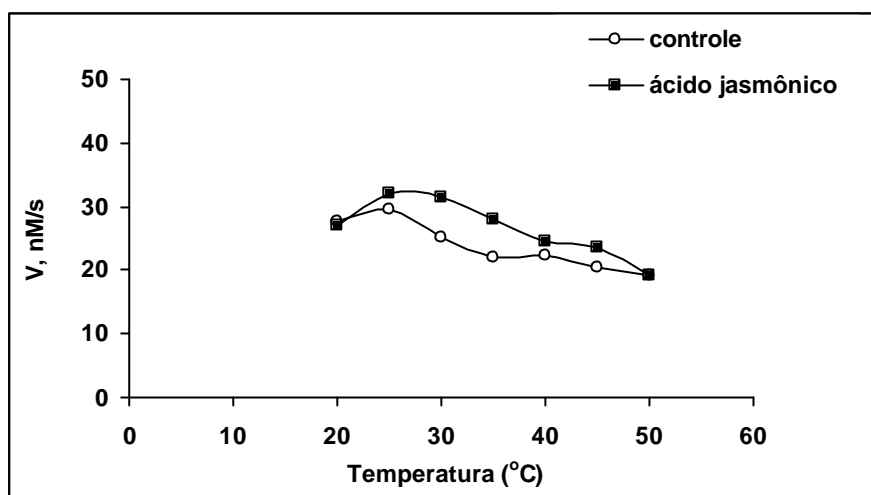


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenase em tampão fosfato de sódio, a pH 6,0, de folhas de soja da variedade IAC-12 tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12 tratada com JA, 0,69 mg e IAC-12-controle, 0,64 mg/mL.

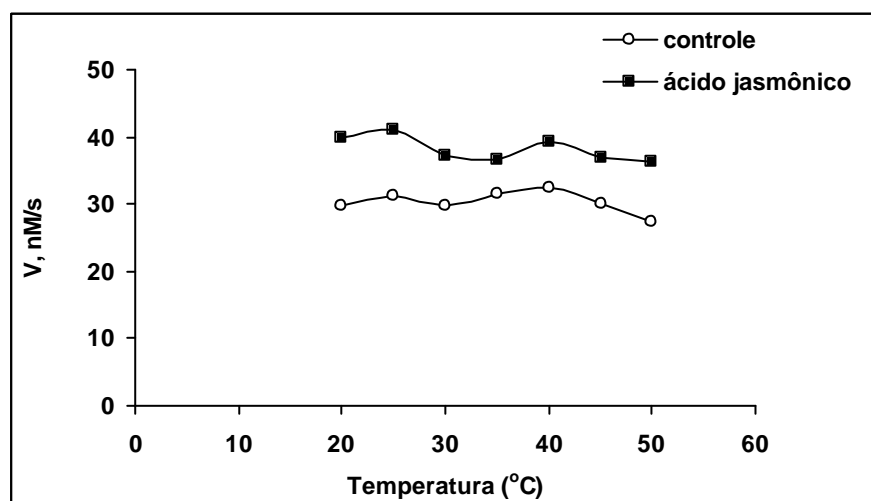


Figura 4 – Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenase em tampão fosfato de sódio, a pH 6,0, de folhas de soja da linhagem IAC-12 TN tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12TN tratada com JA, 0,78 mg; IAC-12TN-controle, 0,84 mg/mL.

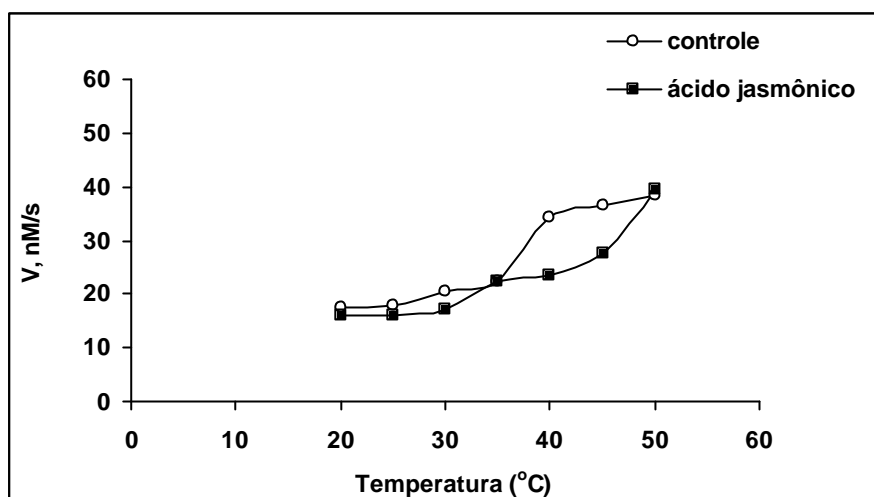


Figura 5 – Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenase em tampão a pH 4,5 de folhas de soja da variedade IAC-12 tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12 tratada com JA, 0,69 mg e IAC-12-controle, 0,64 mg/mL.

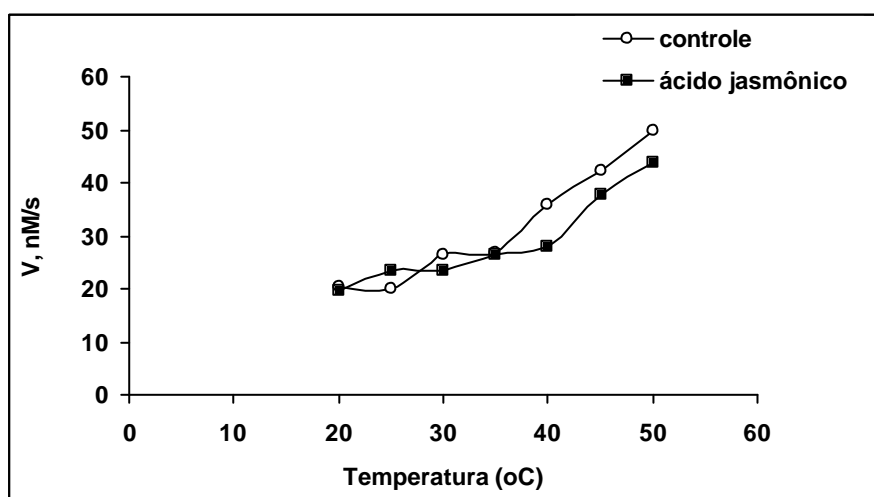


Figura 6 - Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenase em tampão a pH 4,5 de folhas de soja da linhagem IAC-12 TN tratadas com ácido jasmônico e o controle, coletadas após 24 horas. Quantidade de proteínas por reação: IAC-12TN tratada com JA, 0,78 mg e IAC-12TN-controle, 0,84 mg/mL.

4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} de LOX

Nas Figuras 7, 8, 9 e 10 estão apresentados os gráficos do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX de folhas de plantas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12TN, coletadas 24 horas após a pulverização de ácido jasmônico e os respectivos controles. Os gráficos dos demais tempos de tratamento mostraram perfis semelhantes, por isso não foram apresentados.

Os valores de K_M aparente (K_M app) e a velocidade máxima aparente (V_{max} app) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX (V , nM/s) de folhas de plantas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN coletadas 12, 24 e 48 horas após a pulverização com ácido jasmônico e os respectivos controles são apresentados no Quadro 2. Os dados foram ajustados por regressão não-linear pelo método da hipérbole retangular, utilizando-se o software Enzifitter.

A linhagem IAC-12 TN quando tratada com ácido jasmônico apresentou menor K_M app que o controle em todos os tempos. Já na variedade IAC-12 o K_M app foi menor nas plantas-controle em relação às tratadas com ácido jasmônico em todos os tempos. Entretanto, em ambos os casos, as diferenças não foram acentuadas.

Os valores de K_M app nos dois genótipos praticamente não apresentaram diferenças nos vários tempos analisados, apesar do fato de, em 24 horas, o genótipo IAC-12 TN ter apresentado menores valores de K_M , tanto no tratamento com ácido jasmônico quanto no controle em relação à IAC-12.

LANNA et al. (1996) verificaram que o valor de K_M app das LOX foliares de plantas de uma linhagem tripla nula de soja derivada da variedade IAC-100 foi cerca de quatro vezes maior do que o das LOX das variedades IAC-100 e Cristalina. Esses autores relataram que a remoção genética de LOX de semente teria alterado o *pool* de LOX presente na folha. Os resultados deste trabalho não seguiram nessa direção. A semelhança entre os valores de K_M app das LOX dos dois genótipos indicou que o *pool* de LOX foliar não foi alterado com a remoção das LOX de sementes. A discrepância entre os resultados aqui relatados e aqueles obtidos por LANNA et al. (1996) deveu-se, muito provavelmente, aos diferentes genótipos utilizados nos dois trabalhos,

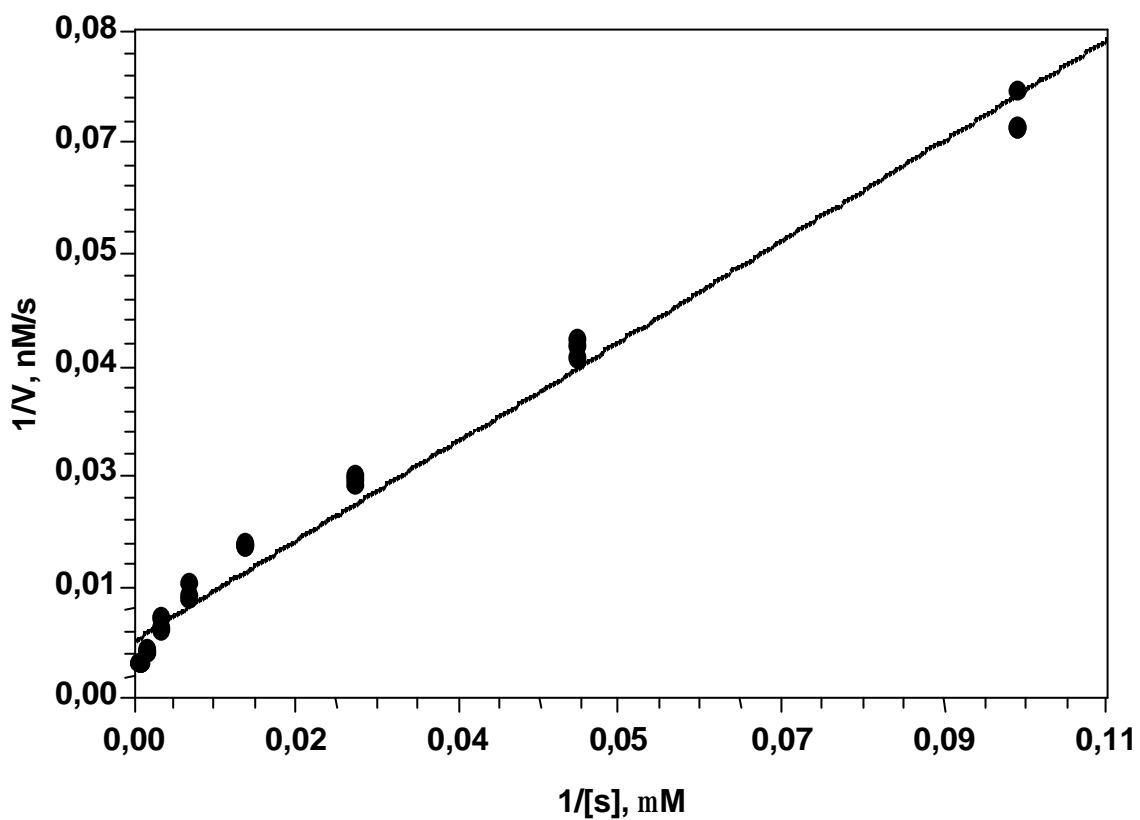


Figura 7 – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX, a pH 6,0 e temperatura de 25°C, de folhas de plantas de soja da linhagem IAC-12 coletadas 24 horas após o tratamento-controle. Quantidade de proteínas por reação: 0,89 mg/mL. A reta foi ajustada pelo método de regressão linear, sendo o coeficiente de correlação para esse ajuste de 0,9903.

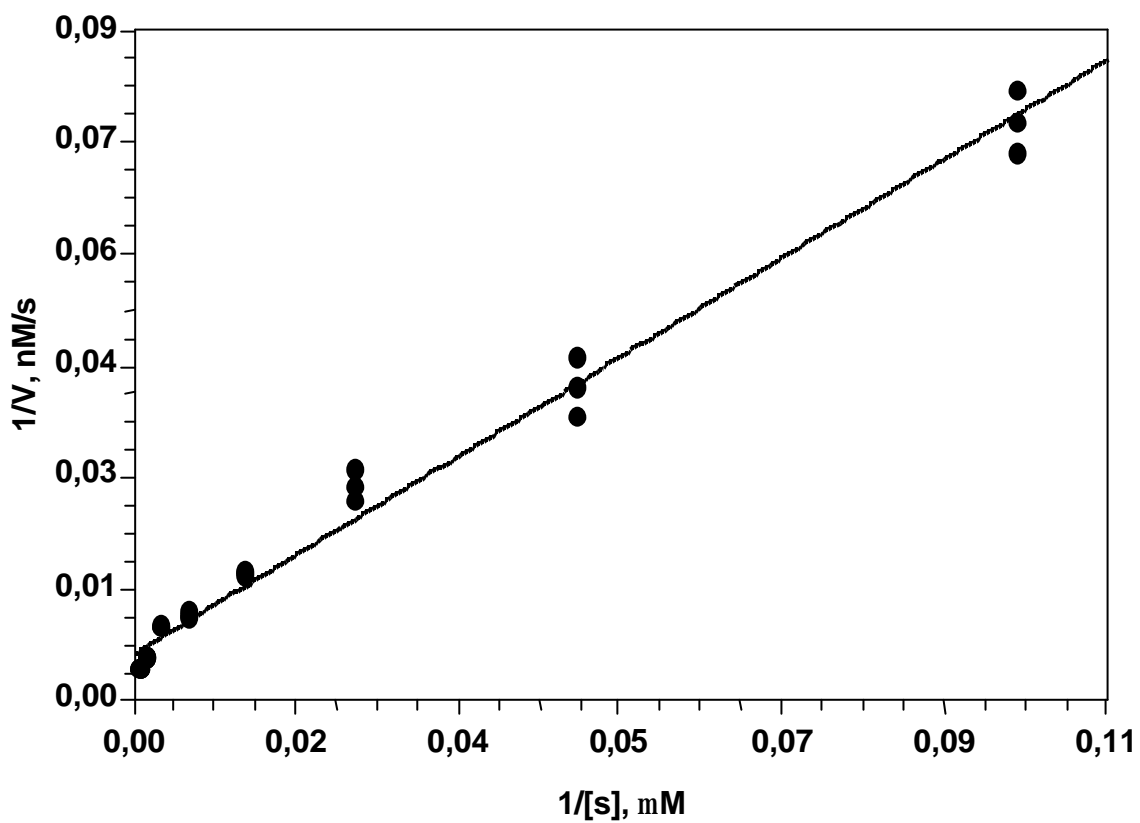


Figura 8 – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX, a pH 6,0 e temperatura de 25°C, de folhas de plantas de soja da linhagem IAC-12 coletadas 24 horas após o tratamento com ácido jasmônico. Quantidade de proteínas por reação: 0,73 mg/mL. A reta foi ajustada pelo método de regressão linear, sendo o coeficiente de correlação para esse ajuste de 0,9918.

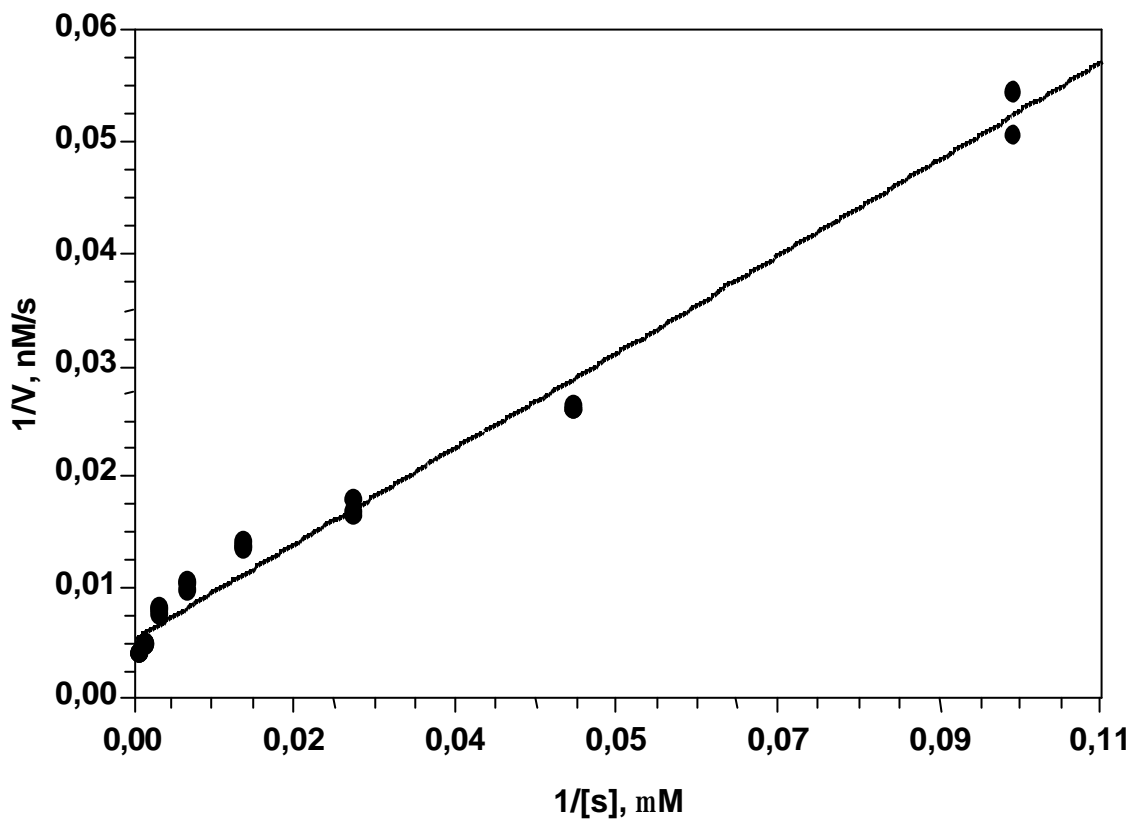


Figura 9 – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX, a pH 6,0 e temperatura de 25°C, de folhas de plantas de soja da linhagem IAC-12 TN coletadas 24 horas após o tratamento-controle. Quantidade de proteínas por reação: 0,98 mg/mL. A reta foi ajustada pelo método de regressão linear, sendo o coeficiente de correlação para esse ajuste de 0,9936.

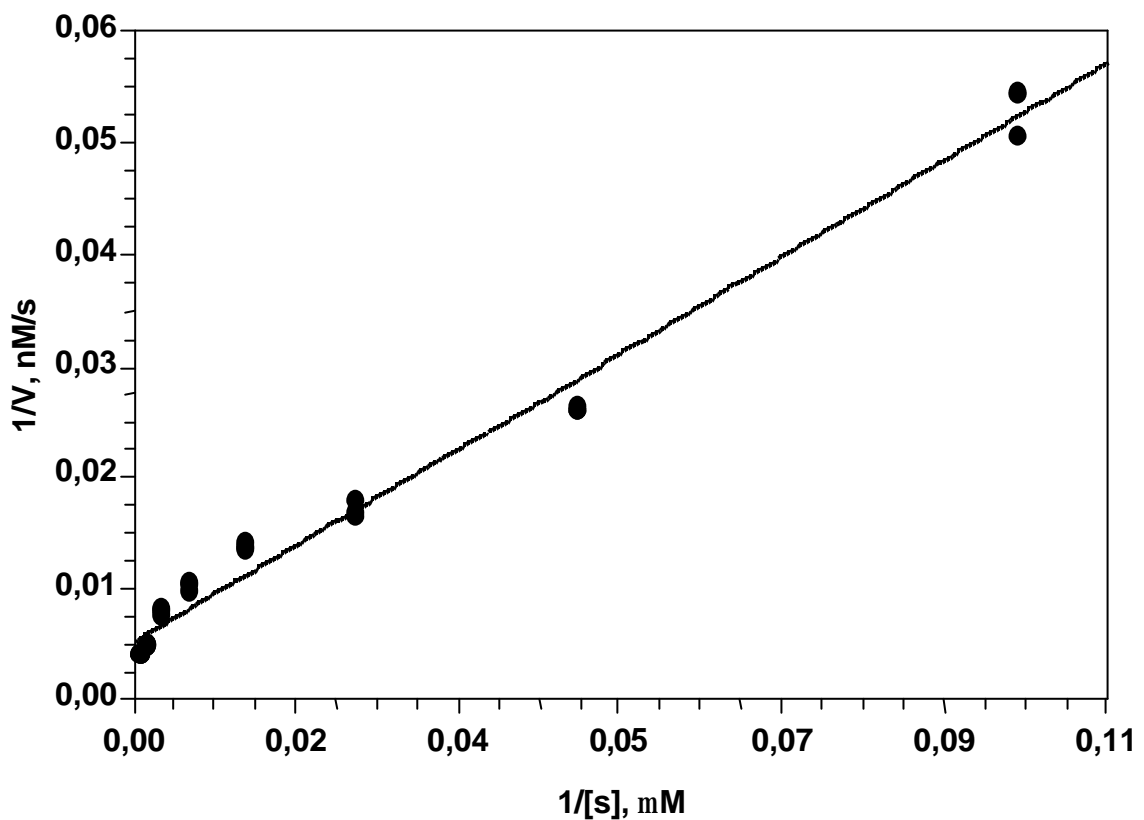


Figura 10 – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX, a pH 6,0 e temperatura de 25°C, de folhas de plantas de soja da linhagem IAC-12 TN coletadas 24 horas após o tratamento com ácido jasmônico. Quantidade de proteínas por reação: 0,84 mg/mL. A reta foi ajustada pelo método de regressão linear, sendo o coeficiente de correlação para esse ajuste de 0,9906.

Quadro 2 – Parâmetro cinético, K_M aparente (K_M app) e velocidade máxima aparente ($V_{max.}$ app) para formação de hidroperóxidos do ácido linoléico pelas LOX foliares de plantas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN tratadas com ácido jasmônico (JA) e seus controles (Cont) após 12, 24 e 48 horas (h). Os parâmetros foram obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzfitter

Tratamento	K_M app (μM)	$V_{max.}$ app (V, nM/s)
IAC-12 Cont 12 h	496	373,95
IAC-12 JA 12 h	497	343,80
IAC-12 TN Cont 12 h	555	345,43
IAC-12 TN JA 12 h	548	345,23
IAC-12 Cont 24 h	457	314,93
IAC-12 JA 24 h	490	319,45
IAC-12 TN Cont 24 h	330	252,05
IAC-12 TN JA 24 h	266	275,33
IAC-12 Cont 48 h	840	357,95
IAC-12 JA 48 h	971	451,18
IAC-12 TN Cont 48 h	844	345,50
IAC-12 TN JA 48 h	763	401,98

aos diferentes graus de isogenia entre o material triplo nulo e as variedades comerciais de onde foram derivados e, ou, ao estágio de desenvolvimento, nos quais as plantas se encontravam durante as análises.

VIEIRA (1999) relatou que o *pool* de LOX que atua na resposta a ferimento da variedade IAC-100 é semelhante ao da linhagem IAC-100 TN, uma vez que os valores de K_M foram semelhantes com relação aos dois genótipos analisados, indicando que a remoção genética das LOX de semente não está interferindo na expressão de genes que codificam para as LOX que atuam no mecanismo de defesa da planta de soja a danos causados por ferimento.

4.4. Determinação dos teores de inibidores de proteases

No Quadro 3 estão apresentados os resultados de inibição da atividade de tripsina por extratos de folhas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem

Quadro 3 – Inibição da atividade de tripsina por extratos foliares de plantas de soja da variedade IAC-12 e da linhagem IAC-12 TN tratadas com ácido jasmônico (AJ) e o controle (Cont) após 12, 24 e 48 horas (h)

Tratamento	Mg de tripsina inibida/grama de proteína
IAC-12 Cont 12 h	0
IAC-12 JA 12 h	0,09 ± 0,05*
IAC-12 TN Cont 12 h	0,25 ± 0,37
IAC-12 TN JA 12 h	0,82 ± 0,11
IAC-12 Cont 24 h	1,18 ± 0,16
IAC-12 JA 24 h	1,2 ± 0,08
IAC-12 TN Cont 24 h	1,24 ± 0,08
IAC-12 TN JA 24 h	2,28 ± 0,12
IAC-12 Cont 48 h	2,4 ± 0,74
IAC-12 JA 48 h	2,57 ± 0,01
IAC-12 TN Cont 48 h	4,26 ± 0,13
IAC-12 TN JA 48 h	5,02 ± 0,14

* valores são a média das análises em triplicata ± desvio-padrão

IAC-12 TN coletadas 12, 24 e 48 horas após o tratamento com ácido jasmônico e os respectivos controles. Na variedade IAC-12, não se observou aumento da inibição da atividade trípica no tratamento com ácido jasmônico, enquanto na linhagem IAC-12 TN houve aumento da inibição em resposta a esse tratamento, em todos os tempos analisados.

Genes para inibidores de proteases podem ser ativados como resultado indireto da atividade de LOX via metil jasmonato. Os resultados de inibição de proteases aqui encontrados podem ser em decorrência direta do ácido jasmônico aplicado, bem como do ácido jasmônico endógeno produzido pelo aumento da atividade de LOX, cujos genes também são ativados por esse composto. FARMER et al. (1992) demonstraram que em folhas de tomate a expressão gênica dos inibidores de proteases é regulada por jasmonatos. FIDANTSEF e BOSTOCK (1998), trabalhando com folhas destacadas de batata, detectaram transcritos de inibidores de proteases PIN2 seis horas após o tratamento com ácido jasmônico, os quais se acumularam em altos níveis.

Acredita-se que os inibidores de proteases sejam componentes essenciais na resposta de resistência ao ataque de insetos e patógenos. Foi observado que um mutante de tomate, deficiente na biossíntese de ácido jasmônico, não acumula inibidor de proteases em resposta a ferimento e apresenta suscetibilidade ao ataque de insetos (HOWE et al., 1996). Os resultados obtidos para o genótipo com ausência de lipoxigenases na semente indicaram que a remoção genética dessas isoenzimas não alterou a resposta de defesa da planta a agentes externos que levam à síntese de inibidores de proteases.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de avaliar se a eliminação genética de lipoxigenases (LOX) das sementes de soja não alterou processos fisiológicos que seriam normalmente desempenhados por LOX foliares, determinaram-se parâmetros bioquímicos do *pool* de LOX em variedade comercial de soja (IAC-12) e em linha quase-isogênica dela derivada, com ausência de LOX em suas sementes (IAC-12 TN), submetidas à aplicação de ácido jasmônico. Os resultados do estudo cinético-bioquímico do *pool* de LOX foliares revelaram que o pH ótimo foi semelhante entre os dois genótipos, em torno de pH 6,0. Observou-se também um segundo pico de atividade na faixa de pH mais acídica, em torno de pH 4,5. As análises de temperatura indicaram maior atividade, em torno de 25°C em pH 6,0, em ambos os genótipos. O parâmetro cinético K_M aparente foi menor no tempo de 24 horas em ambos os genótipos, tratados ou não com ácido jasmônico. O genótipo IAC-12 apresentou maior K_M app quando tratado com ácido jasmônico, ao passo que IAC-12 TN exibiu menor K_M app quando tratado do que o controle, entretanto, em ambos os casos, as diferenças não foram acentuadas. Os valores de inibição da atividade de tripsina aumentaram no genótipo IAC-12 TN em resposta à aplicação de ácido jasmônico.

Os dados indicaram que a remoção genética das LOX de semente de soja não tem influenciado o *pool* de LOX foliares nem a sua resposta ao ácido jasmônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, T., KEHLEN, A., STAHL, K., KNOFEL, H.-D., SEMBDNER, G., WEILER, E.W. Quantitation of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. **Planta**, v.191, p.86-94, 1993.
- ANDERSON, J.M., SPILATRO, S.R., KLAUER, S.F., FRANCESCHI, V.R. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, v.62, p.45-52, 1989.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods. Enzymol.**, v.71, p.441-451, 1981.
- BELL, E., MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiol.**, v.103, p.1133-1137, 1993.
- BILD, G.S., RAMADOSS, C.S., AXELROD, B. Effect of substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenase isozymes. **Lipids**, v.12, p.732-735, 1977.
- BOHLAND, C., BALKENHOHL, T., LOERS, G., FEUSSNER, I., GRAMBOW, H.J. Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v.114, p.679-685, 1997.
- BUNKER, T.W., KOETJE, D.S., STEPHENSON, L.C., CREELMAN, R.A., MULLET, J.E., GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, v.7, p.1319-1331, 1995.
- CHRISTOPHER, J.P., PISTORIUS, E.K., AXELROD, B. Isolation of third isozyme of soybean lipoxygenase. **Biochim. Biophys.**, v.284, p.54-62, 1972.

- COELHO, I.C.C. **Caracterização físico-química das lipoxigenases 1 e 2 da semente de soja**. Viçosa-MG, 82p. 1993. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- CONCONI, A., MIQUEL, M., BROWSE, J.A., RYAN, C.A. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. **Plant Physiol.**, V.111, p.797-803, 1996
- CREELMAN, R. A., TIERNEY, M. L., MULLET, J. E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.4938-4941, 1992.
- CROFT, K.P.C., JÜNTTER, F., SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. **Plant Physiol.**, v.101, p.13-24, 1993.
- DAMMANN, C., ROJO, E., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.773-782, 1997.
- DROILLARD, M.J., ROUET-MAYER, M.A., BUREAU, J.M., LAURIÈRE, C. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. **Plant Physiol.**, v.103, p.1211-1219, 1993.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.95, p.271-278, 1961.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid active the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, v.4, p.129-134, 1992.
- FARMER, E.E., RUSSELL, R.J., RYAN, C.A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. **Plant Physiol.**, v.98, p.995-1002, 1992.
- FEHR, W. R., CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. Special Report 80. **Cooperative Extension Service**, Iowa State University, Ames, Iowa, 1977, 11p.
- FEUSSNER, I., WASTERNAK, C., KINDL, H., KUHN, H. Lipoxygenase-catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.11849-11853, 1995.

- FEUSSNER, I., HAUSE, B., NELLEM, A., WASTERACK, C., KINDL, H. Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. **Planta**, v.198, p.288-293, 1996.
- FIDANTSEF, A.L., BOSTOCK, R.M. Characterization of potato tuber lipoxygenase cDNAs and lipoxygenase expression in potato tubers and leaves. **Physiologia Plantarum**, v.102, p.257-271, 1998.
- FRANCESCHI, V.R., GRIMES, H.D. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.6745-6749, 1991.
- GARDNER, H. W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1084, p.221-239, 1991.
- GEERTS, A., FELTKAMP, D., ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant physiol.**, v.105, p.269-277, 1994.
- GRAYBURN, W.S., SCHNEIDER, G.R., HAMILTON-KEMP, T.R., BOOKJANS, G., ALI, K., HILDEBRAND, D.F. Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. **Plant physiol.**, v.95, p.1214-1218, 1991.
- GRIMES, H.D., KOETJE, D.S., FRANCESCHI, V.R. Expression, activity and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. **Plant Physiol.**, v.100, p. 433-443, 1992.
- GROSSMAN, S., BEM-AZIZ, A., ASCARELLI, I., BUDOWSKI, P. Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves. **Phytochemistry**, v.11, p.509-514, 1972.
- HATANAKA, A., KAJIWARA, T., SERIYA, J., IMOTO, M., INOUE, S. Participation and properties of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. **Plant e Cell Physiol.**, v.23, p.91-99, 1982.
- HEITZ, T., BERGEY, D.R., RYAN, C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v.114, p.1085-1093, 1997.
- HERDE, O., ATZORN, R., FISAHN, J., WASTERACK, C., WILLMITZER, L., PENA-CORTÉS, H. Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. **Plant Physiol.**, v.112, p.853-860, 1996.
- HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.249-253, 1989.

- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plants Biochemistry and Physiology**, v.7, p.201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D.F., KITO, M. Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. **J. Agric. Food Chem.**, v.32, p.815-819, 1984.
- HOWE, G.A., LIGHTNER, J., BROSE, J., RYAN, C.A. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **Plant Cell**, v.8, p.2067-2077, 1996
- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, n.51, p. 376-382, 1974.
- KATO, T., OHTA, H., TANAKA, K., SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. **Plant Physiol.**, v.95, p.324-330, 1992.
- KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. Soybean lipoxigenase L-4, a component of the 94-Kilodalton storage protein in vegetative tissues- Expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiol.**, v.34, p.1063-1072, 1993.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., KAIZUMA, N., NIELSON, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v.23, p.924-927, 1984.
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.8, n.2, p.87-92, 1996.
- LEATHERBARROW, R.J. Enzifitter manual. **Biosoft, London**. p.13-42, 1987.
- MACK, A.J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.
- MACRÍ, F., BRAIDOT, E., PETRUSSA, E., VIANELLO, A. Lipoxygenase activity of plasmalemma and its relation to plant cell senescence and stress response. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v.30, p.81-87, 1995.
- MAUCH, F., KMECL, A., SCHAFFRATH, U., VOLRATH, S., GORLACH, J., WARD, E., RYALS, J., DUDLER, R. Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat, . **Plant Physiol.**, v.114, p.1561-1566, 1997.

- MELAN, M.A., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS, K.R., AUSUBEL, F.M., PETERMAN, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v.101, p.441-450, 1993.
- MUELLER, M.J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.653-663, 1997.
- OHTA, H., SHIDA, K., PENG, Y.-L., FURUSAWA, I., SHISHIYAMA, J., AIBARA, S., MORITA, Y. A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Physiol.**, v.97, p.94-98, 1991.
- PARK, T.K., HOLLAND, M.A., LASKEY, J.G., POLACCO, J.C. Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, v.96, p.109-117, 1994.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S., RYAN, C. A. polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v.235, p.895-898, 1991.
- REINBOTHE, C., PARTHIER, B., REINBOTHE, S. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. **Planta**, v.201, p.281-287, 1997.
- RICKAUER, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., VÉRONÉSI, C., GRIMAL, H., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. **Planta**, v.202, p.155-162, 1997.
- ROUET-MAYER, M., BUREAU, J., LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiol.**, v.98, p.971-978, 1992.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves. Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiol.**, v.107, p.535-545, 1995.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The differential expression of wound - inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiol.**, v.110, p.287-299, 1996.
- SEKIYA, J., KAJIWARA, T., MUNECHIKA, K., HATANAKA, A. Distribution of lipoxygenase and hidroperoxide lyase in the leaves of various plant species. **Phytochemistry**, v.22, p.1867-1869, 1983.
- SEO, S., SANO, H., OHASHI, Y. Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. **Physiologia Plantarum**, v.101, p.740-745, 1997.

- SHIBATA, D., STECZKO, J., DIXON, J.E., HERMODSON, M., YAZDANPARASR, R., AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.10080-10085, 1987.
- SIEDOW, J.N. Plant Lipoxygenase: structure and function. **Annu. Revision Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.42, p.145-188, 1991.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v.15, p.76-85, 1985.
- STEPHENSON, L.C., BUNKER, T.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol.**, v.116, p.923-933, 1998.
- TRANBARGER, T.J., FRANCESCHI, V.R., HILDEBRAND, D.F., GRIMES, H.D. The soybean 94-Kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **Plant Cell**, v. 3, p.973-987, 1991.
- VAUGHN, S.F., GARDNER, H.W. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. **J. Chem. Ecol.**, v.19, n.10, p.2337-2345, 1993.
- VICK, B.A., ZIMMERMAN, D.C. Lipoxygenase and hidroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. **Plant Physiol.**, v.57, p.780-788, 1976.
- VIEIRA, A.A. Caracterização da via das lipoxigenases de folhas de soja submetidas a fermento. Viçosa-MG, 60p. 1999. Dissertação (mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- WASTERNAK, C., PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, v.2, p.302-307, 1997.
- ZHUANG, H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A, HILDEBRAND, D.F. Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. **Plant Physiol.**, v.100, p.80-87, 1992.