

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se plantas das linhagens Doko normal e Doko triplo nula (desprovidas das lipoxigenases da semente), inoculadas e não inoculadas, avaliou-se os valores de  $K_{M\ app}$ , atividade e "immunoblotting" de lipoxigenases de raiz, nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e de nódulo nos tempos 10, 15 e 25 dias após emergência. Os valores de  $K_{M\ app}$  para raiz de Doko normal e Doko triplo nula apresentaram a mesma tendência de aumento no período estudado, indicando que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou a expressão dos genes para lipoxigenases da raiz. Os valores de  $K_{M\ app}$  para nódulo foram similares para Doko normal e Doko triplo nula e para os três tempos analisados, sugerindo que "pool" de lipoxigenases expresso nesse órgão é o mesmo nessas duas linhagens no período estudado.

A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, declinou com o passar do tempo. Essa maior atividade de lipoxigenases no início de formação de raiz, sugere o envolvimento dessa enzima no crescimento e desenvolvimento desse órgão. Contudo, para nódulos ocorreu um aumento acentuado de atividade de lipoxigenase aos 25 dias após emergência em um estágio de desenvolvimento, no qual tem-se baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio nesse órgão, sugerindo que as lipoxigenases expressas no nódulo estão envolvidas com o armazenamento de nitrogênio, similar ao que tem sido proposto para lipoxigenases em folhas de soja.

Raiz e nódulo apresentaram, pelo menos, dois grupos de mobilidade para lipoxigenases nos "immunoblottings", similares aos de semente, com aproximadamente 94 e 97 KDa. A intensidade das bandas imuno-reativas em raiz difere dos resultados observados com atividade de lipoxigenase nesse tecido, sugerindo que essas lipoxigenases poderiam ter algum controle pós-traducional. No nódulo, a intensidade das bandas imuno-reativas confirmam os resultados obtidos com atividade de lipoxigenase, sugerindo que as variações de atividade dessa enzima nesse órgão são, principalmente, devido às variações na concentração dessa enzima.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAASKO, S.L. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- ALTSCHULER, M.; GRAYBURN, W.S.; COLLINS, G.B. & HILDEBRAND, D.F. Developmental expression of lipoxygenases in soybeans. **Plant Science**, 63:151-158, 1989.
- BELL E. & MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, 103:1133-1137, 1993.
- 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 vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid levels remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995
- CROFT, K.P.C.; JUTTNER, F. & SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L. leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica*. **Plant Physiology**, 101:13-14, 1993.
- EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A.J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, 5(1):123-135, 1994.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service and Agriculture and Home Economics Experiment Station. Special Report, 80. Yowa State University, Ames. 11p. 1977.
- FERRIE, B.J.; BEAUDOIN, N.; BURKHART, W.; BOWSER, C.G. & ROTHSTEIN S.J. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. **Plant Physiology**, 106:109-118, 1994.
- GAGE, D.J.; BOBO, T. & LONG, S.R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, 178: 7159-7166, 1996.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.

- GARDNER, C.D.; SHERRIER, D.J.; KARDAILSKY, I.V. & BREWIN, N.J. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: Identification of lipoxygenase in the lumen of infections threads. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:282-289, 1996.
- GEERTS, A.; FELTKAMP, D. & ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiology**, 105:269-277, 1994.
- GRIMES, H.D.; TRANBARGER, T.J. & FRANCESHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. **Plant physiology**, 103:457-466, 1993.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.
- HILDEBRAND, D.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S. & BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, 7:201-219, 1988.
- HIRSCH, A.M. & KAPULNIK, Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, 23:205-212, 1998.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin** N° 347, 1938, p.32.
- KATO, T.K.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, 98:324-330, 1992.
- KEPPLER, L.D. & NOVACKY, A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reactions. **Physiology Molecular Plant Biology**, 30:233-245, 1987.
- KOCH, E.; MEIER, B.M.; EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic pseudomonas. **Plant Physiology**, 99:571-576, 1992.
- KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **Int. Ver. Cytol.**, 135:155-199, 1992.

- 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**, 8(2):87-92, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- LEATHERBARROW, R. J. **Enzfitter manual**. Biosoft. London, p.13-42, 1987.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, 13:127-154, 1987.
- MATSUI, K.; KAJIWARA, T.; HAYASHI, K. & HATANAKA, A. Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. **Agricultural Biological Chemistry**, 52(12):3219-3221, 1988.
- MELAN, M.A.; DONG, X.N.; 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 Physiology**, 101:441-450, 1993.
- NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; HAJIKA, M.; IGITA, K. & SUDA, I. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:738-741, 1995.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B. & MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. **Plant Cell Physiology**, 27(5):911-18, 1986.
- OHTA, H.; SHIDA, K.; PENG, Y.L.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J.; AIBARA, S. & MORITA, Y. The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. **Plant Cell Physiology**, 31:1117-1122, 1990.
- OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; MORAIS, R.M.A.; ROCHEBOIS, G.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identification of the three classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Review Biotechnology Techniques**, 12(1):71-74, 1998.
- PALIYATH, G. & DROILLARD, M.J. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, 30:789-812, 1992.

- PARTHIER, B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. **Bot. Acta**, 104:446-454, 1991.
- PENG, Y.L.; SHIRANO, Y.; OHTA, H.; HIBINO, T.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. A novel lipoxygenase from rice – primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. **Journal of Biological Chemistry**, 269:3755-3761, 1994.
- PERLICK, A.M.; ALBUS, U.; STAVIDRIS, T.; FRUHLING, M.; KUSTER, H. & PUHLER, A. The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:860-863, 1996.
- PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Immunological comparison of lipoxygenase isozymes-1 and -2 with soybean seedling lipoxygenases. **Archives Biochemistry Biophysics**, 238:476-483, 1985.
- PINSKY, A.; GROSSMAN, S. & TROP, M. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, 36:571-572, 1971.
- PORTA, H.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; CAMPOS, F.; COLMENERO-FLORES, J.M.; COLORADO, J.M.; CARMONA, M.J.; COVARRUBIAS, A.A. & ROCHA-SOSA, M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant Cell Physiology**, 40(8):850-858, 1999.
- PRUSKY, D.; KOBILER, I.; JACOBY, B.; SIMS, J.J. & MIDLAND, S.L. Inhibitors of avocado lipoxygenase; their possible relationship with the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, 27:269-279, 1985.
- ROUET-MAYER, M.A.; BUREAU, J.M. & LAURIERE, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiology**, 98:971-978, 1992.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, 110:287-299, 1996.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: Structure and function. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 42:145-188, 1991.

- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARDNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OOLSON, B.J. & KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, 150:76-85, 1985.
- SONG, W.C. & BRASH, A.R. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. **Science**, 253:781-784, 1991.
- SUDA, I.; HAJIKI, M.; NISHIBI, Y.; FURURTA, S. & KAZUNORI, I. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:742-747, 1995.
- SZCZYGLOWSKI, K.; HAMBURGER, D.; KAPRANOV, P. & BRUIJN, F.J. Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. **Plant Physiology**, 114:1335-1346, 1997.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRANT, 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**, 3:973-987, 1991.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E.(eds.) **The Biochemistry of Plants**. v. 9, Orlando:Academic Press,1987. p.53-97.
- VIEIRA, A.A. **Caracterização das vias das lipoxigenases de folhas de soja submetidas a fermento**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999. 60p. Tese de Mestrado.
- YAMAMOTO, H. & TANI, T. Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to *Puccinia coronata avenae*. **Journal Phytopathology**, 116:329-337, 1995.

## CAPÍTULO 3

### ISOLAMENTO DE UM cDNA PARCIAL DE LIPOXIGENASE DE NÓDULOS DE SOJA

#### 1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases catalisam a hidroxidação de ácidos graxos contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno. Em vegetais, produtos das vias das lipoxigenases estão envolvidos na biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios como jasmonatos e aldeídos (Vick & Zimmerman, 1987; Hildebrand, 1989; Gardner, 1991; Song & Brash, 1991).

Vários clones de cDNA ou genômicos de lipoxigenases têm sido isolados em diferentes espécies vegetais demonstrando uma expressão órgão-específica diferencial (Melan et al., 1993; Eiben & Slusarenko, 1994; Royo et al., 1996; Saravitz & Siedow, 1996). Em soja, lipoxigenases estão organizadas em uma grande família multigênica, consistindo de, pelo menos, oito genes altamente conservados (Bunker et al., 1995). Três desses membros (LOX 1, LOX 2 e LOX 3) estão associados à semente (Shibata et al., 1987; Shibata et al., 1988; Yenofsky et al., 1988) e os outros cinco membros denominados VLX A, B, C, D e E (Bunker et al., 1995), estão associados a diferentes tecidos vegetativos. Os membros da família multigênica *vlx* para soja tiveram suas seqüências de cDNA ou genômicas, parciais ou completas, identificadas por vários grupos (Bell & Mullet, 1991; Shibata et al., 1991; Kato et al., 1992; Kato et al., 1993; Park et al., 1994; Bunker et al., 1995; Bunker & Grimes, 1996; Saravitz & Siedow, 1996).

Lipoxigenases têm sido encontradas em nódulos de *Vicia faba* (Perlick et al., 1996), *Pisum sativum* (Gardner et al., 1996), *Lotus japonicus* (Szczyglowski et al., 1997) e *Phaseolus vulgaris* (Porta et al., 1999). Um cDNA completo, codificando uma lipoxigenase (VfLOX1) foi obtido em uma biblioteca de cDNA de nódulos de *Vicia faba*, apresentando forte expressão nos nódulos e fraca expressão nas raízes. Os transcritos de VfLOX1 foram localizados fora dos

tecidos infectados, no parênquima do nódulo e ao redor do estelo radicular (Perlick et al., 1996). Antígenos de lipoxigenase foram encontrados no lúmen da via de infecção de plantas de ervilha (Gardner et al., 1996), no parênquima de nódulos e nas células não infectadas de plantas de feijão (Porta et al., 1999). Esses trabalhos sugerem que lipoxigenases têm papel importante nos nódulos.

Esse trabalho teve como objetivo isolar um clone de cDNA constituinte da família multigênica de lipoxigenase a partir de RNA de nódulos de soja, como trabalho inicial no entedimento de possíveis funções de lipoxigenase nesse órgão.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizadas plantas de soja da variedade Doko. As sementes foram esterilizadas com álcool 70% por um minuto, com água oxigenada 6% por 5 minutos, lavadas abundantemente com água autoclavada e colocadas para germinar em vasos plásticos com capacidade de 3 litros (uma semente por vaso), contendo areia previamente lavada com água autoclavada. As plantas foram inoculadas na emergência, com 1 mL de uma cultura de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CPAC 15 ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) e cultivadas em condições de casa de vegetação.

A partir do estágio V<sub>1</sub> (Fehr & Caviness, 1977) foram fornecidos 100 mL de solução nutritiva sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1938), duas vezes por semana. O suprimento de água foi feito sempre que necessário.

Na primeira semana de cultivo, as plantas inoculadas receberam, além de macro e micronutrientes, 7,5 µmoles/L de cobalto na forma de CoCl<sub>2</sub>.

Raízes e nódulos foram coletados aos 25 dias após emergência, congelados em nitrogênio líquido logo após a sua coleta e armazenados a -80 °C, até que fossem utilizados para a extração de RNA.

### 2.2. Isolamento de RNA total

Todas as etapas para isolamento do RNA foram conduzidas a 4 °C, sendo todas as soluções usadas tratadas com um inibidor de RNase, o dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%, a 37 °C, por três horas, e, em seguida, autoclavadas.

Cerca de 200 mg de raízes e nódulos da variedade de soja Doko, 25 dias após emergência, foram triturados em nitrogênio líquido. A cada amostra foram adicionados 500 µL de tampão de extração (citrato de sódio 25 mmoles/L, pH 7,0; isotiocianato de guanidina 4 moles/L; lauril sarcosine de sódio 1,5%; e β-mercaptoetanol 100 mmoles/L) e 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico

(24:24:1) (Wadsworth et al., 1988). A amostra foi vigorosamente agitada em vórtex, por 15 segundos. As fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação a 16.000 g, por cinco minutos. A fase aquosa foi re-extraída com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1) por mais duas vezes. A fase aquosa foi adicionada de 400 µL de LiCl 6 mmoles/L e incubada no gelo por, no mínimo, 60 minutos. O RNA foi coletado por centrifugação a 16.000 g por 10 minutos e o precipitado, ressuspensão em 1 mL de LiCl 3 moles/L, sendo, então, centrifugado por 10 minutos a 4 °C. Essa fase de lavagem foi repetida mais duas vezes, nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspensão em 400 µL de acetato de potássio 2% e o RNA, re-precipitado pela adição de 1 mL de etanol e incubação por 12 horas, a -20 °C. O RNA foi separado por centrifugação a 16.000 g por 15 minutos, lavado em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80 °C até o seu uso. A integridade do RNA isolado foi avaliada por eletroforese em géis de agarose 1,8% contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo.

### **2.3. RT-PCR**

As amostras de RNA total de raízes e nódulos da variedade Doko, 25 dias após emergência, foram usadas nas reações de RT-PCR. As amostras, antes de serem amplificadas, foram tratadas com “RQ1 RNase-free Dnase” (Promega), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão “RQ1 Rnase-free Dnase” 1X (Tris-HCl 40 mmoles/L, pH 8,0; MgSO<sub>4</sub> 10 mmoles/L e CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) por 30 minutos a 37 °C, extraídas com igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1), re-extraída com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e precipitadas pela adição de acetato de sódio e etanol. O RNA foi incubado a -20 °C por, no mínimo, 12 horas e, depois, coletado por centrifugação a 16.000 g por 30 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado à temperatura ambiente e ressuspensão em água.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada, usando-se o “SuperScript Kit Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” (Life Technologies),

de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (2,5 µg) foram incubadas com 0,5 µg de oligo (dT)<sub>12-18</sub> a 70 °C por 10 minutos e, em seguida, incubadas no gelo. Logo após, foram adicionados às amostras tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mmoles/L, pH 8,4 e KCl 50 mmoles/L), MgCl<sub>2</sub> 5 mmoles/L, os quatro dNTP 0,5 mmol/L cada e DTT (ditiotreitól) 5 mmoles/L, as quais foram incubadas a 42 °C por 5 minutos. Em seguida foram adicionadas 200 U da enzima “SuperScript II Rnase H - Reverse Transcriptase” (Life Technologies), sendo as amostras incubadas por mais 50 minutos a 42 °C. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de Rnase H (Life Technologies) a 37 °C, por 20 minutos. Para cada amostra, foi feito um controle negativo, que continha todos os reagentes, menos a Transcriptase Reversa.

As reações de síntese da segunda fita e de amplificação foram conduzidas no termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94 °C, por um minuto, seguido de 35 ciclos (a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por um minuto e 72 °C por dois minutos) e período adicional de polimerização a 72 °C por sete minutos. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,4 pmol de “primers” específicos para lipoxigenases, F – 5’-CCTGCAACAGAAGGTGTTGA-3’ e R – 5’-TGGCCAAGGTAGACCTCATC-3’, 2,5 µL da reação de síntese da primeira fita, KCl 50 mmoles/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L e Tris-HCl 10 mmoles/L, pH 8,3. Nessa etapa foi feita uma reação controle, usando-se os “primers” de actina 3 de soja (Shah et al., 1982), F – 5’-CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG-3’ e R – 5’-GGAATCTCTCTGCCCAATTGTTG-3’, com as finalidades de verificar a contaminação com DNA genômico e normalizar as concentrações de cDNA-molde. Na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação, com os “primers” de actina 3 de soja, produz um fragmento de 520 pb, ao passo que na presença de cDNA se observa a presença de um fragmento de 440 pb, devido à presença de um intron de 80 pb.

Os “primers” específicos para lipoxigenases de soja para síntese da segunda fita do RT-PCR foram desenhados pelo programa “Primer3 Input Program” (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), a partir de uma região altamente conservada entre os vários membros da família gênica de lipoxigenase expressos em folhas de soja, *v1xC*, com provável função de reserva vegetativa (acesso U26457; Bunker et al., 1995), depositada no “*GenBank*”, usando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados por meio de luz ultravioleta.

#### **2.4. Clonagem molecular**

O vetor usado nas clonagens de fragmentos com extremidades abruptas foi o pGEM-T, usando-se o “pGEM-T Easy Kit” (Promega).

As reações de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foram feitas usando-se a enzima T4 DNA Ligase (Life Technologies) em volume final de 10-15  $\mu$ L, de acordo com as técnicas de clonagem descritas por Sambrook et al. (1989) e Ausubel et al. (1998). As reações de ligação foram conduzidas em Tris-HCl 50 mmoles/L, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mmoles/L; ATP 1mmol/L; DTT 1mmol/L; PEG 8.000 5%; o fragmento a ser clonado e o vetor, na proporção 3:1; e T4 DNA Ligase. A reação foi incubada a 4 °C, por 24 horas.

As células competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram preparadas de acordo com Inoue et al. (1990). Essas células foram crescidas em meio SOB (bactotripton 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mmoles/L; KCl 2,5 mmoles/L; MgCl<sub>2</sub> 10 mmoles/L; e MgSO<sub>4</sub> 10 mmoles/L, pH 7,0) até atingirem uma OD<sub>600</sub> de 0,6, sendo posteriormente incubadas a 0 °C, por 10 minutos, e concentradas por centrifugação a 2.500 g por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em meio TB {PIPES (piperazina-N,N’-bis [2-ácido etanossulfônico] 10 mmoles/L; MnCl<sub>2</sub> 55 mmoles/L; CaCl<sub>2</sub> 15 mmoles/L; e KCl 250 mmoles/L, pH 6,7} e incubadas por mais 10 minutos a 0 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 2.500 g

por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas, novamente em meio TB e DMSO (dimetilsulfóxido de sódio), a uma concentração final de 7%. As células foram novamente incubadas a 0 °C por 10 minutos e, em seguida, aliquotadas e armazenadas a -80 °C, até seu uso.

Para as transformações, a 100 µL de células competentes foram adicionados 10 a 15 µL da reação de ligase, sendo a suspensão mantida a 0 °C por 30 minutos. Após choque térmico de dois minutos a 42 °C, 900 µL de meio SOB foram adicionados, prolongando-se a incubação por mais uma hora a 37 °C. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio SOB e espalhadas em placas contendo meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e IPTG (isopropiltio-β-galactosídeo), para a seleção dos clones transformantes e recombinantes. As colônias brancas foram tocadas levemente com a ponta de uma ponteira P10, inoculadas em uma placa de referência e incubadas em uma solução contendo todos os componentes necessários para amplificar o inserto. Cada reação continha tampão PCR 1X, cada um dos dNTPs a 2,5 mmol/L, “M13 Forward Primer” (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e “M13 Reverse Primer” (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'), cada um a 10 pmol e 1 U da enzima *AmpliTaq* DNA Polimerase (PE Applied Biosystems), em um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94 °C, por 10 minutos, seguidas de 30 ciclos (a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto) e um período adicional de polimerização a 72 °C por sete minutos. A placa de referência foi incubada a 37 °C, por 16 horas, e os fragmentos resultantes da PCR foram separados em um gel de agarose a 1%. As colônias que continham o inserto de interesse foram crescidas em 2ml de meio LB contendo ampicilina. O DNA plasmidial, isolado das bactérias transformadas, foi digerido com a enzima de restrição Eco RI e separado por eletroforese em um gel de agarose a 1%, para novo diagnóstico dos clones. As colônias

recombinantes foram armazenadas em 40% de glicerol a -80 °C, para caracterizações adicionais.

## **2.5. Isolamento de DNA plasmidial**

O isolamento do DNA plasmidial, em pequena escala, foi feito por purificação em colunas contidas no “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen Inc.), para sequenciamento. Nesse procedimento, inicialmente, as células foram rompidas pelo método de lise alcalina na presença de RNase H (100 µg/mL), sendo o volume das soluções ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. Após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi isolado do sobrenadante, usando-se a resina pré-empacotada QIAprep Spin e Qiagen tipo 100 (Qiagen Inc.), conforme recomendações do fabricante.

## **2.6. Sequenciamento do DNA**

O DNA foi seqüenciado, usando-se o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” adequado para o sequenciamento de DNA, usando-se o “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer”, PE Applied Biosystems. As reações de sequenciamento se baseiam na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) descrita por Sanger et al. (1977).

As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando-se o termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, programado para um período inicial de desnaturação a 96 °C, por dois minutos, seguido de 30 ciclos (96 °C por 30 segundos, 50 °C por 20 segundos e 60 °C por quatro minutos). As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 8µL de “mix” – fornecido no “Kit” de sequenciamento – 10 pmoles de um “primer” e 200 a 500 ng do DNA a ser seqüenciado. Os produtos de extensão produzidos na reação de sequenciamento foram purificados pela adição de 80 µL de isopropanol 75% e pela incubação à temperatura ambiente, por 15 minutos. Os fragmentos foram coletados por centrifugação a

16.000 g por 20 minutos. O precipitado foi lavado com 250 µL de isopropanol 75%, centrifugado por cinco minutos e secado à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 15 µL de “Template Supression Reagent” (PE Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por cinco minutos e mantidos no gelo até a sua aplicação. Os produtos da extensão foram separados por eletroforese capilar, utilizando-se como matriz o polímero POP6 (PE Applied Biosystems), e a fluorescência coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (PE Applied Biosystems). Os dados foram automaticamente convertidos em seqüências de deoxinucleotídios.

As seqüências geradas foram montadas em contíguos, alinhadas e analisadas, usando-se o programa DNASTAR (DNASTAR Inc.). A busca por similaridades com outras seqüências depositadas no “*GenBank*” foi feita, usando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois “primers” foram delineados a partir de um gene de lipoxigenase expresso em folhas de soja com provável função de reserva vegetativa *v1xC*, acesso U26457 (Bunker et al., 1995). O delineamento dos “primers” foi feito em uma região do gene de *v1xC* altamente conservada entre os vários membros da família mutigênica de lipoxigenase. Esses “primers” foram usados para amplificar prováveis fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko, aos 25 dias após emergência. Esses “primers” amplificaram dois fragmentos de PCR a partir do cDNA de raiz, um de aproximadamente 400 pb e outro de aproximadamente 900 pb, e um fragmento de PCR a partir do cDNA de nódulo, de aproximadamente 400 pb (Figura 1). Essa amplificação diferencial indica que está sendo expressa, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não está sendo expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, o fragmento de PCR de aproximadamente 400 pb proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb (Figura 2). A seqüência de aminoácidos deduzida desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou uma identidade de 80% com a proteína LOX1 de feijão (Eiben & Slusarenko, 1994) e de 79% com a proteína PvLOX2 de feijão (Porta et al., 1999). Essa alta identidade comprova que GmLOXN é proveniente de um gene de lipoxigenase. A comparação da seqüência de aminoácidos derivada de GmLOXN com a seqüência de aminoácidos de lipoxigenases de soja, revelou uma identidade de 71% com LOX 2 (Shibata et al., 1988) e de 69% com *v1xC* (Bunker et al., 1995). As diferenças de identidades entre GmLOXN e as seqüências de aminoácidos de outras lipoxigenases expressas em soja, indicam que GmLOXN faz parte de um novo gene. A maior identidade de GmLOXN com lipoxigenases expressas em nódulo, foi de 79% para feijão (Porta et al., 1999), seguida de 68% para ervilha (Gardner et al., 1996) e de 66% para *Vicia faba* (Perlick et al., 1996).



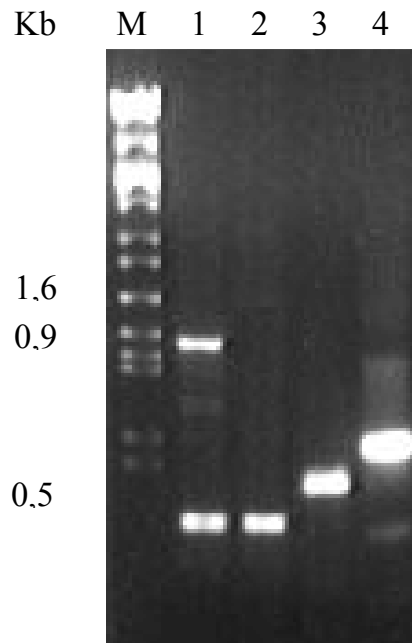


FIGURA 1 – RT-PCR de raiz e de nódulo da variedade de soja Doko. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: 1- raiz; 2 e 3- nódulo; 4- DNA genômico. Em 1 e 2 foi usado “primer” para lipoxigenase e em 3 e 4 foi usado “primer” de actina. M indica o marcador de peso molecular, DNA de  $\lambda$  digerido com *EcoR* I e *Hind* III. Os números à esquerda correspondem ao tamanho das bandas em Kb.

A identidade de 69% de GmLOXN com *vlxC*, uma lipoxigenase com sugerida função de armazenamento temporário de nitrogênio (Bunker et al., 1995) e o fato desse tipo de proteína acumular em soja em resposta a fertilização com nitrogênio (Tranbarger et al., 1991; Grimes et al., 1993; Bunker et al., 1995; Stephenson et al., 1998), sugerem a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que esteja envolvido no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, haja visto que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.

CCTGCAACAGAAGGTGTTGA	GAAGGGTCACGGTGACTTGAAAGACAAGCC	50
ATGGTGGCCTAAGTTGAACACTCTTCAAGATCTGATTCACATTTGCTGCAT		100
TATTATATGGACTGCTTCAGCACTCCATGCAGCTGTGAATTTCCGGACAATA		150
CCCTTATGGCGGTTTCATCCTAAATCGTCCAACCTAACCAGAAGATTGCT		200
CCCAGAGCCAGGAACCAAAGAATATGGTGAACCTACCAGTAATCATCAAA		250
AGGCTTATTTGAGAACAATTACAGGAAAGACTGAGGCCCTTGTGGACCTA		300
ACAGTGATAGAGATATTGTCAAGGCATGCTTCTGATGAGGTCTACCTTGG		350
CCA		353

FIGURA 2 – Seqüência de nucleotídios do clone de cDNA parcial de lipoxigenase. As seqüências marcadas em vermelho correspondem aos sítios de pareamento dos “primers” usados na reação de PCR.

Para melhor entendimento das funções de lipoxigenases em nódulos radiculares torna-se necessária a identificação dos genes de lipoxigenases expressos nesse órgão. Esse trabalho identificou um clone de cDNA parcial de lipoxigenase com 353 pb, GmLOXN, expresso em nódulo.

GmLOXN pode ser utilizado em trabalhos futuros, como sonda na seleção de clones completos de lipoxigenases em biblioteca de cDNA proveniente de nódulo e de raiz. Com o sequenciamento dos clones completos poder-se-á fazer uma melhor comparação com as seqüências de lipoxigenases depositadas no “*GenBank*”, bem como delinear “primers” específicos para cada gene de lipoxigenase expresso no nódulo e na raiz, gerando sondas específicas, de maneira a permitir a identificação da expressão individualizada desses genes durante o desenvolvimento desses órgãos. As sondas obtidas também poderiam ser utilizadas no preparo de anticorpos peptídeo-específicos e serem utilizados em imunolocalização. O conjunto dessas informações permitirá um melhor entendimento das funções de lipoxigenases do nódulo e da raiz.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se dois "primers" específicos para amplificar prováveis fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko, aos 25 dias após emergência, obteve-se dois fragmentos de PCR a partir do cDNA de raiz, um de aproximadamente 400 pb e outro de aproximadamente 900 pb, e um fragmento de PCR a partir do cDNA de nódulo, de aproximadamente 400 pb. Essa amplificação diferencial sugere que está sendo expressa, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não está sendo expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, o fragmento de PCR de aproximadamente 400 pb proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb. A seqüência de aminoácidos desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou que GmLOXN faz parte de um novo gene de lipoxigenase expresso em soja.

A identidade de 69% de GmLOXN com *vlxC*, uma lipoxigenase com função provável de armazenamento temporário de nitrogênio e o fato desse tipo de proteína acumular-se em soja em resposta a fertilização com nitrogênio, sugerem a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que está envolvido no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, uma vez que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEM, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25:3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G. & SMITH, K.S. **Currents protocols in molecular biology in CD-ROM**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- BELL, E. & MULLET, J.E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Molecular and General Genetics**, 230:456-462, 1991.
- BUNKER, T.W. & GRIMES, H.D. Nucleotide sequence of *v1xB*, a vegetative lipoxygenase from soybean (Accession no. U50075). **Plant Physiology**, 111:348, 1996
- 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 vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid levels remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995
- EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A.J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, 5(1):123-135, 1994.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service and Agriculture and Home Economics Experiment Station. Special Report, 80. Yowa State University, Ames. 11p. 1977.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.
- GARDNER, C.D.; SHERRIER, D.J.; KARDAILSKY, I.V. & BREWIN, N.J. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: Identification of lipoxygenase in the lumen of infections threads **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:282-289, 1996.
- GRIMES, H.D.; TRANBARGER, T.J. & FRANCESHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxigenase in soybeans. **Plant physiology**, 103:457-466, 1993.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.

- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin** N° 347, 1938, p.32.
- INOUE, H.; NOJIMA, H. & OKAYMA, K. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96:23-28, 1990.
- KATO, T.K.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, 98:324-330, 1992.
- KATO, T.K.; SHIRANO, Y.; IWAMOTO, H. & SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase 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. **Plant Cell Physiology**, 34:1063-1072, 1993.
- MELAN, M.A.; DONG, X.N.; 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 Physiology**, 101:441-450, 1993.
- PERLICK, A.M.; ALBUS, U.; STAVIDRIS, T.; FRUHLING, M.; KUSTER, H. & PUHLER, A. The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:860-863, 1996.
- 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**, 96:109-117, 1994.
- PORTA, H.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; CAMPOS, F.; COLMENERO-FLORES, J.M.; COLORADO, J.M.; CARMONA, M.J.; COVARRUBIAS, A.A. & ROCHA-SOSA, M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant Cell Physiology**, 40(8):850-858, 1999.
- ROYO, J.; VANCANNEYT, G.; PEREZ A.G.; SANZ, C.; STORMANN, K.; ROSAHL, S. & SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound regulated expression patterns. **Journal Biological Chemistry**, 271:21012-21019, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 74:5463-5467, 1977.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, 110:287-299, 1996.
- SHAH, D.M.; HIGHTOWER, R.C. & MEAGHER, R.B. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 79:1022-1026, 1982.
- SHIBATA, D.; KATO, T. & TANAKA, K. Nucleotide sequences of a soybean lipoxygenase gene and the short intergenic region between an upstream lipoxygenase gene. **Plant Molecular Biology**, 16:353-359, 1991.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; ANDREWS, P.C.; HERMODSON, M. & AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-2. **Journal Biological Chemistry**, 263:6816-6821, 1988.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; HERMODSON, M.; YAZDANPARAST, R. & AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. **Journal Biological Chemistry**, 262:10080-10085, 1987.
- SONG, W.C. & BRASH, A.R. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. **Science**, 253:781-784, 1991.
- 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 Physiology**, 116:923-933, 1998.
- SZCZYGLOWSKI, K.; HAMBURGER, D.; KAPRANOV, P. & BRUIJN, F.J. Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. **Plant Physiology**, 114:1335-1346, 1997.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRANT, 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**, 3:973-987, 1991.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E.(eds.) **The Biochemistry of Plants**. v. 9, Orlando:Academic Press, 1987. p.53-97.

WADSWORTH, G.J.; REDINHBAUGH, M.G. & SCANDALIOS, J.G. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA blot analysis. **Analytical Biochemistry**, 172:297-283, 1988.

YENOFSKY, R.L.; FINE, M. & LIU, C. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxigenase-3 gene. **Molecular and General Genetics**, 211:215-222, 1988.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Várias linhagens de soja desprovidas das isoenzimas LOX 1, 2 e 3 na semente (triplo nulas) derivadas de variedades elite têm sido desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UVF, que visa aumentar a sua aceitabilidade na alimentação humana. Essas linhagens triplo nulas têm sido avaliadas para caracteres agronômicos, contudo, ainda não tinham sido avaliadas quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Tais análises são necessárias, haja visto que o nitrogênio requerido para o desenvolvimento de plantas de soja é quase completamente suprido pela bactéria *Bradyrhizobium* por meio do estabelecimento de relação simbiótica.

Foram montados três experimentos, em épocas diferentes, para comparar três linhagens de soja triplo nulas e as variedades Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12 que lhes deram origem, quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.

Os resultados desse estudo indicam que as isoenzimas de lipoxigenases das sementes não foram fatores determinantes da formação de nódulos, bem como na fixação de nitrogênio que ocorre nos nódulos.

Utilizando-se plantas das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, avaliou-se os valores de  $K_{M\ app}$ , atividade e "immunoblotting" de lipoxigenases de raiz nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e de nódulo nos tempos 10, 15 e 25 dias após emergência. Os valores de  $K_{M\ app}$  para raiz de Doko normal e de Doko triplo nula apresentaram a mesma tendência de aumento no período estudado, indicando que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou a expressão das lipoxigenases da raiz. Os valores de  $K_{M\ app}$  para nódulo foram similares para Doko normal e Doko triplo nula e para os três tempos analisados, sugerindo que o "pool" de lipoxigenases expresso nesse órgão é o mesmo nessas duas linhagens no período estudado.

A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, declinou com o passar do tempo.



Essa maior atividade de lipoxigenases no início de formação da raiz, sugere o envolvimento dessa enzima no crescimento e desenvolvimento desse órgão. Contudo, para nódulo ocorreu um aumento acentuado de atividade de lipoxigenase aos 25 dias após emergência em um estágio de desenvolvimento no qual tem-se baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio nesse órgão, sugerindo que as lipoxigenases expressas no nódulo estariam envolvidas com armazenamento de nitrogênio, similar ao que tem sido proposto para lipoxigenases de folhas de soja.

Raiz e nódulo apresentaram, pelo menos, dois grupos de mobilidade para lipoxigenases nos "immunoblottings", similares aos de semente, com aproximadamente 94 e 97 KDa. A intensidade das bandas imuno-reativas em raiz e em nódulo dos genótipos estudados confirmaram os resultados obtidos com atividade de lipoxigenase, sugerindo que as variações de atividade dessa enzima nesses órgãos foram, principalmente, devido à variações na concentração dessa enzima.

Utilizando-se dois "primers" específicos para amplificar fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko obteve-se uma amplificação diferencial nesses dois órgãos, que indicou a expressão de, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não é expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, um fragmento de PCR proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb. A seqüência de aminoácidos desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou fazer parte de um novo gene de lipoxigenase expresso em soja.

A identidade de 69% de GmLOXN com *v1xC*, uma lipoxigenase com função de armazenamento temporário de nitrogênio em folhas, acrescido do fato desse tipo de proteína acumular-se em resposta a fertilização com nitrogênio, sugere a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que esteja envolvido

no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, haja visto que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.