

EFEITO DA APLICAÇÃO FOLIAR DE ÁCIDOS GRAXOS NA “VIA DAS LIPOXIGENASES” DE PLANTAS DE SOJA

Rosa Bárbara Batista, Maria Goreti de Almeida Oliveira*, Christiano Vieira Pires, Anna Cristina Lanna, Maria Regina Araújo Gomes, Inês Chamel José, Newton Deniz Piovesan, Sebastião Tavares de Rezende e Maurílio Alves Moreira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa - MG

Recebido em 2/7/01; aceito em 21/1/02

EFFECT OF THE APPLICATION OF FATTY ACIDS ON “LIPOXYGENASE PATHWAY” FROM SOYBEAN LEAVES. The involvement of lipoxygenase isozymes in several physiological processes of plants has been described but their role is not well understood and more biochemical studies are needed to elucidate the role of the “Lipoxygenase Pathway” in plant physiology. Thus, the biochemical and kinetic characterization of a lipoxygenases “pool” from soybean leaves was carried out. Two genotypes were used: IAC-100 (a normal variety having lipoxygenases in the seeds) and IAC-100 TN (genetically modified genotype, which is devoid of lipoxygenases in the seeds). The plants were submitted to the application of fatty acids (lipoxygenase substrates) on leaves. The results of the biochemical and kinetic studies of lipoxygenase isozymes from leaves of the two genotypes analysed showed that genetic removal of lipoxygenase from seeds did not affect the response of the plant to the treatment, since both genotypes showed similar results.

Keywords: lipoxygenase; fatty acids; soybean.

INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoredutase, EC 1.13.11.12), pertencentes à classe das oxirredutases, são dioxigenases que catalisam a adição molecular de oxigênio às moléculas de ácidos graxos poliinsaturados, possuindo isomerismo geométrico, no sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno¹.

As lipoxigenases do sistema animal utilizam preferencialmente o ácido araquidônico como substrato e estão envolvidas na formação de vários componentes regulatórios, como leucotrienos e lipoxinas². Assim, as lipoxigenases do sistema animal desempenham funções na inflamação, imunidade, hipersensibilidade e nas reações de defesa do hospedeiro.

No sistema vegetal, as lipoxigenases ocorrem em várias partes da planta, desempenhando funções em processos tais como: crescimento e desenvolvimento¹, senescência³, reserva vegetativa⁴, germinação de sementes⁵, resposta a ferimento⁶ e resistência a insetos e patógenos⁷.

Os principais substratos de lipoxigenases, em plantas superiores, são os ácidos linoléico e linolênico⁸. O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas, compreendendo mais que 80% do grupo acil dos lipídios de membrana dos cloroplastos. O ácido linoléico se encontra em maior concentração nas sementes e embriões⁹ e, em plantas, pode ser convertido em ácido linolênico pela ação de uma dessaturase¹⁰.

A “Via das Lipoxigenases” em plantas está envolvida na síntese de moléculas regulatórias¹⁰. Os hidroperóxidos formados pela ação das lipoxigenases são moléculas reativas, e podem ser mobilizadas, em plantas superiores, por meio de um complexo mecanismo que envolve a hidroperóxido ciclase e a hidroperóxido liase.

A hidroperóxido liase produz compostos carbonílicos de seis carbonos como o *trans*-2-hexenal, o qual é um componente característico do sabor e odor de frutos e folhas verdes. Produz também

compostos de 12 carbonos como a traumatina, conhecida como hormônio do ferimento, e pode estar envolvida no processo de sinalização e divisão celular em resposta a ferimento¹¹.

A hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienólico que, após uma redução e três β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico, o qual é um poderoso indutor da síntese de inibidores de proteases quando plantas são injuriadas¹², além de ser indutor da expressão gênica de lipoxigenases em folhas primárias, hipocótilos e cotilédones¹³.

A função de lipoxigenases de plantas, sob o ponto de vista da relação estrutura/função, ainda não está bem clara¹⁴. Assim, torna-se cada vez mais importante estudos bioquímicos visando elucidar a participação da “Via das Lipoxigenases” na fisiologia da planta, em especial no mecanismo de defesa da soja a insetos e patógenos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da planta em responder à aplicação de ácidos graxos, substratos de lipoxigenases, por meio da “Via das Lipoxigenases” sendo utilizadas duas isolinhas de soja: uma variedade normal, IAC-100, contendo as três isoenzimas lipoxigenases na semente, e o genótipo IAC-100 TN, modificado geneticamente, apresentando ausência completa das três isoenzimas lipoxigenases nas sementes.

PARTE EXPERIMENTAL

Material genético

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade IAC-100 e do genótipo com ausência de lipoxigenases nas sementes (IAC-100 TN). O genótipo IAC-100 TN, desenvolvido pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, é uma linhagem avançada obtida a partir da variedade IAC-100 que se encontra no sexto ciclo de retrocruzamentos, terceira geração de autofecundação. A alta similaridade genética entre IAC-100 e IAC-100 TN foi confirmada por meio de análise de DNA, utilizando-se marcadores moleculares do tipo RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA”, e também por meio de característi-

*e-mail: malmeida@mail.ufv.br

cas fenotípicas. As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 3,0 Kg de solo, em condições de casa de vegetação.

Aplicação de ácidos graxos

As plantas de soja no estágio V2 de desenvolvimento (primeira folha trifoliolar completamente expandida), tiveram este trifólio isolado e pulverizado em dias alternados, com soluções a 10 mM de ácidos graxos (araquidônico, linoléico e linolênico) contendo Triton X-100 0,01% (v/v)¹⁰ até atingirem o estágio V3 de desenvolvimento (segunda folha trifoliolar completamente expandida). Plantas controle receberam aplicação da solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v).

Foram utilizadas, como fonte de enzima, a primeira e a segunda folhas trifoliosas de plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento¹⁵. Os três folíolos da primeira e da segunda folhas trifoliosas foram coletadas 0, 24 e 48 h após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. O preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.*¹⁶.

Determinação da atividade de lipoxigenases

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod *et al.*¹⁷. O método baseia-se no aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Determinação da atividade de lipoxigenase em vários valores de pH

Os seguintes sistemas-tampão foram usados: 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); monofosfato/fosfato dissódico (6,0-7,0); Tris-HCl (7,5-8,5) e ácido bórico/borato de sódio (9,0-10,0), na concentração de 50 mM. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 seg por um período de 2,5 min, a 25 °C.

Determinação da atividade de lipoxigenases em vários valores de temperatura

Foi determinada a taxa de oxidação do ácido linoléico pelas lipoxigenases a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Utilizou-se banheira bem como espectrofotômetro com temperatura controlada.

Determinação da concentração de proteínas

As determinações das concentrações de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinonínico¹⁸. Este método utiliza a albumina sérica bovina como padrão e o “kit” SIGMA como reagente de trabalho, que constituiu de uma solução de ácido bicinonínico e uma solução de sulfato de cobre (II) - pentaidratado 4% (p/v). O aumento da absorvância foi determinado a 562 nm.

Determinação de inibidores de proteases

A determinação de inibidores de proteases nos extratos foliares foi realizada baseada na inibição da atividade da tripsina utilizando-se (N α -Benzoil-DL-Arginina p-Nitroanilida)_{D,L}-BAPNA como substrato. Os resultados obtidos foram convertidos em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com o método descrito por Kakade *et al.*¹⁹.

Determinação dos níveis de hexanal e aldeídos totais

A determinação de hexanal foi realizada por cromatografia gasosa, pelo método do “head-space”, segundo Utumi *et al.*²⁰. Utilizou-se coluna carbowax (2500 cm x 0,53 mm), e o gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo de 5,7 mL/min. A identificação de hexanal foi feita por injeção prévia do composto-padrão, e os resultados foram expressos em área do pico, em milivolts.

Nas determinações de aldeídos foi utilizado o método colorimétrico desenvolvido por Santos *et al.*²¹, utilizando-se 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente de cor. As leituras da absorvância foram realizadas a 635 nm, sendo os resultados expressos como a diferença da absorvância observada ao final da reação e na reação controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases

Com o objetivo de caracterizar o pH ótimo de atuação de lipoxigenases foliares de plantas de soja submetidas à aplicação de substratos exógenos, realizou-se as análises de efeito de pH sobre a atividade enzimática. A Figura 1 apresenta os perfis das curvas de pH *versus* atividade específica de lipoxigenases. Os perfis para os ácidos araquidônico (C_{20:4}), e linoléico (C_{18:2}), em todos os tempos analisados, e para o ácido linolênico (C_{18:3}) nos tempos 0 e 24 h após aplicação, apresentaram-se semelhantes.

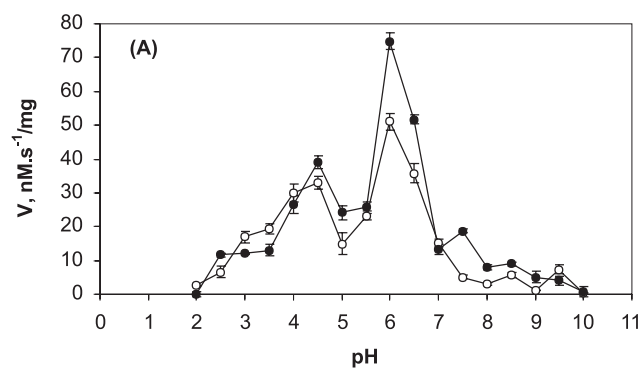
Pode-se observar dois picos mais acentuados de atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0, nos tratamentos e em seus respectivos controles, tanto para a resposta local quanto para a resposta sistêmica. Em pH 4,5 o valor de atividade específica foi semelhante para os dois genótipos analisados, resposta local e sistêmica, entretanto, em pH 6,0 o valor de atividade específica foi maior na resposta local do que na resposta sistêmica. Observa-se ainda, que as plantas tratadas com os substratos de lipoxigenases apresentaram valores de atividade específica maiores do que os respectivos controles. Esses resultados sugerem que, com a adição de substrato exógeno possivelmente tenha ocorrido aumento na atividade enzimática.

Tanto na resposta local quanto na resposta sistêmica, a atividade específica em pH 6,0 apresentou-se maior do que a atividade específica em pH 4,5, sugerindo que o “pool” de lipoxigenases contém mais de uma forma das isoenzimas.

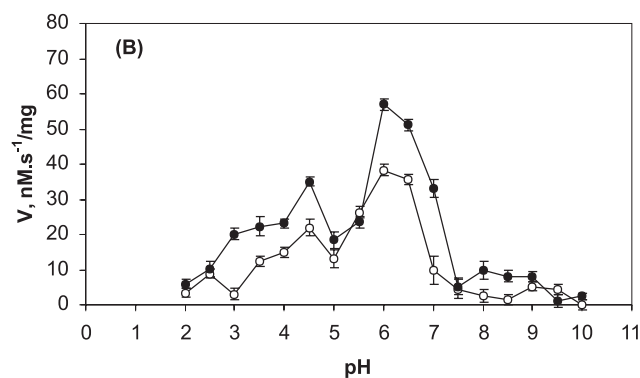
Os valores de pH ótimo para a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, submetidas à aplicação de ácidos graxos nas folhas, estão dentro da faixa de pH ótimo verificada para lipoxigenases de outras plantas, encontrada por vários autores em outros estudos: lipoxigenases de tubérculos de batata, pH 5,5-6,0²²; lipoxigenases de semente de girassol, pH 6,2²³; lipoxigenases de folhas de tomate inoculadas com *Pseudomonas*, pH 6,4-7,2²⁴; lipoxigenases de pepino, pH 5,0²⁵; lipoxigenases de pimentão, pH 6,5²⁶; lipoxigenases de semente de ervilha, pH 6,8²⁷ e lipoxigenases de folhas de soja do genótipo IAC-100 e IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas a ferimento mecânico, pH 6,0⁶.

Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenases

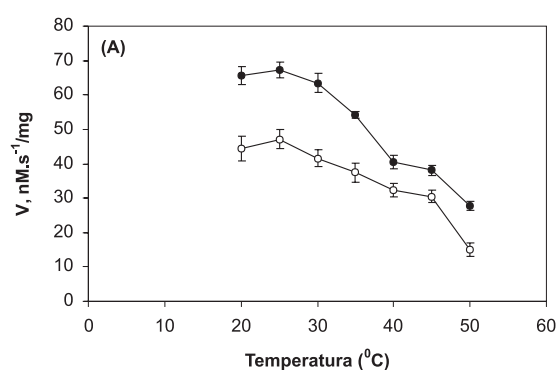
Para determinar o valor da temperatura ótima de atividade de lipoxigenases foliares de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos foi realizada uma análise de atividade, a vários valores de temperatura. A Figura 2 apresenta os perfis das curvas de temperatura *versus* atividade específica de lipoxigenases. Os perfis para os



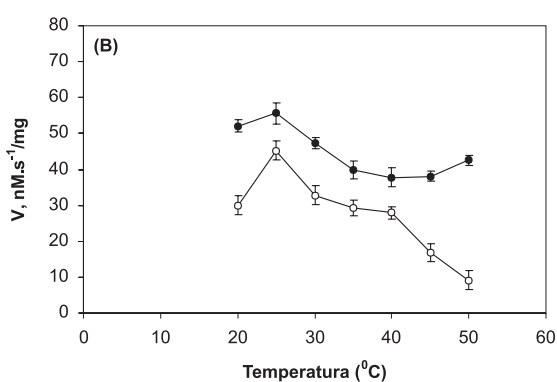
○— resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas controle
●— resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas



○— resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas controle
●— resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas tratadas



○— resposta local (primeira folha trifoliolar) de plantas controle
●— resposta local (primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas



○— resposta sistêmica (segunda folha trifoliolar) de plantas controle
●— resposta sistêmica (segunda folha trifoliolar) de plantas tratadas

Figura 1. Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja em vários valores de pH. Primeira e segunda folhas trifoliolares de plantas da variedade IAC-100 no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 h após a última aplicação de solução 10 mM de ácido linolênico ($C_{18:3}$) em Triton X-100 0,01% (v/v), e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Condições experimentais: 1000 μ L de tampão fosfato 50 mM, 25 °C; 4 μ L de linoleato de sódio 10 mM; 1 μ L de extrato bruto foliar.

Quantidade de proteína no ensaio: Em (A): 0,10 mg (controle) e 0,70 mg (tratamento). Em (B): e 0,10 mg (controle) e 0,50 mg (tratamento).

Figura 2. Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja em vários valores de temperatura. Primeira e segunda folhas trifoliolares de plantas do genótipo IAC-100 TN no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 h após a última aplicação de solução 10 mM de ácido linolênico ($C_{18:3}$) em Triton X-100 0,01% (v/v), e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Condições experimentais: 1000 μ L de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0; 4 μ L de linoleato de sódio 10 mM; 1 μ L de extrato bruto foliar.

Quantidade de proteína no ensaio: Em (A): 1,26 mg (controle) e 1,36 mg (tratamento). Em (B): e 0,82 mg (controle) e 1,78 mg (tratamento).

ácidos araquidônico ($C_{20:4}$), e linoléico ($C_{18:2}$), em todos os tempos analisados, e para o ácido linolênico ($C_{18:3}$) nos tempos 0 e 24 h após aplicação, apresentaram-se semelhantes.

O valor mais acentuado de atividade específica foi a 25 °C, para ambos os genótipos e seus respectivos controles. O pico a 25 °C foi o maior, porém não foi o único observado, mostrando novamente a presença de mais de uma forma de isoenzimas lipoxigenases. Verificou-se novamente, que a atividade específica foi maior nas plantas submetidas à aplicação foliar de ácidos graxos do que nos respectivos controles, sugerindo uma resposta das plantas de soja ao tratamento através do aumento da atividade de lipoxigenases, como verificado nas análises de efeito do pH.

Esses resultados estão de acordo com os citados na literatura, visto que outros autores obtiveram valor de temperatura ótima de 25 °C para lipoxigenases foliares de soja: Lanna *et al.*²⁸ trabalhando com plantas dos genótipos IAC-100, UFV-TN e Cristalina, no está-

dio V4 de desenvolvimento; Vieira *et al.*⁶ analisando plantas da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas a fermento mecânico.

Atividade específica de lipoxigenases

A determinação da atividade específica de lipoxigenases nos experimentos foi realizada a pH 6,0 e em tampão fosfato de sódio 50 mM a 25 °C, pelo fato desses valores de pH e temperatura terem sido aqueles em que houve maiores picos de atividade. As Figuras 3 e 4 apresentam os valores de atividade específica de lipoxigenases, utilizando-se o ácido linoléico como substrato.

Na variedade IAC-100 (Figura 3) houve um ligeiro aumento de atividade específica de 0 a 24 h após os tratamentos, entretanto, no genótipo IAC-100 TN (Figura 4) houve aumento de atividade específica de 0 a 48 h após os tratamentos, mas os valores de atividade espe-

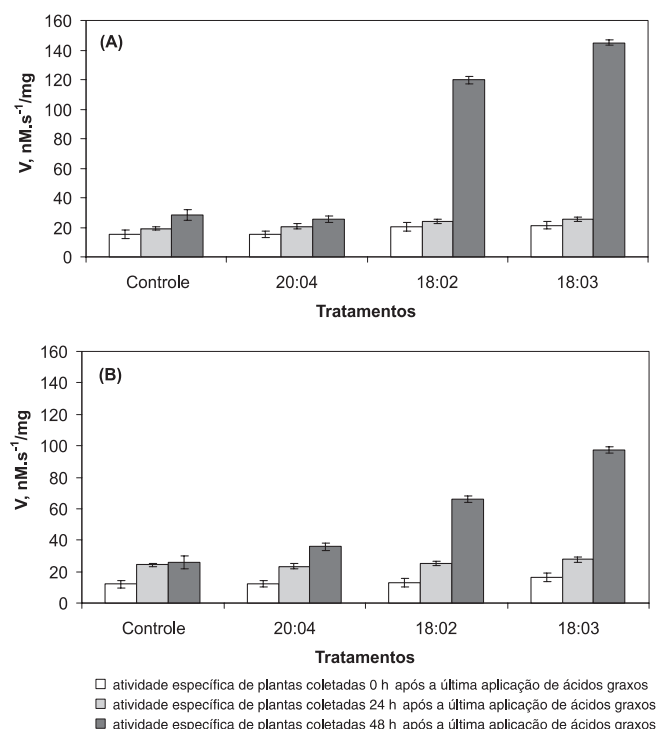


Figura 3. Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, resposta local (primeira folha trifoliolar) (A) e resposta sistêmica (segunda folha trifoliolar) (B) de plantas de soja da variedade IAC-100 no estádio V3 de desenvolvimento, coletadas 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico ($C_{20:4}$), linoléico ($C_{18:2}$) e linolênico ($C_{18:3}$) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão. Condições experimentais: 1000 μ L de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, 25 $^{\circ}$ C; 4 μ L de linoleato de sódio 10 mM; 1 μ L de extrato bruto foliar

cífica de plantas do genótipo IAC-100 TN foram maiores que os de plantas da variedade IAC-100. Esses resultados mostram que, embora exista diferença no “pool” de lipoxigenases entre as duas isolinhas, o comportamento cinético enzimático das mesmas é semelhante, evidenciando assim, que a remoção genética das isoenzimas lipoxigenases da semente não afetou a resposta das folhas ao tratamento.

Para ambos os genótipos, os resultados mostraram maiores valores de atividade específica no tempo de 48 h após tratamento com os ácidos linoléico (18:2) e linolênico (18:3), os quais são os principais substratos de lipoxigenases no sistema vegetal. Porém, o tratamento com o ácido linolênico (18:3) foi o que apresentou maiores valores de atividade específica nos dois genótipos, respostas local e sistêmica, nos tempos de 24 e 48 h após tratamento. Possivelmente isso se deve ao fato deste ácido ser mais abundante nas folhas do que o ácido linoléico, logo, pode estar sendo utilizado pela planta como substrato exógeno. Além disso, o ácido linoléico pode ser convertido pelas plantas, por meio de uma dessaturase, em ácido linolênico, o qual dá origem ao ácido jasmônico que, por sua vez, ativa lipoxigenases¹⁰.

Em ambos os genótipos, observou-se que os valores de atividade específica das plantas tratadas com o ácido araquidônico ($C_{20:4}$) foram semelhantes aos de plantas-controle, observando-se também, o efeito do Triton X-100. Acredita-se que, com a adição de substrato exógeno, possivelmente tenha ocorrido aumento na atividade de lipoxigenases. Para que pudesse ocorrer a passagem de ácidos graxos pela membrana, o Triton X-100 foi adicionado ao solvente. O Triton X-100 é um detergente que, quando em contato com membranas, liga-se às regiões lipofílicas das proteínas da membrana por sua extre-

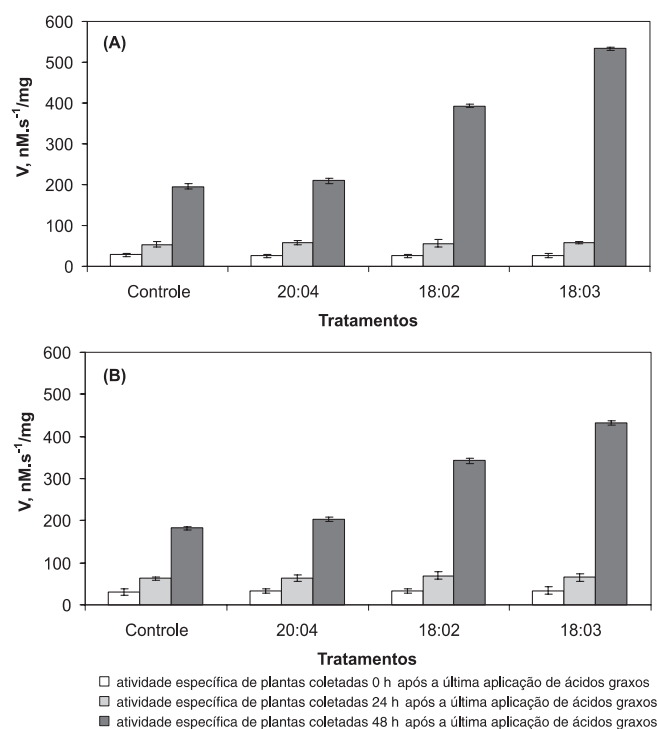


Figura 4. Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, resposta local (primeira folha trifoliolar) (A) e resposta sistêmica (segunda folha trifoliolar) (B) de plantas de soja da variedade IAC-100 TN no estádio V3 de desenvolvimento, coletadas 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico ($C_{20:4}$), linoléico ($C_{18:2}$) e linolênico ($C_{18:3}$) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão. Condições experimentais: 1000 μ L de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, 25 $^{\circ}$ C; 4 μ L de linoleato de sódio 10 mM; 1 μ L de extrato bruto foliar.

midade hidrofóbica, deslocando as moléculas lipídicas. Este deslocamento pode desestruturar a bicamada lipídica, tornando a membrana mais permeável e, dessa forma, aumentando o fluxo de moléculas. Como a outra extremidade da molécula do detergente é polar, essa ligação tende a solubilizar as proteínas da membrana como complexos de detergente-proteína. Assim, o aumento da atividade pode ter sido ocasionado pela utilização do substrato exógeno que aumentou a atividade enzimática devido ao aumento da concentração de substrato no meio, ou porque ocorreu aumento de síntese de lipoxigenases, ou até mesmo os dois casos.

Inibidores de proteases

Como a “Via das Lipoxigenases” pode produzir ácido jasmônico, e este ativa genes que codificam inibidores de proteases¹⁰, realizou-se a determinação da inibição trípica frente aos extratos foliares. Os resultados em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína encontram-se apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Foi observada inibição trípica significativa 48 h após a última aplicação dos ácidos linoléico e linolênico, os quais são os principais substratos de lipoxigenases no sistema vegetal. Isto ocorreu tanto na resposta local quanto na sistêmica, nos dois genótipos analisados. Assim, houve resposta da planta aos tratamentos, por meio da produção de inibidores de serinoproteases, provavelmente pela ativação da “Via das Lipoxigenases”. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Farmer e Ryan¹⁰ quando trabalharam com plantas de tomate submetidas à aplicação de vários ácidos graxos, incluindo os

Tabela 1. Inibição de tripsina por inibidores de proteases presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)].

Condições experimentais: 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂; 100 µL do extrato bruto foliar; 50 µL de solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M; 500 µL de solução de D,L-BapNA 1,2 mM

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	mg de tripsina inibida/grama de proteína							
	Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	5,0454 ¹ ag	5,6471 ag	5,8240 a	7,4156 a	6,7940 dgA	5,9580 dgA	10,0109 d	11,4573 dB
24	9,0791 b	10,3312 b	10,6479 bb	13,5785 bh	7,3312 eA	5,7943 eA	14,2957 e	12,7260 ehB
48	40,4472 c	38,6397 c	88,0148 c	96,6473 c	31,5719 f	30,8527 f	114,4251 f	114,7830 f

¹ Valores são a média das análises de três repetições. Nas colunas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula (ou minúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Inibição de tripsina por inibidores de proteases presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da segunda folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)].

Condições experimentais: iguais às da Tabela 1

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	mg de tripsina inibida/grama de proteína							
	Resposta local (folíolos da segunda folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	8,0010 ¹ aA	8,1447 aA	9,9001 a	9,9981 a	5,1610 d	6,6892 e	6,6415 eB	5,8153 de
24	8,8258 bA	9,8891 bbgA	10,9438 bh	10,4437 bh	6,9906 e	9,6413 fg	9,7765 fhB	10,2313 fh
48	37,7502 c	39,4740 c	93,8676 ci	109,9402 di	25,7076 f	26,7567 f	98,9635 gi	103,0259 gi

Ver rodapé da Tabela 1

ácidos araquidônico, linoléico e linolênico. A maioria dos ácidos utilizados foram inativos na indução da síntese de inibidor I, exceto os ácidos linoléico e linolênico. Os resultados obtidos por Farmer e Ryan¹⁰ indicam que os compostos ativos na síntese de inibidores de proteases em folhas de tomate foram convertidos em ácido jasmônico nas plantas, atuando como ativadores dos genes de inibidores proteases.

A maior produção de inibidores de proteases observada ocorreu 48 h após tratamento com o ácido linolênico, tanto na resposta local quanto na sistêmica em ambos os genótipos. Esses resultados também estão de acordo com os obtidos por Farmer e Ryan¹⁰, que observaram que os níveis de inibidor I que acumularam em resposta ao ácido linolênico foram muito maiores que aqueles induzidos por ácido linoléico e até mesmo por fermento.

Os resultados obtidos, associados aos resultados de atividade específica, indicam um possível mecanismo de defesa da planta de soja à aplicação de ácidos graxos envolvendo a “Via das Lipoxigenases”, que parece ocorrer através do aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e em seguida, sob a ação da hidroperóxido ciclase, o

hidroperóxido formado é convertido em ácido 12-oxo-fitodienóico que, posteriormente é transformado em ácido jasmônico. Este, por sua vez, poderia interagir com um receptor de membrana a fim de ativar a expressão de genes que codificam inibidores de proteases¹⁰.

Níveis de hexanal e de aldeídos totais

A “Via das Lipoxigenases” pode produzir, também, hexanal e outros aldeídos²⁹⁻³⁰. Assim, realizou-se a determinação de hexanal e de aldeídos totais, com o objetivo de verificar se a aplicação de ácidos graxos, substratos de lipoxigenases, nas plantas de soja iria produzir aumento nos níveis de aldeídos. Os níveis de hexanal estão representados nas Tabelas 3 e 4 e os níveis de aldeídos totais nas Tabelas 5 e 6.

Houve um ligeiro aumento nos níveis de hexanal dos tratamentos quando comparados aos respectivos controles, na resposta local, em ambos os genótipos (Tabela 3), mas o mesmo não foi observado na resposta sistêmica (Tabela 4). Tanto a variedade IAC-100 quanto o genótipo IAC-100 TN não apresentaram aumento significativo nos

Tabela 3. Níveis de hexanal presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)].

Condições experimentais: 50 mg de folhas liofilizadas e moídas; 1000 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0, 40 °C/20 min; temperatura inicial da coluna: 45 °C; temperatura do injetor: 200 °C; temperatura do detector: 250 °C; coluna CARBOWAX (2500 cm x 0,53 mm); gás de arraste: N₂; fluxo do gás: 5,7 mL/min

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	5.633,0 ¹ aA	5.660,0 ag	4.670,0 a	5.696,7 a	3.982,0 B	5.990,0 dg	6.986,0 e	6.991,7 e
24	6.362,7 b	17.573,3 b	8.057,7 chA	10.120,3 chB	4.324,7 eB	10.184,3 fC	8.147,0 fhC	7.091,7 fhD
48	5.976,3 cA	7.325,7 di	7.224,3 diA	7.427,3 djB	7.021,3 f	12.642,0 giC	7.323,3 giC	6.529,0 gjD

¹ Valores são a média das análises de três repetições. Nas colunas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula (ou minúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Níveis de hexanal presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da segunda folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)].

Condições experimentais: iguais às da Tabela 3

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	Resposta local (folíolos da segunda folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	13.431,0 ¹ A	12.198,7	14.821,3 A	10.800,7 B	4.686,0 b	4.701,9 b	5.769,0 b	5.700,7 b
24	14.886,0 a	17.746,3	14.586,3 aA	10.739,7 B	5.122,3	11.788,0	7.449,0 c	8.049,3 c
48	13.049,3 A	8.652,3	9.846,0 a	10.070,7 aB	7.846,3	13.862,7 c	8.236,7	12.102,33 c

Ver rodapé da Tabela 3. As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Cochran e Bartlett.

níveis de hexanal 48 h após a última aplicação dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases.

Não houve aumento significativo de aldeídos totais 48 h após tratamentos, em ambos os genótipos analisados, tanto na resposta local (Tabela 5) quanto na sistêmica (Tabela 6).

CONCLUSÃO

Os resultados do estudo bioquímico e cinético das isoenzimas lipoxigenases de folhas dos dois genótipos analisados, utilizando o ácido linoléico como substrato, mostram a existência de dois picos mais acentuados de atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0, nos tratamentos e nos respectivos controles, tanto na resposta local quanto na sistêmica, revelando a presença de mais de uma forma de isoenzima lipoxigenase no “pool” analisado. O valor da temperatura ótima a pH 6,0 em respostas local e sistêmica foi 25 °C.

Os resultados de atividade específica sugerem uma resposta da planta de soja à aplicação de ácidos graxos, substratos de lipoxigenases, pelo aumento da atividade, e mostram ainda que a

remoção genética das isoenzimas lipoxigenases da semente não afetou a resposta da planta ao tratamento, uma vez que os genótipos apresentaram comportamento semelhante.

Os resultados mostram que, para ambos os genótipos analisados, tanto a produção de aldeídos totais quanto a produção de hexanal, em resposta à aplicação de ácidos graxos, substratos de lipoxigenases, foi pequena. Isto indica que a “Via das Lipoxigenases” está sendo ativada, mas não segue a via de produção de aldeídos proposta por Gardner²⁹ e Croft *et al.*³⁰. É possível que haja ativação da “Via das Lipoxigenases” em resposta à aplicação de ácidos graxos, e após a formação de hidroperóxidos, produtos primários das lipoxigenases, ocorre a ação enzimática de uma hidroperóxido ciclase seguindo a via de produção de ácido jasmônico com subsequente ativação e expressão de genes que codificam inibidores de proteases.

A caracterização dos parâmetros cinéticos e bioquímicos de lipoxigenases presentes nas folhas de soja, bem como a elucidação de suas funções fisiológicas é de importância fundamental nas estratégias de manipulação genética que têm como objetivos a criação de cultivares de soja resistentes a insetos e patógenos.

Tabela 5. Níveis de aldeídos totais presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. *Condições experimentais:* 0,5 mL de extrato foliar; 0,5 mL de solução de MBTH 0,1 %; 1,25 mL de FeCl₃ 0,23%; 3 mL CH₃COCH₃.

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	0,8944 a	0,8981 a	0,8920 a	0,8940 aA	0,9294 bA	0,9391 b	0,9400 b	0,9291 b
24	0,9420 ¹ c	1,1278 a	1,1331 a	0,8857 A	0,9335 cA	1,1815	1,0213 B	0,9970 B
48	1,0419 bd	1,1088	0,9886	1,0590 b	1,0274 cd	1,2140	1,0423 cB	0,9835 B

Ver rodapé da Tabela 4

Tabela 6. Níveis de aldeídos totais presentes em extratos de folhas de soja, folíolos da segunda folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento. Variedade IAC-100 e genótipo IAC-100 TN coletados 0, 24 e 48 h após a última aplicação de solução 10 mM dos ácidos araquidônico (C_{20:4}), linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}) e seus respectivos controles [aplicação de solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)]. *Condições experimentais:* 0,5 mL de extrato foliar; 0,5 mL de solução de MBTH 0,1 %; 1,25 mL de FeCl₃ 0,23%; 3 mL CH₃COCH₃.

Tempo (Horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, substratos de lipoxigenases)	Resposta local (folíolos da segunda folha trifoliolar)							
	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico	Controle	Ácido Araquidônico	Ácido Linoléico	Ácido Linolênico
0	0,8726 a	0,8859 a	0,8808 a	0,8820 a	0,8450 b	0,8398 b	0,8419 b	0,8460 b
24	1,0385 ¹ a	0,9644	1,0294 a	1,1588	0,9006	1,0572	0,9448 A	0,9264
48	0,9185	0,9906	0,8934	1,0334	1,0433 b	1,0516 b	0,9523 A	1,0064

Ver rodapé da Tabela 4

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Siedow, J. N.; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 145.
- Matsui, K.; Hijjiya, K.; Tabuchi, Y.; Kajiwara, T.; *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1279.
- Rouet-Mayer, M.; Bureau, J.; Laurieri, C.; *Plant Physiol.* **1992**, *98*, 971.
- Stephenson, L. C.; Bunker, T. W.; Dubbs, W. E.; Grimes, H. D.; *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 923.
- Park, T. K.; Holland, M. A.; Laskey, J. G.; Polacco, J. C.; *Plant Sci.* **1994**, *96*, 109.
- Vieira, A. A.; Oliveira, M. G. A.; José, I. C.; Piovesan, N. D.; Rezende, S. T.; Moreira, M. A.; Barros, E. G.; *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **2001**, *13*, 1.
- Fidantsef, A. L.; Bostock, R. M.; *Physiol. Plant.* **1998**, *102*, 257.
- Wang, C.; Kevan, P. C.; Croft, J. U.; Hildebrand, D. F.; *Plant Physiol.* **1999**, *37*, 497.
- Hildebrand, D. F.; Hamilton-Kemp, T. R.; Legg, C. S.; Bookjans, G.; *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **1988**, *7*, 201.
- Farmer, E. E.; Ryan, C. A.; *Plant Cell* **1992**, *4*, 129.
- Zimmerman, D. C.; Coudron, C. A.; *Plant Physiol.* **1979**, *63*, 636.
- Mueller, M. J.; *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 653.
- Grimes, H. D.; Koetje, D. S.; Franceschi, V. R.; *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 433.
- Fornaroli, S.; Petrusa, E.; Braidot, E.; Vianello, A.; Macri, F.; *Plant Sci.* **1999**, *145*, 1.
- Fehr, W. R.; Caviness, C. E.; *Stages of Soybean Development*, Ames: Cooperative Extension Service, Iowa State University, 1977, p. 11.
- Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B.; Morita, Y.; *Plant Cell Physiol.* **1986**, *22*, 911.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laasko, S.; *Methods Enzymol.* **1981**, *71*, 441.
- 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.; *Anal. Biochem.* **1985**, *15*, 76.
- Kakade, M. L.; Rackis, J. J.; Mcghee, J. E.; Puski, G.; *Cereal Chem.* **1974**, *51*, 376.
- Utumi, M. M.; Barros, E. G.; Oliveira, M. G. A.; Sedyama, C. S.; Moreira, M. A.; *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1998**, *10*, 203.
- Santos, I. C.; Reis, W. J. P.; Moreira, M. A.; Rezende, S. T.; Rocha, V. S.; Sedyama, C. S.; *Rev. Ceres* **1993**, *40*, 438.
- Galliardi, T.; Phillips, D.R.; *J. Biochem.* **1971**, *124*, 431.
- Leoni, O.; Iori, R.; Palmieri, S.; *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 88.
- Koch, E.; Meier, B.; Eiben, H.-G.; Slusarenko, A.; *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 571.
- Avdiushiko, S. A.; Ye, X. S.; Kue, J.; Hildebrand, D.F.; *Plant* **1994**, *193*, 349.
- Minguez-Mosqueira, M. I.; Jaren-Galan, M.; Garrido-Fernandez, J.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1103.
- Redgel, D.; Schewe, T.; Kuehn, H.; *Biochem.* **1995**, *60*, 715.
- Lanna, A. C.; Oliveira, M. G. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A.; *Braz. J. Plant Physiol.* **1996**, *8*, 87.
- Gardner, H. W.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1084*, 221.
- Croft, K. P. C.; Jüttner, F.; Slusarenko, A. J.; *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 13.