

FREDERICO DA SILVA FORTUNATO

MECANISMO DE RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO ATAQUE DE
Anticarsia gemmatalis PELA VIA DAS LIPOXIGENASES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

FREDERICO DA SILVA FORTUNATO

MECANISMO DE RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO ATAQUE DE
Anticarsia gemmatalis PELA VIA DAS LIPOXIGENASES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 07 de dezembro de 2001.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. José Cola Zanúncio
(Conselheiro)

Prof^a. Marli Lourdes de Oliveira

Prof. Carlos Siqueyuki Sedyama

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

A Deus.

À minha esposa Cynthia.

Ao meu filho Thiago.

Aos meus pais Hisahias e Marilena.

À Goreti.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), onde se realizou o trabalho de tese.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, pela presença, pelo estímulo e, acima de tudo, pela amizade que demonstrou no decorrer do curso.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela colaboração e pelo incentivo na execução deste trabalho.

Ao professor José Cola Zanúncio, pelo apoio e pelas sugestões enriquecedoras dispensadas durante este trabalho.

Ao professor Carlos Sigueyuki Sediama, pelas sugestões na parte estatística e na discussão dos resultados.

Ao Dr Flavio Moscardi do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSO-EMBRAPA), Londrina, Paraná, pelo envio de pupas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner.

Aos meus amigos Bárbara, Maria Regina, Christiano Pires, Giordani, Simone, Newton, Anderson, Márcio, Luciana, Inês, Aloísio e José Fausto, pela amizade e agradável convivência.

À secretária Solange Starling Brandão do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela atenção e amizade.

À secretária Marisa Imaculada Vieira Ferreira do Departamento de Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela atenção.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

FREDERICO DA SILVA FORTUNATO, filho de Hisahias Fortunato e Marilena da Silva Fortunato, nasceu em 04 de outubro de 1969, na cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo.

Em janeiro de 1992, graduou-se no curso de Farmácia na Faculdade de Farmácia e Bioquímica do Espírito Santo.

Em agosto de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 07 de dezembro de 2001.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	05
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DE LIPOXIGENASES FOLIARES ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO SOJA: LAGARTA.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Material Genético.....	26
2.2 Criação de lagarta da soja.....	27
2.2.1 Preparo da dieta artificial.....	28
2.2.2 Ataque de lagarta da soja.....	29
2.3. Obtenção de extratos foliares.....	29
2.4. Determinação da atividade de lipoxigenases.....	29
2.5. Determinação da atividade de lipoxigenases em vários valores de pH.....	30
2.6. Determinação da atividade de lipoxigenases em vários valores de temperatura.....	31
2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de plantas submetidas ao ataque da lagarta da soja.....	31

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1. Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja.....	32
3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja.....	34
3.3 Parâmetros cinéticos $K_{M\ app}$ e $V_{\ max\ app}$	36
CAPÍTULO 2	
AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DA VIA DAS LIPOXIGENASES DE PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ATAQUE DA LAGARTA DA SOJA.....	
	42
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Material genético.....	45
2.2 Criação de lagarta da soja.....	46
2.2.1 Preparo da dieta artificial.....	47
2.2.2 Ataque de lagarta da soja.....	48
2.3. Obtenção de extratos foliares.....	48
2.4. Determinação da atividade de lipoxigenases.....	48
2.5. Determinação da concentração de proteínas.....	49
2.6. Determinação da atividade específica de lipoxigenases em vários valores de pH.....	50
2.7. Determinação da atividade específica de lipoxigenases em vários valores de temperatura.....	50
2.8. Determinação de inibidores de proteases.....	51
2.9. Determinação de hexanal.....	52
2.10. Determinação de aldeídos totais.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1. Efeito do pH sobre a atividade específica do <i>pool</i> de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	54
3.2 Efeito da temperatura sobre a atividade específica do <i>pool</i> de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	56

3.3. Determinação da atividade específica do <i>pool</i> de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	58
3.4 Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	59
3.5. Determinação dos níveis de hexanal em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	67
3.6 Determinação dos níveis de aldeídos totais em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	71
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79

RESUMO

FORTUNATO, Frederico da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2001. **Mecanismo de resposta de plantas de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatilis* pela via das lipoxigenases.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e José Cola Zanúncio.

Lipoxigenases (EC: 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a dioxigenação estereoespecífica de ácidos graxos poliinsaturados que contêm o sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno, formando hidroperóxidos que são posteriormente metabolizados, produzindo substâncias fisiologicamente ativas.

A Via das Lipoxigenases promove a formação de compostos orgânicos voláteis responsáveis pelo *beany flavor* dos grãos de soja, o que limita a utilização dessa oleaginosa na alimentação humana. Outra barreira que limita o consumo da oleaginosa na dieta humana são os inibidores de proteases (KTI) que constituem um dos principais fatores antinutricionais da soja.

A Via das Lipoxigenases está ligada a importantes processos fisiológicos da planta, tais como: crescimento, desenvolvimento, senescência e na biossíntese de moléculas regulatórias. É postulado que os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra infestação de insetos e patógenos.

Uma estratégia para eliminação do *beany flavor* e dos fatores antinutricionais é a retirada, pela manipulação genética, das lipoxigenases e dos inibidores de proteases (KTI) dos grãos de soja, desde que essa

manipulação genética não altere as funções das lipoxigenases e dos inibidores de proteases presentes nas folhas de soja, tendo em vista suas participações nos mecanismos de defesa da planta a insetos-praga e patógenos. Esse trabalho avaliou a capacidade da planta da soja de responder ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) através da Via das Lipoxigenases.

Foram utilizados quatro genótipos da variedade CAC-1, contrastando para ausência e presença de genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases nas sementes. As plantas de soja foram submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) e os folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas tratadas foram coletados em 6, 12 e 24 horas na presença do inseto e em 6, 12, 24 e 48 horas na ausência do inseto, com os seus respectivos controles. Análises bioquímico-cinéticas mostraram dois picos mais acentuados de atividade e atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,5, com temperatura ótima de atividade e atividade específica a 25°C. Para os quatro genótipos, as atividades foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles. Os resultados de atividade específica sugerem que a planta de soja respondeu ao ataque da lagarta pelo aumento da atividade de lipoxigenases. Para os quatro genótipos, os valores de K_{Mapp} determinados no *pool* de lipoxigenases de folhas de soja em 6, 12 e 24 horas, em presença do inseto, e em 6, 12, 24 e 48 horas, na ausência do inseto, foram menores do que os respectivos controles. Houve um aumento nos níveis de inibidores de proteases para os quatro genótipos. A produção de hexanal e de aldeídos totais foi menor 48 horas após a retirada do inseto, indicando que ocorreu resposta da planta de soja ao ataque da lagarta pela Via das Lipoxigenases.

ABSTRACT

FORTUNATO, Frederico da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December de 2001. **Mechanism of answer of the soybean plants to *Anticarsia gemmatalis* attack by the lipoxygenases pathway.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee Members: Maurílio Alves Moreira and José Cola Zanúncio.

The lipoxygenases pathway is responsible for the forming of organic compounds responsible for the *beany flavor* in the soybean seeds, which limits the usage of the oleaginous in the human alimentation. Another barrier that limits the consumption of the oleaginous in the human diets is the inhibitors of proteases (KTI), which constitutes one of the main anti-nutritional factors of the soybeans.

The lipoxygenases pathway is connected to chief physiological processes of the plant, such as: growth, development, senescence and the biosynthesis of the regulatory molecules. It is postulated that the proteases inhibitors act in the plants defense mechanism against the infestation of insects and pathogens.

A strategy in the elimination of the *beany flavor* and the anti-nutritional factors is the removal, through genetic manipulation, of the lipoxygenases and the inhibitors of proteases (KTI) from the soybean seeds, provided that this genetic manipulation does not meddle with the functions of the lipoxygenases and the inhibitors of proteases present in the soybeans leaves, having in mind its partaking in the defenses mechanism towards the attack of the soybean

caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) through means of the lipoxygenases pathway.

Four genotypes of the variety CAC-1 were used, contrasting to the absence and presence of gene that codify the lipoxygenases and the inhibitors of proteases in the seeds. The soybean plants were yielded to the attack of the soybean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) and the follicles of the first trifoliolate leaf of the assisted plants were collected in 6,12 and 24 hours in the presence of the insect and 6, 12, 24 and 48 hours in the absence of the insect, with their respective controls. Biochemical-kinetic analyses displayed two more accentuated acme of activity and specific lipoxygenases activity at pH 4,5 and 6,5, with optimum activity temperature and specific activity at 25 °C, on the four genotypes, the activities were greater in the treatment than on the respective controls. The results for specific activity suggest that the soybean plant responded to the attack of the caterpillar through the increase of lipoxygenases activity. On the four genotypes, the rates of K_{Mapp} determined in the *pool* of lipoxygenases of soybean leaves, in 6, 12 and 24 hours, in the presence of the insect were smaller then respective controls. There was na increase in the proteases inhibition levels on the four genotypes. The production of hexanal and total aldehydes was fewer 48 hours after the removal of the insect, indicating that there happened a response from the soybean plant towards the attack from the caterpillar, through means of the lipoxygenases patway.

INTRODUÇÃO GERAL

Lipoxigenases (EC 1.13.11.12) catalisam a dioxigenação estereoespecífica de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, com formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando, assim, moléculas reativas com atividades fisiológicas pronunciadas. Este sistema ocorre comumente nos ácidos graxos di e triinsaturados, como o ácido linoléico e o ácido linolênico, os quais são os principais substratos de lipoxigenases em plantas superiores. O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas, compreendendo mais de 80% do grupo acil dos lipídios de membrana de cloroplastos. O ácido linoléico é encontrado em maior concentração em sementes e embriões (HILDEBRAND et al., 1988).

Em plantas, as lipoxigenases encontram-se organizadas em uma grande família multigênica que pode resultar em um dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas lipoxigenases que diferem quanto à especificidade pelo substrato, parâmetros bioquímicos e cinético-enzimáticos. Estima-se que o genoma de soja contém de 10 a 12 genes que expressam lipoxigenases (KOETJE e GRIMES, 1992; DUBBS e GRIMES, 2000).

O verdadeiro papel fisiológico das lipoxigenases de plantas ainda não está bem estabelecido (FORNAROLI et al., 1999).

Tem sido sugerido que essas isoenzimas, em plantas, estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento; na senescência; na resposta a ferimentos e a danos causados por insetos-praga e patógenos e na biossíntese de

moléculas regulatórias (SIEDOW, 1991). É sugerido, ainda, que as isoenzimas lipoxigenases são utilizadas como proteínas de reserva vegetativa no armazenamento temporário de nitrogênio (TRANBARGER et al., 1991).

As lipoxigenases de sementes de soja afetam as propriedades e as qualidades dos produtos alimentícios derivados, particularmente, pelas suas participações na formação dos compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis característicos desses produtos. O *beany flavor* origina-se da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração protéica. Estes compostos orgânicos são produtos finais de uma série de reações que se iniciam com a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados, catalisada por lipoxigenases. Em soja, o interesse por essas isoenzimas está associado, em grande parte, à sua importância na determinação das características organolépticas de diversos produtos alimentícios (HILDEBRAND, 1989).

As lipoxigenases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais superiores (MACK et al., 1987), fungos e leveduras (HILDEBRAND, 1989). Apesar de essas isoenzimas serem encontradas em muitos tecidos, os níveis de expressão variam entre os diferentes tecidos e órgãos (HILDEBRAND et al., 1988). Em soja, sua atividade também varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta (SIEDOW, 1991).

Dois principais vias para o metabolismo dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzidos pelas lipoxigenases, chamadas de Via das Lipoxigenases, vêm sendo propostas para plantas superiores, para as quais apenas alguns intermediários foram identificados até o momento. Assim, os hidroperóxidos são posteriormente metabolizados em plantas por diferentes enzimas, incluindo hidroperóxido liase e hidroperóxido ciclase. A hidroperóxido liase produz aldeídos de seis carbonos, como o trans-2-hexenal (componente que dá a característica sabor e odor de frutos e folhas) e a traumatina. Tem sido proposto que os aldeídos formados pela ação da Via das Lipoxigenase inibem o crescimento de fungos, insetos e protozoários (CROFT et al., 1993) e, ainda, que poderiam estar agindo como um sinal químico na atração do inimigo natural do herbívoro para a planta danificada (PARÉ e TUMLINSON, 1997). A traumatina, também conhecida como hormônio do fermento, e o ácido traumático são compostos que podem estar envolvidos no processo de

sinalização e divisão celular em resposta a ferimentos em plantas (ZIMMERMAN e COUDRON, 1979).

A hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico que, após uma redução e três β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico, que tem atividade de fitohormônio e está envolvido na regulação dos processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a insetos e patógenos; ou seja, na indução da expressão de genes que codificam inibidores de proteases (CROFT et al., 1993, GARDNER, 1991, FARMER e RYAN, 1992). É postulado que inibidores de proteases têm efeito em proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER et al., 1987, RYAN, 1990). Quando ocorrem ferimentos em folhas de plantas, ocorre rapidamente síntese de inibidores de proteases no local do ferimento, como também em folhas mais distantes (FARMER e RYAN, 1992). Diversos compostos identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam para inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, o ácido abscísico, o metil jasmonato, o ácido jasmônico e a sistemina. Os inibidores de proteases representam cerca de 6% das proteínas presentes no grão de soja (BRANDON et al., 1987) os quais constituem um dos principais fatores antinutricionais da soja (ANDERSON-HAFMANN et al., 1992).

Entre as pragas que atacam as culturas de soja, cita-se a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). A lagarta da soja alimenta-se de folhas jovens e, quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta. Por se tratar de um inseto mastigador, a lagarta pode levar a um desfolhamento completo da planta. O desfolhamento causado pela *A. gemmatalis* reduz a capacidade da planta de captar os raios solares, diminuindo sua produtividade. Os prejuízos são significativos, podendo afetar cerca de 40% da lavoura durante a fase de floração. Entretanto, essa praga pode levar a planta de soja à morte, especialmente quando há alta densidade populacional do inseto.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das plantas de soja de responder ao ataque da lagarta da soja por meio da Via das Lipoxigenases, o que, sem dúvida, poderá ser de importância fundamental em estudos que visem a manipulação genética e a obtenção de cultivares

resistentes ao ataque de insetos. Foram utilizados neste trabalho quatro genótipos de soja: a variedade comercial, CAC-1, contendo as três isoenzimas lipoxigenases na semente; o genótipo CAC-1 TN modificado geneticamente, apresentando ausência completa das três isoenzimas lipoxigenases nas sementes; o genótipo CAC-1 KT modificado geneticamente, apresentando as três isoenzimas lipoxigenases nas sementes e ausência completa do inibidor de protease Kunitz nas sementes; e o genótipo CAC-1 TN KT, modificado geneticamente, apresentando ausência completa das três isoenzimas lipoxigenases e do inibidor de protease Kunitz nas sementes.

REVISÃO DE LITERATURA

A cultura da soja

Nos últimos anos, no Brasil, muitas pesquisas com soja têm sido desenvolvidas, apresentando alta competência técnica para garantir seu avanço durante a próxima década. Os ganhos constantes de produtividade de grãos, proporcionados pelo desenvolvimento de tecnologias e de variedades de soja superiores, atendem parcialmente as demandas do mercado consumidor e fazem com que os incrementos na área plantada com soja sejam menores (aumento da produtividade por hectares). No Brasil, os programas de melhoramento vêm cumprindo suas metas de produtividade, apresentando ganhos genéticos anuais que têm beneficiado os produtores de soja e a sociedade. Os aumentos anuais de produtividade eventualmente são desacelerados em função da ocorrência de doenças, como foi o caso da mancha olho-de-rã (*Cercospora sojina*), do cancro da haste (*Phomopsis phaseoli f.sp. meridionalis*) e do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*).

Estes problemas foram rapidamente absorvidos pela equipe de pesquisadores de diversas especialidades, que desenvolveram variedades resistentes e competitivas para substituírem variedades antigas (TOLEDO, 1999).

Vários grupos de pesquisa, ensino e extensão, de instituições públicas e privadas, vêm disponibilizando tecnologias inovadoras, atendendo demandas

de vários setores da cadeia da soja, o que tem garantido o sucesso da cultura no Brasil. Devido a sua excelente qualidade nutritiva, a soja tem se tornado cada vez mais recomendada para inclusão na alimentação humana como um alimento rico em proteínas e lipídios (EMBRAPA, 2000).

Isoenzimas Lipoxigenases

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidorreductase, E.C. 1.13.11.12) são enzimas envolvidas na dioxigenação estereoespecífica dos ácidos graxos contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, estando presentes em plantas, animais superiores, fungos e leveduras (HATANAKA et al., 1982; MACK et al., 1987; HILDEBRAND, 1989).

O imediato produto da dioxigenação dos ácidos graxos insaturados pelas lipoxigenases são os hidroperóxidos, os quais são transformados em um espectro de compostos com atividade biológica pronunciada tais como leucotrienos e lipoxinas, em animais, e ácido jasmônico, ácido traumático, alquenos, aldeídos e álcoois em plantas (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987; VICK e ZIMMERMAN, 1987).

No sistema animal o papel das lipoxigenases é bem estabelecido. O ácido araquidônico é convertido em ácido hidroperoxieicosatetranóico, em mamíferos. As lipoxigenases catalisam o primeiro passo na síntese dos compostos regulatórios leucotrienos e lipoxinas, os quais desempenham funções na inflamação, imunidade, hipersensibilidade e nas reações de defesa do hospedeiro (MATSUI et al., 1999).

As lipoxigenases, em plantas, têm sido implicadas na ativação da resposta de defesa contra injúria, resistência a insetos e patógenos (BELL e MULLET, 1993; MELAN et al., 1993; CROFT et al., 1993; SARAVITZ e SIEDOW, 1996; HEITZ et al., 1997; BOHLAND et al., 1997; FIDANTSEF e BOSTOCK, 1998; SILVA, 1999.; REDDY et al., 2000), em processos como crescimento e desenvolvimento (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991), senescência (ROUET-MAYER et al., 1992), reserva vegetativa (TRANBARGER et al., 1991; BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al., 1998), germinação de sementes (PARK et al., 1994), resposta a ferimento mecânico (VIEIRA, 2001) e

biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios (ANDERSON et al., 1989; FARMER e RYAN, 1992). Produtos da Via das Lipoxigenases, como traumatina, ácido jasmônico, alquenos e aldeídos voláteis, são utilizados como mensageiros químicos na via de transdução de sinais da resposta a injúria, nas interações patógeno-hospedeiro e como reguladores do crescimento e desenvolvimento (Figura 1).

Em plantas, tem sido sugerido que as lipoxigenases estão envolvidas no mecanismo de resistência conhecido como resposta de hipersensibilidade (HR), uma forma programada de morte celular. Esta reação limita a propagação do patógeno e previne dano ao restante da planta (CROFT et al., 1990; KOCH et al., 1992; RUSTERUCCI et al., 1999).

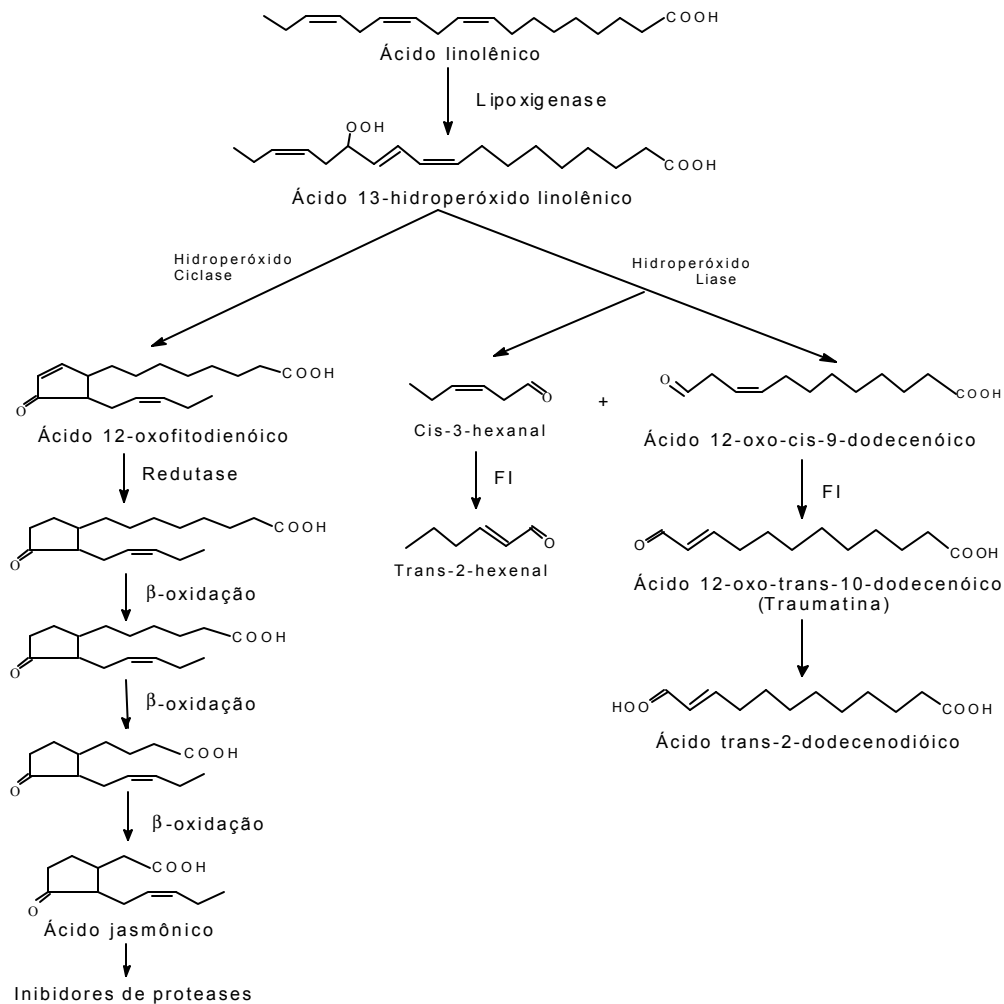


Figura 1 - Via bioquímica das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolênico. FI: fator de isomerização (CROFT et al., 1993; GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992).

O seqüenciamento de genes que codificam as isoenzimas em plantas e animais revelou regiões de grande homologia, sugerindo origem evolucionária comum entre as lipoxigenases de plantas e animais (HILDEBRAND et al., 1988). Os ácidos linolênico ($C_{18:3}$) e linoléico ($C_{18:2}$) são os principais substratos para lipoxigenases em plantas superiores. A introdução do oxigênio molecular é feita nos carbonos 9 ou 13- do ácido linoléico ou linolênico, formando os ácidos 9-hidroperoxiloléico (9-HPO) e 13-hidroperoxiloléico (13-HPO) ou linolênico (SANZ et al., 1992). A relação quantitativa entre 9HPO e 13-HPO

formados difere para lipoxigenases de diferentes espécies de plantas (VICK e ZIMMERMAN, 1987).

REDDY et al. (2000) verificaram que o 9-HPO foi o produto formado em maior quantidade durante um ensaio controle no tubérculo de batata. Entretanto, o ácido 9-hidroperoxidodecanotrienóico (9-HPOTrE), derivado do ácido linolênico, foi o produto formado em maior quantidade pela ação da lipoxigenase no tratamento em resposta a injúria ou infecção com *Rhizoctonia bataticola* no tubérculo de batata. Os resultados da razão entre 9-HPO e 9-HPOTrE foram 4:1 para o controle e 1:2 e 1:4,5, respectivamente, na injúria e infecção do tubérculo de batata. Os autores sugerem que os metabólitos da ação das lipoxigenases sobre o ácido linoléico estão envolvidos na resposta fisiológica, como verificado no controle, e que os metabólitos do ácido linolênico estão mediando a resposta de defesa no tubérculo de batata, como verificado nos tratamentos.

Em plantas, danos causados por ferimento mecânico, herbívoro ou pelo ataque de patógenos elevam o nível de ácido jasmônico endógeno, induzindo a expressão de genes específicos responsáveis pelo combate ao estresse. A liberação do ácido linolênico da membrana tem sido um importante passo no controle da síntese de ácido jasmônico.

Estudos têm sugerido que a fosfolipase D (PLD) tem um importante papel na hidrólise de lipídios mediante o ferimento induzido. A translocação intracelular da PLD do citosol para a membrana ocorre mediante o aumento intracelular da concentração citoplasmática de Ca^{2+} (RYU e WANG, 1995). A PLD associada à membrana torna-se ativa e produz ácidos graxos poliinsaturados livres da membrana fosfolipídica iniciando o processo lipolítico, o que leva a formação de ácido jasmônico e aldeídos voláteis de seis carbonos. WANG et al. (2000) verificaram que múltiplas formas de PLD foram ativadas em resposta a ferimento e as expressões destas formas (PLD α , PLD β e PLD γ) foram diferentes em ferimento de folhas de *Arabidopsis thaliana* .

Ao lado da soja, outras culturas vêm sendo estudadas com o objetivo de se determinar o real papel fisiológico das lipoxigenases, dentre elas: trigo (WASTERNAK e PARTHIER, 1997; BOHLAND et al., 1997), ervilha (ANSTIS e FRIEND, 1974), cevada (REINBOTHE et al., 1997), batata (GEERTS et al., 1994; FIDANTSEF e BOSTOCK, 1998), tomate (GREEN e RYAN, 1972;

PEARCE et al., 1991; HEITZ et al., 1997), arroz (OHTA et al., 1991), tabaco (RICKAUER et al., 1997; FARMER e RYAN, 1992), grão-de-bico (SANZ et al., 1992), *Arabidopsis thaliana* (BELL e MULLET, 1993; MELAN et al., 1993), sementes de pepino (MATSUI et al., 1999), dentre outras.

Em tecidos foliares, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de ácido jasmônico e metil jasmonatos que, por sua vez, atuam na indução da síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimento e, portanto, atuam como uma reação à infestação por pragas e patógenos (FARMER e RYAN, 1992). Tratamentos de plantas com inibidores de lipoxigenases reduzem a síntese de ácido jasmônico (BELL et al., 1995). O início da sinalização para a biossíntese do ácido jasmônico se dá por meio de ligação de um peptídeo de 18 aminoácidos, chamado sistemina, a um receptor na membrana plasmática. Este, além de estar envolvido na síntese de ácido jasmônico, é também um dos sinalizadores da resposta sistêmica. Além do ácido jasmônico, dois outros compostos estão envolvidos na resposta de defesa: o ácido salicílico e o etileno (SIVASANKAR et al., 2000). Em particular, a atividade de lipoxigenases aumenta durante interações em vários sistemas planta-patógeno (ROSAHL, 1996).

As lipoxigenases têm sua expressão aumentada em folhas, quando da ocorrência de ferimento (BOHLAND et al., 1997). A planta de soja tem sido destacada por conter altas concentrações de lipoxigenases sendo, por isso, o material biológico mais utilizado em estudos da enzima. Nesta planta, estas enzimas encontram-se organizadas em uma grande família multigênica (SIEDOW, 1991) que podem resultar, em um dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas de lipoxigenases, que diferem na especificidade pelo substrato, parâmetros cinéticos e estereoespecificidade na dioxigenação do substrato (LEÓN e SANCHEZ-SERRANO, 1999). Lipoxigenases (TRANBARGER et al., 1991) e proteínas de reserva vegetativa (FRANCESCHI e GIAQUINTA, 1983a, b, c; FRANCESCHI et al., 1983) acumulam-se temporariamente nas células especializadas do mesófilo paraveinal, uma única célula na qual se interconectam as veias do parênquima e do mesófilo (FISHER, 1967). Acredita-se que as células do mesófilo paraveinal atuam como um intermediário para armazenamento temporário de nitrogênio e para mobilização de nutrientes entre tecidos de fonte fotossintética (FRANCESCHI e GIAQUINTA, 1983a; FRANCESCHI et al., 1983;

EVERARD et al., 1990a, b). Assim, algumas plantas desenvolveram estratégias estruturais e moleculares para modular a provisão de nitrogênio devido às demandas metabólicas.

A traumatina e o ácido traumático são compostos que podem estar envolvidos no processo de sinalização e divisão celular em resposta a ferimento em plantas (ZIMMERMAN e COUDRON, 1979). O ácido jasmônico é um potente indutor de inibidores de proteases quando plantas são injuriadas (MULLER, 1997). FARMER e RYAN (1992) postularam que o ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa (inibidores de proteases). Segundo esses autores (Figura 2), quando a planta é ferida por inseto, é produzido um sinal sistêmico: sistemina (um peptídeo constituído de dezoito resíduos de aminoácidos); ou quando a planta é injuriada por um patógeno, é produzida uma molécula-sinal: oligouronídeo polissacarídeo presente na parede celular de plantas, liberado pela ação de patógenos). RICKAUEAR et al. (1992) verificaram que oligogalacturonídeos e quitosanas (polissacarídeos liberados da parede celular de fungos) também atuam como moléculas-sinais. WASTERNAK e PARTHEIR (1997) identificaram vários outros compostos e proteínas envolvidos na via de sinalização. Um deles foi a prosistemina, um polipeptídeo contendo 200 resíduos de aminoácidos que dá origem à sistemina (sinal sistêmico induzido, expresso após ferimento, que pode ser translocado via floema e alcançar as partes aéreas da planta).

A produção de ácido jasmônico é um processo regulado e as concentrações desse ácido em tecidos normais (não estressados) da planta são, geralmente, muito baixas (WANG et al., 2000). Entretanto, o ácido jasmônico se acumula em plantas feridas ou em células de plantas tratadas com patógenos. O papel dos jasmonatos na indução de genes de defesa contra estresse tem sido caracterizado com respeito à expressão de genes de inibidores de proteases induzidos por ferimento, os quais protegem a planta contra serino-proteases digestivas de insetos herbívoros (FARMER e RYAN, 1992).

A enzima aleno óxido sintetase (AOS) catalisa o primeiro passo na biossíntese de ácido jasmônico a partir do hidroperóxido de ácido linolênico (HPOT), derivado da ação da lipoxigenase. O ácido salicílico inibe a síntese de inibidores de proteases induzida por ferimentos, oligouronídeos, ácido

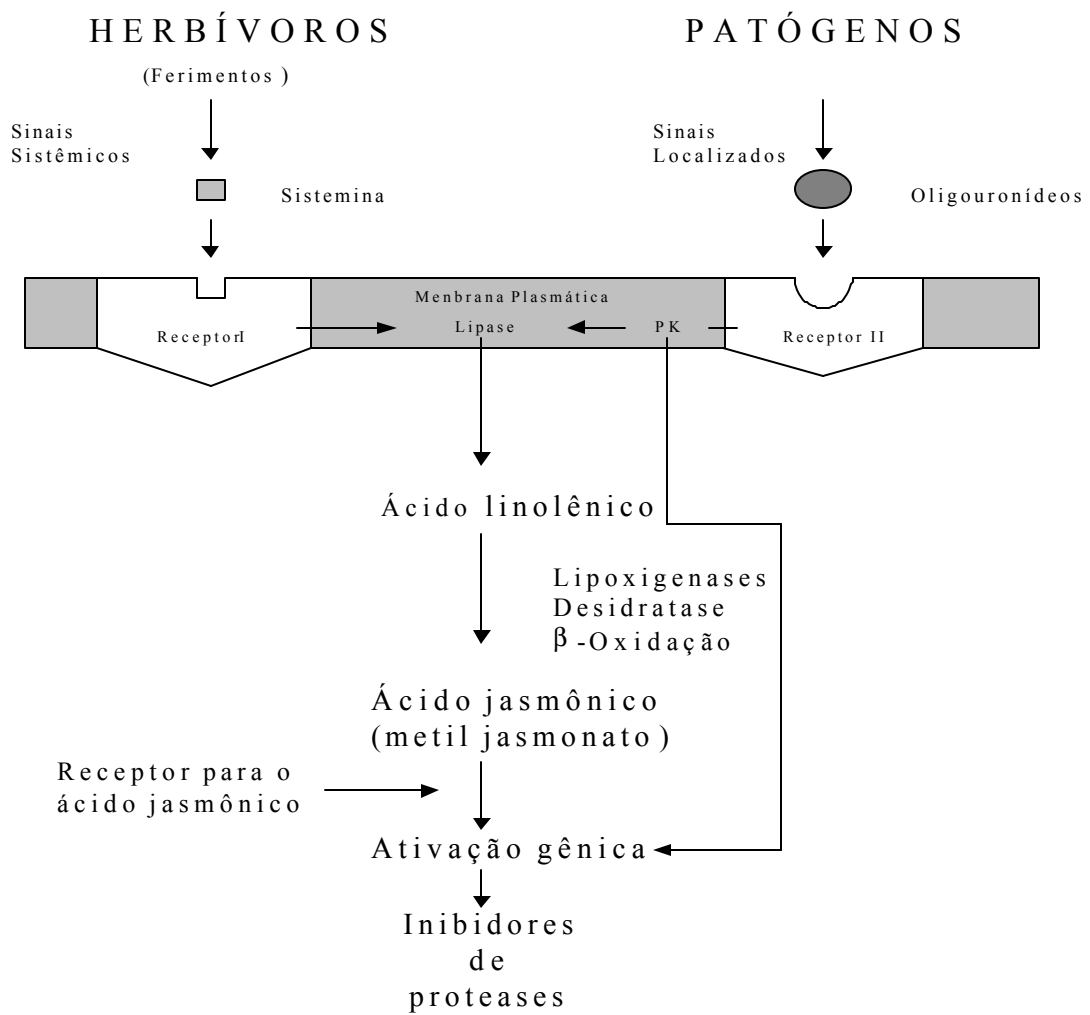


Figura 2 - Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por ferimento em folhas de tomate. PK=Proteína Cinase (FARMER & RYAN, 1992).

jasmônico e sistemina, pois ele inibe a AOS responsável pela conversão do ácido 13-S-hidroperóxido linolênico para 12-oxo-fitodienóico (12-oxo-PDA), bloqueando a síntese de ácido jasmônico.

SIVASANKAR et al., (2000) verificaram que o ácido salicílico inibe a AOS e a expressão do gene de inibidor de protease (PIN II), enquanto o, ácido 12-oxo-fitodienóico ou metil jasmonato não reverte o poder de inibição da AOS e, conseqüentemente, a expressão de PIN II em presença de ácido salicílico. O etileno induz a expressão da AOS, mas a presença somente do etileno não produz uma indução do PIN II.

A adição de tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do etileno, evita a expressão de ambos, AOS e PIN II, no ferimento induzido. Os produtos da hidroperóxido liase também não afetam AOS e PIN II, mas induzem a expressão da prosistemina. Com base nos resultados obtidos, foi proposta uma atualização para o modelo de ativação do gene de defesa no tomate (Figura 3).

Os ácidos graxos liberados pela ação da fosfolipase são substratos para lipoxigenase. Os hidroperóxidos de ácidos graxos produzidos pela ação da lipoxigenase são usados pela AOS para formar o ácido 12-oxo-fitodienóico e o metil jasmonato, ou pela hidroperóxido liase para formar aldeídos de seis carbonos volatéis e traumatina. O ácido 12-oxo-fitodienóico e o metil jasmonato são ativadores da expressão de genes de defesa. Os aldeídos de seis carbonos voláteis e a traumatina induzem a expressão da prosistemina. O etileno, produzido na resposta ao ferimento, induz a expressão da AOS. Etileno e metil jasmonato são requeridos para um aumento da expressão do PIN II.

RICKAUER et al. (1997) demonstraram que a indução da síntese de inibidores de proteases em suspensões de células de tabaco por ácido jasmônico era precedida por um aumento na atividade de lipoxigenases. O ácido jasmônico e o ácido abscísico provocam o aumento da expressão de genes induzidos quando são aplicados nas partes externas da planta ou quando esta é ferida (REINBOTHE et al., 1997 e DAMMANN et al., 1997).

Similar ao ferimento, a aplicação exógena de ácido jasmônico em plantas de tomate e batata induziu a ativação transcricional de genes de inibidores de proteases, não somente nos tecidos tratados, mas também sistematicamente nas folhas mais distantes (FARMER e RYAN, 1992). A

indução sistêmica de genes de inibidores de proteases, para ferimento, apontam para a existência de sinais gerados nos sítios do ferimento que são translocados para partes distantes da planta (LEÓN e SANCHEZ-SERRANO, 1999). Os inibidores de proteases de grãos de soja são representados pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (BBI). O inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (BBI) inibe preferencialmente a quimotripsina (BRANDON et al., 1987). Cerca de 80% da inibição da atividade trípica em sementes de soja é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI.

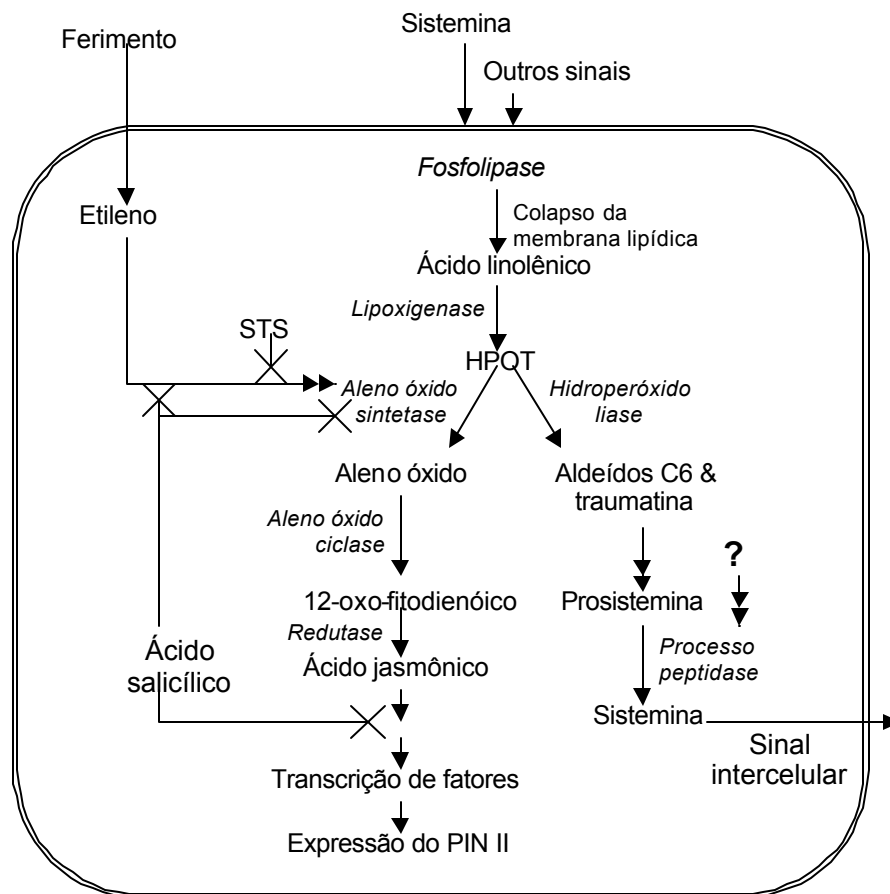


Figura 3 - Atualização do modelo proposto para ativação do gene de defesa no tomate (SIVASANKAR, 2000).

O KTI apresenta estrutura primária constituída por 181 resíduos de aminoácidos, com duas pontes bissulfídricas que, uma vez rompidas, acarretam perda da atividade biológica desse inibidor. O BBI é constituído de uma única cadeia polipeptídica, com 71 resíduos de aminoácidos e sete pontes bissulfídricas, o que confere à molécula rigidez e grande estabilidade térmica (BRANDON et al., 1993).

O aumento na expressão de genes de lipoxigenases foi detectado em plantas submetidas a vários tipos de estresses, incluindo ataque por insetos (HILDEBRAND et al., 1989), infecção por bactérias e fungos patogênicos (YAMANOTO e TANI, 1986) baixos níveis de água (BELL e MULLET, 1991) e ferimento mecânico (HILDEBRAND et al., 1989; GEERTS et al., 1994; SARAVITZ e SIEDOW, 1996). Embora haja aumento da expressão de genes de lipoxigenases associado ao estresse, a sua função fisiológica não está bem estabelecida. O estresse causado por ferimento mecânico, herbívoro ou pelo ataque de patógenos eleva o nível de ácido jasmônico endógeno, induzindo a expressão do genes específicos responsáveis pelo combate do estresse. O papel dos jasmonatos na sinalização do estresse provocado por ferimento induzido tem sido melhor caracterizado pela expressão dos genes inibidores de proteases, os quais protegem a planta contra a serino proteases digestivas de insetos herbívoros (FARMER e RYAN 1992). As plantas parecem ter desenvolvido inibidores de proteases com extraordinária propriedade contra proteases de insetos. Esses inibidores são muito resistentes à proteólise e possuem atividade inibitória nos diferentes valores de pH intestinais (CHRISTELLER et al., 1994).

Os inibidores de proteases mais abundantes são aqueles capazes de inibir as serino proteases, grupo das tripsinas e quimotripsinas, enzimas encontradas majoritariamente em insetos da ordem Lepidoptera (TERRA E FERREIRA, 1994), como por exemplo *A. gemmatalis*, lagarta que causa desfolhamento severo na soja. Os inibidores de serino e cisteíno proteases são amplamente distribuídos em sementes e tecidos de reserva de plantas; além de protegerem as plantas contra o ataque de insetos, estes inibidores são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes.

A atividade da lipoxigenase tem sido identificada consistentemente durante a resposta de defesa das plantas. SARAVITZ e SIEDOW (1996)

sugeriram a existência de, no mínimo, dois genes de lipoxigenase de folhas de soja que codificam LOX 7 e LOX 8, presentes em folhas feridas e que têm a sua transcrição aumentada oito horas após o ferimento. LOX 8 é aumentada na resposta local, enquanto LOX 7 é aumentada na resposta sistêmica. Segundo SARAVITZ e SIEDOW (1996), ainda não é claro o papel das lipoxigenases no sistema de defesa das plantas, no entanto elas fazem parte de uma complexa via de transdução de sinais.

Lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, é considerada uma das pragas chaves da cultura da soja. É uma espécie de ampla ocorrência no Hemisfério Ocidental, sendo característica de clima tropical e subtropical, apresentando uma distribuição desde o Canadá até a Argentina (FORD et al., 1975). No Brasil, esta praga ocorre desde o sul de Goiás e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul (PANIZZI et al., 1977). A larva desta espécie é vulgarmente denominada nos EUA de “velvetbean caterpillar” devido aos vários desfolhamentos causados a *Stilozobium deeriugianum* Bort, conhecida como “velvetbean” (feijão veludo). No México ela é conhecida por “gusano terciopelo”, no Brasil é chamada de “lagarta-da-soja” (FORD et al., 1975) e na Argentina é denominada “oruga das leguminosas”.

A. gemmatalis é uma praga desfolhadora que normalmente se alimenta da metade superior ou do terço superior de plantas da soja. Após a destruição das folhas da parte superior da planta, a lagarta passa às folhas inferiores, se alimentando, a seguir, das partes terminais dos caules, sendo que, excepcionalmente, quando ocorrem altas infestações, ela pode também se alimentar das ramas e vagens pequenas. A lagarta da soja é considerada primariamente uma praga das leguminosas, embora tenham sido registrados surtos em algodoeiro (HINDS e OSTERBERGE, 1931), arroz (TARRAGÓ et al., 1977) e pastagens (WILLE, 1943)

A. gemmatalis se desenvolve em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto.

- a) Ovo: Os ovos têm formato arredondado, são esbranquiçados até dois dias antes da eclosão, quando então tornam-se rosados, enquanto ELISOR (1942) relatou que estes apresentavam coloração marrom-avermelhada pouco antes da eclosão. Este mesmo autor citou que os ovos colocados nos meses de julho, agosto e setembro, eclodem lagartas em cerca de três dias. WATSON (1916) relata que os ovos colocados no mês de novembro (época mais fria no Hemisfério Norte) têm um período de incubação de uma semana ou mais, o que pode torná-los inviáveis. REID (1975) observou que os ovos que foram mantidos a $24 \pm 0^{\circ}\text{C}$ eclodem em dois ou três dias. MOSCARDI (1979) verificou o efeito da temperatura sobre a oviposição, sobre a eclosão de lagartas e sobre a longevidade de *A. gemmatalis*. A fecundidade média variou de 310 ovos por fêmea a $32,2^{\circ}\text{C}$ a 842,16 ovos por fêmea a $26,7^{\circ}\text{C}$. Nas temperaturas extremas, a fecundidade foi reduzida, sendo que as fêmeas mantidas a $21,1^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma maior capacidade de postura do que as de $32,2^{\circ}\text{C}$. A porcentagem média de eclosão variou de 68,6% a $21,1^{\circ}\text{C}$ para 85,71% em temperaturas não controladas. Os valores obtidos a $21,1^{\circ}\text{C}$ foram significativamente baixos em relação às outras temperaturas. WATSON (1916) observou que *A. gemmatalis* faz postura isolada na face inferior das folhas de feijão veludo, sendo menos freqüente nas hastes e nos pecíolos. GRENNE et al. (1973) verificaram que a postura é realizada durante a noite, sendo que o pico de oviposição ocorre entre 21 e 23 horas e que a postura é maior com o decréscimo da temperatura e o aumento da umidade, diminuindo à medida que o orvalho acumula-se na planta.
- b) Lagartas (larvas): *A. gemmatalis* apresenta seis ínstars, com número variável de cinco a oito. O número de ínstars é afetado pela temperatura, pela idade da folha e pelo hospedeiro (WATSON, 1916; REID, 1975; NICKLE, 1977). No final da estação climática favorável, alguns indivíduos podem apresentar até sete “mudas”. Nos dois primeiros ínstars, a lagarta danifica levemente o parênquima foliar deixando as nervuras intactas. Após o segundo ínstar, a lagarta consome completamente a folha, com possível exceção da nervura central e lateral (WATSON, 1916). Os três primeiros ínstars causam

prejuízos pequenos às folhas, ocorrendo grandes danos quando atingem os últimos ínstaes larvais. A variação de coloração em lagartas de *A. gemmatalis* foi amplamente abordada por WATSON (1916) e GUYTON (1940). De acordo com esses autores, as lagartas muito jovens apresentam sempre coloração verde e após o primeiro ínstar a coloração varia de verde-claro até formas escuras. A lagarta, após um período de três a quatro semanas, completa o seu desenvolvimento medindo cerca de 35 mm de comprimento e tendo coloração variada. REID (1975) verificou o efeito da temperatura sobre o número de ecdises de *A. gemmatalis*. As lagartas criadas em temperaturas acima de 18,3 °C tiveram cinco ou seis ínstaes; entretanto, aquelas criadas em temperaturas inferiores tiveram de seis a sete ínstaes.

- c) Pupa: As pupas mudam de coloração em 24 horas, passando de verde-claro inicial para marrom-brilhante. Elas medem cerca de 18 a 20 mm de comprimento por 4 a 6 mm de diâmetro, são do tipo obtecta e completam o desenvolvimento em sete dias no mês de agosto e em dez a onze dias em setembro (WATSON, 1916).
- d) Adultos: A primeira descrição dos adultos de *A. gemmatalis* foi feita por WATSON (1916), que registrou grande variação de coloração, desde marrom-claro até marrom-escuro (avermelhado). As diferenças morfológicas entre os sexos foram descritas por GREENE (1974) baseando-se no comprimento e na forma das escamas das pernas do macho e da fêmea. GREENE et al. (1973) estudaram o acasalamento em condições de campo, comprovando a liberação do feromônio sexual pela fêmea como precursor da cópula. O pico de acasalamento ocorreu duas horas após o pôr-do-sol, diminuindo gradativamente até 12 horas. LEPPLA (1976) estudou o acasalamento de *A. gemmatalis* em condições de laboratório (27± °C), observando que o pico de acasalamento ocorreu durante as primeiras 48 horas após emergências dos adultos, continuando em nível reduzido até o sexto dia. A postura iniciou-se no terceiro dia, com o pico de oviposição ocorrendo no quinto dia.

O desfolhamento causado pela *A. gemmatalis* reduz a capacidade da planta de captar os raios solares, diminuindo a produtividade. Os prejuízos são significativos se o desfolhamento afeta mais de 40% da lavoura na fase de floração.

O combate químico à lagarta é feito, principalmente, com piretróides, mas é o controle biológico o mais adequado, pois proporciona resultado semelhante e preserva a natureza. O inseticida biológico conhecido como *Baculovirus anticarsia*, que atua somente em determinados organismos vivos, foi desenvolvido pela Embrapa-Soja, em Londrina (PR), e é feito da estirpe da lagarta, não causando nenhum efeito a outros inimigos da soja. O *Baculovirus anticarsia* atua quando a lagarta ingere as folhas onde o produto foi aplicado. O vírus se multiplica no interior da lagarta, que pára de se alimentar quatro dias após a aplicação e morre três dias depois. As lagartas que morrem apresentam corpo mole e amarelado e liberam grande quantidade de vírus, que contaminam novos insetos que surjem. Este efeito não ocorre quando se utiliza inseticidas químicos, além de não afetar outros predadores naturais e preservar o meio ambiente e o homem de efeitos tóxicos. O uso do *Baculovirus anticarsia* ainda tem a vantagem de reduzir os custos de produção, pois é mais barato se comparado aos químicos. Mesmo quando desfolhada em níveis de 30% a 40%, a soja tem grande capacidade de recuperação, o que possibilita à cultura resgatar os índices de produtividade.

Convém salientar que o *Baculovirus anticarsia* controla somente a lagarta da soja, não podendo ser utilizado contra outras pragas. Quando ocorrer ataques de lagarta da soja no início do desenvolvimento da cultura (plantas até o estágio V4 três folhas trifoliadas), especialmente quando estiver associada com períodos de seca, o controle dessa praga deverá ser realizado com outros produtos recomendados (EMBRAPA, 1996).

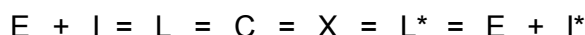
É importante ainda ressaltar que o controle biológico isoladamente não apresenta uma solução definitiva para o controle da *A. gemmatalis* e que durante todo o seu ciclo a soja é atacada por várias pragas.

Inibidores de proteases

LASKOWSKI e KATO (1980) propuseram a classificação dos inibidores em famílias, baseados na extensa homologia entre seus membros. Os inibidores de serino proteases de plantas foram agrupadas em quatro famílias: família do inibidor de tripsina (Kunitz) de soja, família do inibidor de protease (Bowman-Birk) de soja, família do inibidor I de batata e a família do inibidor II de batata; mais adiante foi adicionada a família do inibidor de tripsina de abóbora (WIECZOREK et al., 1985) e a família do inibidor de tripsina e α -amilase. A família do inibidor de tripsina e α -amilase é característica em sementes de cereais. Ela inclui diversas proteínas como inibidor de protease de cevada (ODANI et al., 1983) e milho (MAHONEY et al., 1984), inibidor de α -amilase de trigo (KASHLAN et al., 1981) e duas proteínas da cevada solúveis em clorofórmio-metanol (PAZ-ARE et al., 1986).

O mecanismo da interação entre os inibidores e as serino proteases foi revisto por LASKOWSKI e KATO (1980). Esse mecanismo envolve a formação de um complexo entre a enzima e o inibidor semelhante ao formado entre a enzima e seu substrato. A interação ocorre entre uma ligação peptídica na superfície da molécula do inibidor, chamada sítio reativo, e o sítio ativo da enzima. O valor de k_{cat}/K_M para a hidrólise dessa ligação peptídica pela enzima a pH neutro é muito alto, 10^4 - 10^6 $M^{-1}.s^{-1}$ (ESTELL et al., 1980), comparado a um valor típico do substrato normal de 10^3 $M^{-1}.s^{-1}$. Para a hidrólise de um inibidor de protease, os valores de K_{cat} e K_M são muitas ordens de magnitude abaixo que os valores para o substrato normal (LASKOWSKI e KATO, 1980). Por essa razão, a ligação é muito lentamente hidrolisada e o sistema se comporta como se estivesse em equilíbrio, a enzima e o inibidor de lado e o complexo enzima-inibidor do outro; a constante de equilíbrio resultante é muito alta (10^7 a 10^{13} M^{-1}). A hidrólise da ligação peptídica do sítio reativo não é completa; a pH neutro há um equilíbrio entre o inibidor modificado (com a ligação clivada do sítio reativo) e o inibidor não modificado (com a ligação intacta), de forma que a constante de equilíbrio esteja próxima da unidade. O mecanismo total da interação enzima-inibidor, incluindo apenas aqueles

intermediários cujas existências foram definitivamente confirmadas, pode ser escrito como (LASKOWSKI e KATO, 1980):



em que E é a enzima; I e I* são os inibidores não modificados e modificados, respectivamente; L e L* são complexos não covalentes (rapidamente dissociáveis) de E com I e I*, respectivamente; X é um intermediário de relativa vida longa, e C é o complexo estável da enzima-inibidor.

As análises de cristalografia de Raio-X dos complexos estáveis de vários inibidores com as enzimas demonstraram que o sítio reativo do inibidor reage com o sítio ativo da enzima de certa forma semelhante ao substrato (MCPHALEN et al., 1985). Em cada caso ocorrem inúmeros contatos entre a enzima e o inibidor, o que leva a um ajuste otimizado, embora uma pequena adaptação conformacional do inibidor (presumivelmente no passo L = C) aconteça. Durante o contato entre a enzima e o inibidor, numerosas interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas são formadas.

HIXSON e LASKOWSKI (1970) sugerem que o inibidor de tripsina e a protease formem um intermediário acil-enzima. BLOW e STEIZ (1970) descrevem que a deslocalização de cargas negativas no centro ativo da enzima contribui para a estabilização de um carbono tetraédrico.

Subseqüentemente, tomando-se como base dados mais refinados de Raio-X, a formação de um carbono covalente tetraédrico estava fora de questão e foi concluído que um complexo não covalente foi formado onde o carbono da carbonila da Lys-15 do inibidor de tripsina assumia uma estrutura tetraédrica distorcida intermediária entre a hibridação sp^2 e sp^3 e que o átomo de O γ da Ser-195 da tripsina era o causador da distorção tetraédrica (HÜBER et al., 1974).

Essa visão foi abandonada quando se percebeu o que ocorre com a anidrotripsina, um derivado cataliticamente inativo da tripsina que forma complexo estável com o inibidor de força comparável e essencialmente com a mesma geometria (AKO et al., 1974) e com distorção tetraédrica precisamente igual a de um complexo com a tripsina (HÜBER et al., 1974). Todavia, a

distorção tetraédrica parcial ocorre. Acredita-se atualmente que a distorção é o resultado da atração entre o oxigênio da carbonila do inibidor e a cavidade oxianionica (KRAUT, 1977) da tripsina. O carbono da carbonila do inibidor é agora posicionado para ataque nucleofílico pelo oxigênio O^γ da Ser¹⁹⁵ da enzima, mas no complexo estável anidrotripsina e inibidor o ataque não ocorre. É importante observar que os resultados de estudos de cristalografia de Raios-X (LASKOSWIKI e KATO, 1980; READ et al., 1983) e ressonância magnética nuclear ¹³C (BAILLARGEON et al., 1980) em complexos isolados não mostraram a existência de um átomo de carbono tetraédrico no sítio reativo do inibidor nos complexos isolados.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DE LIPOXIGENASES FOLIARES ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO SOJA: LAGARTA

1. INTRODUÇÃO

A soja tem grande contribuição na produção mundial de grãos, mas, apesar disto, seu uso na dieta alimentar é ainda modesto. Essa barreira alimentar aos produtos de soja está associada, basicamente à presença de fatores antinutricionais em seus grãos. Tal barreira é representada pelo sabor denominado *beany flavor*, presente nos produtos derivados da soja e que representa o maior obstáculo ao seu consumo nos países ocidentais (RACKIS et al., 1979), e pelos inibidores de proteases, os quais constituem um dos principais fatores antinutricionais da soja (ANDERSON-HAFMANN et al., 1992).

O *beany flavor* origina-se da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta, os quais são produtos da Via das Lipoxigenases, em plantas, com a fração protéica. Esta enzima constitui cerca de 1% do total de proteínas presentes no grão (AXELROD et al., 1981).

Os inibidores de proteases representam cerca de 6% das proteínas presentes no grão de soja (BRANDON et al., 1987) e são representados pelos inibidores de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina

Bowman-Birk (BBI) (STAHLHUT e HYMOWITZ, 1983), sendo a ação do KTI responsável por cerca de 80% da inibição da atividade triptica no grão de soja.

A eliminação genética de lipoxigenases e do KTI por retrocruzamentos entre linhagens que apresentam alelos nulos para sua ausência podem reduzir o *beany flavor* e a ação dos inibidores de proteases, fatores antinutricionais, em variedades comerciais de soja. Além disso, o aumento da expressão de lipoxigenases foliares tem sido detectado em plantas durante ou após uma variedade de estresses, incluindo ferimento mecânico (SARAVITZ e SIEDOW, 1995; WANG et al., 2000; VIEIRA et al., 2001), ataque de insetos (HILDEBRAND, et al., 1988; SILVA, 1999) e infecção por patógenos (MELAN et al., 1993). A relevância fisiológica da indução da Via das Lipoxigenases por condições de estresse biótico ou abiótico tem sido estabelecida e várias propostas têm sido sugeridas, incluindo degradação da membrana durante a resposta de hipersensibilidade (CROFT et al., 1990), produção de derivados de ácidos graxos, moléculas antimicrobianas (CROFT et al., 1993) e síntese de substâncias relacionadas ao crescimento de plantas, como o ácido jasmônico, que está envolvido na ativação de genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992). Logo, a Via das Lipoxigenases está relacionada com o aumento da expressão diferencial de genes de defesa da planta ao ataque de insetos, principalmente aqueles que expressam inibidores de proteases.

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae), é uma praga desfolhadora importante no Brasil, pois, mesmo em baixas densidades populacionais, causa danos severos à lavoura da soja; desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. Esse inseto alimenta-se de folhas jovens, mas quando a folhagem é removida pode atacar outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens com conseqüente redução da produção de grãos de soja.

No presente trabalho foi realizada a caracterização bioquímica e cinética das isoenzimas lipoxigenases de plantas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977), submetidas ao ataque da lagarta da soja de quatro genótipos da variedade CAC-1, contrastando para presença de genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases KTI nas sementes. As plantas de soja foram submetidas ao ataque da lagarta da soja

A. gemmatilis, para verificar se elas respondem a esse ataque pela Via das Lipoxigenases e, também, para verificar se plantas que tiveram manipulação genética no grão, para aumentar sua aceitabilidade pela agroindústria, respondem a esse estresse. Como genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas para reduzir sua susceptibilidade, isto será de grande valia em programas de melhoramento genético de soja que visem a criação de cultivares resistentes a insetos praga.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) de quatro genótipos derivados da variedade CAC 1, contrastando para a presença das enzimas lipoxigenases 1, 2 e 3 (LOX) e do inibidor de tripsina Kunitz (KTI). Esses genótipos foram obtidos por uma série de cinco retrocruzamentos com a variedade CAC-1, como progenitor recorrente uma linhagem triplo nula (sem as três lipoxigenases), obtida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, como progenitor doador para ausência das enzimas lipoxigenases; e uma linhagem desenvolvida pela EMBRAPA-Soja, denominada BRM 92 5262, como doador do gene que confere ausência do inibidor de protease. No final do processo de retrocruzamentos, foram obtidos dois genótipos, um com ausência de lipoxigenases e outro com ausência do inibidor de proteases. Esses dois genótipos foram intercruzados e autofecundados para se produzir um novo genótipo com ausência das três enzimas lipoxigenases e do inibidor de protease (KTI). As sementes desses genótipos encontravam-se na geração F₃ quando foram plantadas e receberam as seguintes denominações:

- CAC-1 variedade comercial, com genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases nas sementes.

- CAC-1 KT genótipo com alteração genética nas sementes, apresentando os genes que codificam as lipoxigenases “Triplo – Positivo”, mas sem os genes que codificam os inibidores de proteases.
- CAC-1 TN “Triplo – Nulo”, genótipo com sementes alteradas por manipulação genética de sementes, sem os genes que codificam as lipoxigenases, mas com genes que codificam os inibidores de proteases.
- CAC-1 TN KT “Triplo – Nulo”, genótipo com alteração genética, sem genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases nas sementes.

Foram obtidas três plantas de cada genótipo de soja, em vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, num total de 336 vasos, em condições de casa de vegetação. A avaliação da atividade das lipoxigenases e a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos foram feitas em plantas de soja submetidas a danos por lagarta *A. gemmatilis* no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977). Como fonte da enzima foi utilizada a primeira folha trifoliolar das plantas de cada genótipo. Os três folíolos da primeira folha foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Essas plantas foram também utilizadas para a determinação de inibidores de proteases, aldeídos totais e hexanal.

2.2. Criação de lagarta da soja

As pupas de *A. gemmatilis* foram obtidas no Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA-Soja), Londrina, Paraná, e mantidas no laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV, a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase em placa de Petri. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4.

Após quatro dias as mariposas emergiram, sendo alimentadas com solução nutritiva de mel (10,5g), cerveja (350 mL), sacarose (60g), ácido

ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* foi realizada após três dias na superfície do papel que reveste internamente a gaiola e seus ovos eram de coloração verde-clara e achatados. As folhas de papel que revestiam internamente a gaiola foram retiradas cuidadosamente, cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas em copos plásticos de 500 mL com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas, mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia.

Após dois ou três dias ocorrem a eclosão dos ovos, quando iniciou-se a alimentação das lagartas de *A. gemmatalis* com dieta artificial, segundo a metodologia de HOFFMAN-CAMPO et al. (1985), colocando-se um cubo de dieta artificial. A cada 36 horas a dieta era trocada e as lagartas eram transferidas para um recipiente esterilizado com álcool a 96 °GL, com auxílio de um pincel também, esterilizado com álcool. Em cada recipiente foram colocadas de oito a dez lagartas. As lagartas de terceiro e quarto ínstaes foram colocadas no primeiro trifóliolo da soja, iniciando-se assim o ataque do inseto às plantas.

As lagartas que não foram transferidas para a planta completaram seu desenvolvimento em três semanas, medindo cerca de 35 mm de comprimento e apresentando coloração variada.

2.2.1. Preparo da dieta artificial

Feijão (mulatinho) (125g), levedo de cerveja (62,4g), germe de trigo (100g), proteína de soja (100g), caseína (50g), ágar (35g) e água (2000 mL) foram processados e misturados, nessa ordem, utilizando-se um liquidificador industrial. Em seguida, a mistura foi autoclavada por uma hora à pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$, transferida novamente para o liquidificador e misturada. Adicionou-se, a seguir, ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (5g), formol 40% (6 mL) e solução vitamínica (10 mL); até se obter uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A seguir, esse material foi autoclavado antes de ser adicionado à mistura. A

dieta foi conservada em geladeira após ser resfriada em câmara germicida com luz ultravioleta.

2.2.2. Ataque de lagarta da soja

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas a uma lagarta em cada trifólio. Após 6, 12 e 24 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados para posterior obtenção de extratos foliares, quando as lagartas foram removidas nesses períodos. Os folíolos foram utilizados para a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos de lipoxigenases, e para os produtos da Via das Lipoxigenases, sendo os resultados comparados com aqueles de plantas-controle.

2.3. Obtenção de extratos foliares

O extrato bruto foi preparado a 4 °C, de acordo com o método de OHTA et al. (1986), mas utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5.

Os folíolos de soja foram pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v), e, em seguida, centrifugado a 17.200 xg por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para a determinação de proteínas, pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985), e para as demais análises bioquímicas.

2.4. Determinação da atividade de lipoxigenase

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada de acordo com o método de AXELROD et al. (1981), determinando-se o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo

aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 μL de ácido linoléico e 90 μL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, homogeneizou-se a solução com auxílio de uma pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi feito adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume foi aferido. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos de plástico de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As atividades de lipoxigenases foram avaliadas em uma solução de 1,0 μL do extrato bruto foliar e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por períodos de 2,5 minutos; condições válidas também para o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. As velocidades iniciais, determinadas pela medida de absorção a 234 nm em função do tempo, foram obtidas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $25.000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o produto formado.

2.5. Determinação da atividade de lipoxigenase em vários valores de pH

Os perfis de pH foram determinados com os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 M: 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).

As atividades de lipoxigenases, nos respectivos valores de pH, foram determinadas misturando-se 1,0 μL do extrato bruto foliar e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio a 1,0 mL de tampão 0,05 M de cada faixa de pH descrito anteriormente, com três repetições. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por períodos de 2,5 minutos, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6. Determinação da atividade de lipoxigenase em vários valores de temperatura

O efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação do ácido linoléico catalisada pela ação das lipoxigenases foi determinado a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, utilizando-se banho-maria, para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas, e espectrofotômetro, com sistema de temperatura controlada.

As reações foram realizadas utilizando-se 1,0 mL de tampão fosfato 50 mM, pH ótimo 6,5; 4,0 µL de linoleato de sódio 10 mM como substrato e 1,0 µL de extrato foliar de soja. As absorvâncias das soluções a 234 nm foram utilizadas para as determinações da atividade de lipoxigenases.

2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de plantas submetidas ao ataque da lagarta da soja

Os parâmetros cinéticos de lipoxigenases foram determinados utilizando-se 1,0 µL de extrato bruto foliar, 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH ótimo 6,5 e linoleato de sódio como substrato, nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $4,0 \times 10^{-5}$; $8,0 \times 10^{-5}$; $16,0 \times 10^{-5}$; $32,0 \times 10^{-5}$; e $64,0 \times 10^{-5}$ M.

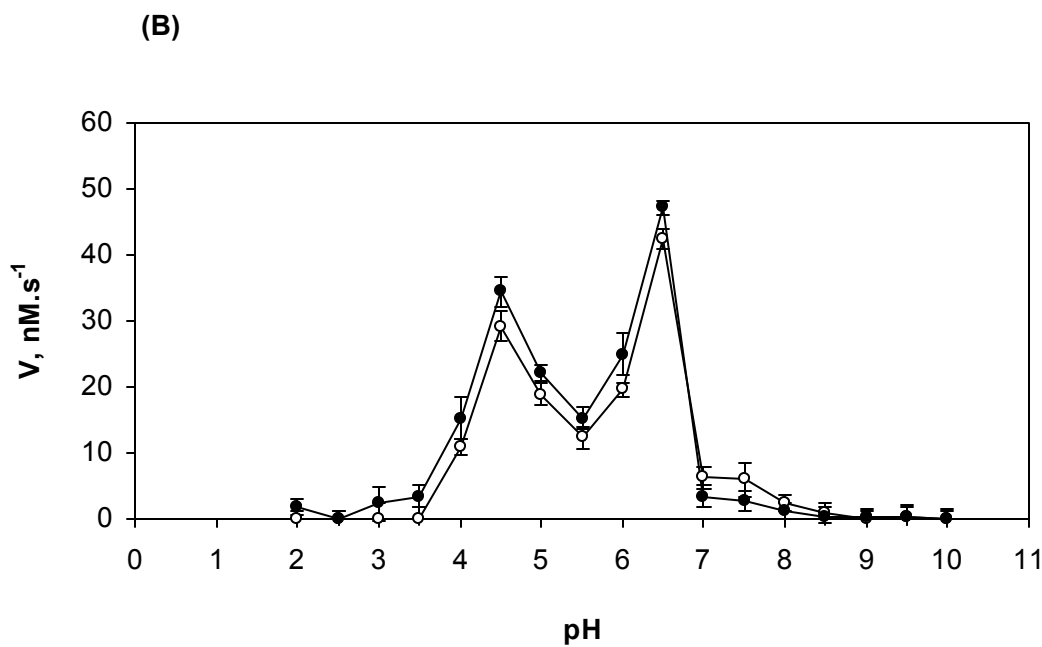
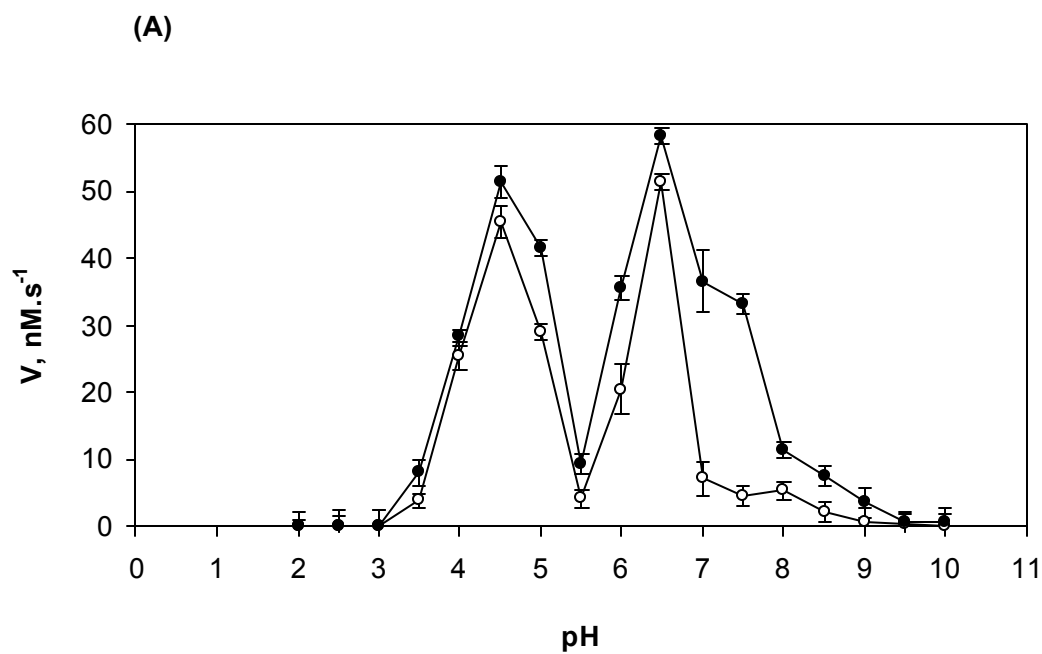
Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por regressão não-linear utilizando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja

Os dois picos mais acentuados de atividade a pH 4,5 e 6,5 nos tratamentos e respectivos controles, indicam diferentes formas de isoenzimas lipoxigenases extrato foliar (Figura 1). Os valores de atividade foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, em todos os genótipos.

Isto sugere que as plantas de soja, submetidas ao ataque da lagarta da soja, responderam a esse tipo de estresse pelo aumento da atividade de lipoxigenases estando esses resultados de acordo com SARAVITZ e SIEDOW (1995) que mostraram haver duas formas de isoenzimas lipoxigenases em folhas de soja, uma com faixa de ponto isoelétrico neutro e outro ácido. Os perfis de atividade de lipoxigenases em diferentes valores de pH encontrados são semelhantes aos de outros autores, em plantas de soja (KATO et al., 1993; LANNA et al., 1996; SARAVITZ e SIEDOW, 1996; FORNAROLI et al., 1999; SILVA, 1999; DUBBS e GRIMES 2000; VIEIRA et al. 2001).



(o—o) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas controle.
 (●—●) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas.

Figura 1 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja no estágio V3 de desenvolvimento. Variedades CAC-1 (A) e CAC-1 TN

(B), 24 horas após a retirada da lagarta da soja, e seus respectivos controles.

3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja

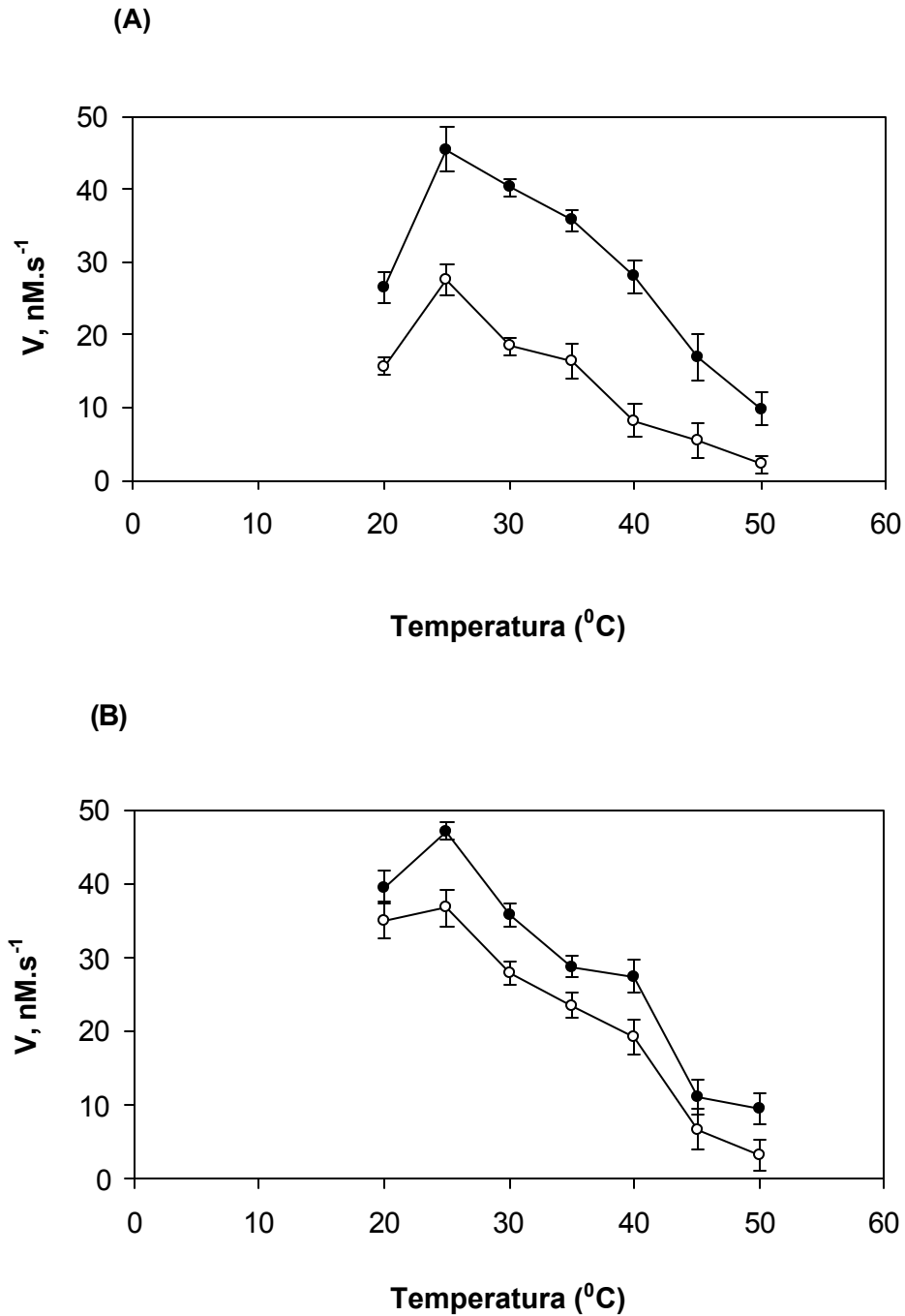
Como o pico mais acentuado de atividade de lipoxigenases foi a pH 6,5, o perfil de temperatura versus atividade enzimática foi realizado utilizando-se este valor de pH. O valor mais acentuado de atividade ocorreu a 25 °C para todos os genótipos e seus respectivos controles (Figura 2). Os valores de atividade de lipoxigenases foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, nos quatro genótipos, em diferentes temperaturas; o que está de acordo com SILVA (1999), que mostrou aumento da atividade de lipoxigenases a 25 °C em plantas de soja sob o ataque da mosca branca, *Bemisia argentifolii*, e da lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Esses resultados sugerem resposta de plantas de soja ao ataque da lagarta (*A. gemmatalis*) por meio da Via das Lipoxigenases.

Os resultados obtidos são semelhantes aos de LANNA et al. (1996) para lipoxigenases foliares de soja no estágio V4 de desenvolvimento, dos cultivares IAC-100 e Cristalina e da linhagem UFV-TN. Estes resultados também estão de acordo com VIEIRA et al. (2001) para lipoxigenases foliares de plantas de soja da variedade IAC-100 e IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas a ferimento mecânico. E esses autores verificaram pico de atividade a 25 °C.

Os perfis de pH e temperatura (Figuras 1 e 2) apresentam mais de um pico de atividade em diferentes valores, respectivamente, o que mostra que existem diferentes formas da isoenzima nas folhas de soja e que estas podem responder ao ataque de lagarta pela Via das Lipoxigenases. Estes perfis mostram, ainda, que a eliminação genética de lipoxigenases ou de KTI das sementes não afetou a resposta da planta ao ataque da lagarta de soja, pois os perfis de atividade de CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1 TN KT, são semelhantes.

A presença de mais de um pico de atividade pode estar relacionada ao fato de que, na planta, estas enzimas encontram-se organizadas em uma grande família multigênica que pode resultar, em um dado tecido, na presença de

um complexo de isoenzimas lipoxigenases que diferem quanto à especificidade pelo substrato e aos parâmetros bioquímicos e cinético-enzimáticos.



(o—o) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas controle.

(●—●) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas.

Figura 2 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico, catalisada pelas lipoxigenases

de folhas de soja no estágio V3 de desenvolvimento. Variedades CAC-1 KT (A); CAC-1 TN (B), 24 horas após a retirada da lagarta da soja, e seus respectivos controles. Estima-se que o genoma de soja contém de 10 a 12 genes para lipoxigenases (KOETJE e GRIMES, 1992). Além disso, tem sido relatado que o nível de atividade de lipoxigenases presentes em um dado tecido pode variar como resposta fisiológica da planta a diferentes tipos de estresses.

3.3. Parâmetros cinéticos K_{Mapp} e $V_{máxapp}$

Os gráficos de Michaelis-Menten de atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico dos genótipos CAC-1 (A) e CAC 1 TN (B), coletados 24 horas após a retirada do inseto, encontram-se representados na Figura 3.

Nos Quadros 1 e 2 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases de soja determinados a 25 °C, pH 6,5, para os genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1 TN KT. Os valores de K_{Mapp} determinados no *pool* de lipoxigenases de folhas em 6, 12 e 24 horas, em presença do inseto, apresentaram-se menores do que os respectivos controles, para todos os genótipos. Além disso, os valores de K_{Mapp} decresceram, para os quatro genótipos, com o tempo de ataque da planta pela lagarta, ou seja, decresceram de 6 até 24 horas em presença do inseto.

Os valores de K_{Mapp} do *pool* de lipoxigenases dos quatro genótipos continuaram a diminuir até 48 horas após a remoção do inseto. Isto evidencia que tais plantas continuaram respondendo ao ataque da lagarta da soja, pela Via das Lipoxigenases, até 48 horas após essa remoção.

A diminuição dos valores de K_{Mapp} , para os quatro genótipos, reflete uma alteração do *pool* de lipoxigenases em resposta ao ataque de lagarta da soja. Além disso, observou-se que os valores de K_{Mapp} dos tratamentos são menores do que os respectivos controles. Estes dados refletem uma maior eficiência catalítica do *pool* de lipoxigenases das plantas tratadas, o que mais uma vez evidencia a resposta da planta ao ataque do inseto.

KATO et al. (1993) mostraram que a expressão do gene de soja para LOX-4 aumenta em folha após a remoção da vagem.

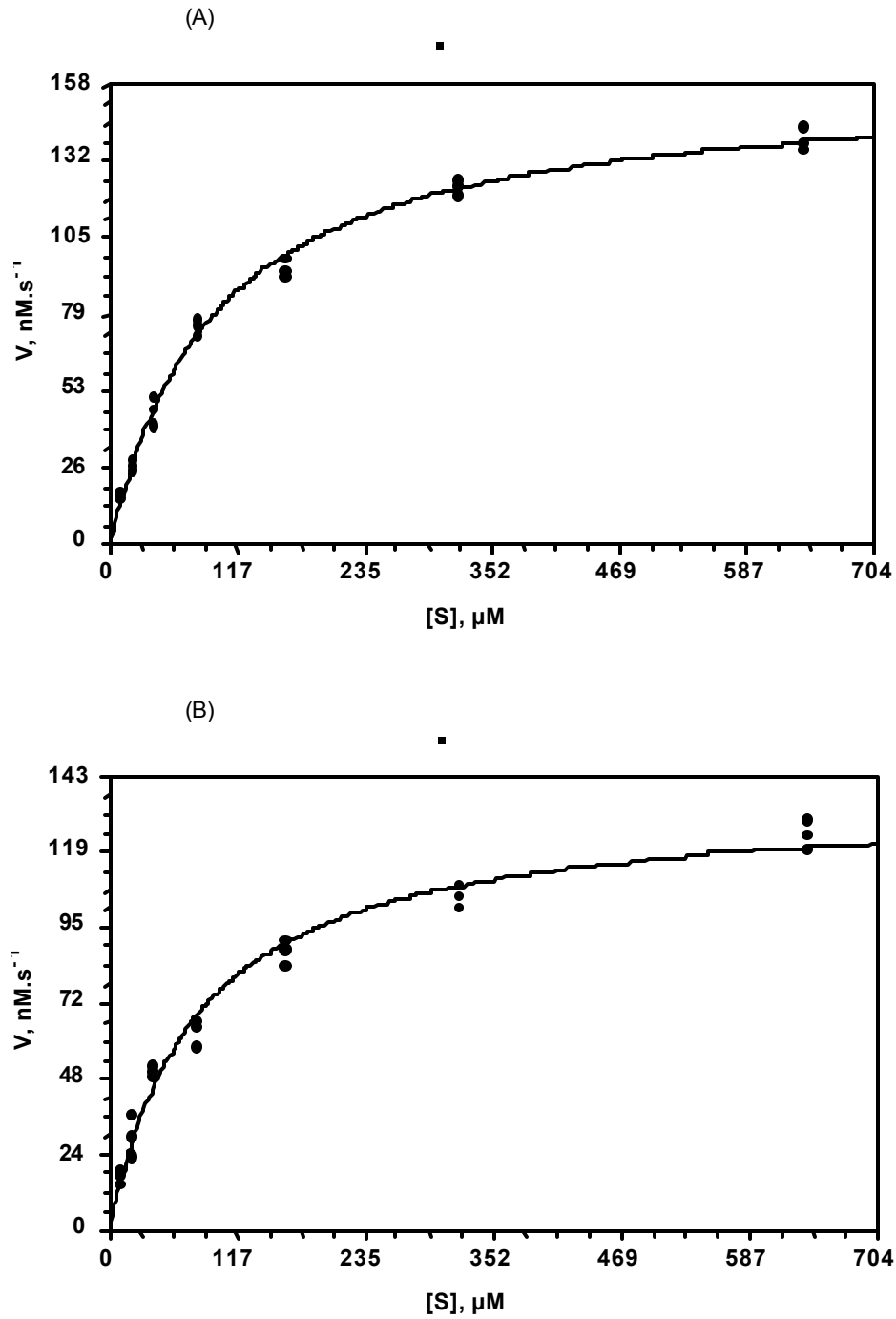


Figura 3 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisado pelas lipoxigenases de folhas de soja de plantas do genótipo CAC-1 (A) e do genótipo CAC 1 TN (B), 24 horas após a retirada do inseto. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_{Mapp} e $V_{máxapp}$. Os pontos são experimentais

Quadro 1 - Parâmetro cinético da ação de lipoxigenases de soja sobre ácido linoléico, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, de plantas submetidas ao ataque de lagarta de soja

Tempo (horas)	CAC-1				CAC-1 KT			
	Controle		Tratamento		Controle		Tratamento	
	K_{Mapp} (μ M)	$V_{máxapp}$ (nM/s)	K_{Mapp} (μ M)	$V_{máxapp}$ (nM/s)	K_{Mapp} (μ M)	$V_{máxapp}$ (nM/s)	K_{Mapp} (μ M)	$V_{máxapp}$ (nM/s)
Em presença do inseto								
6 horas	239,29	58,26	186,92	194,05	253,24	92,25	164,66	68,42
2 horas	230,03	61,95	168,95	89,31	175,74	71,10	140,38	100,51
24 horas	169,48	36,92	114,01	49,07	150,91	108,60	106,64	107,08
Após a retirada do inseto								
6 horas	167,20	51,23	113,60	153,33	148,96	67,98	101,85	153,10
12 horas	160,86	42,63	101,95	97,43	129,65	157,59	101,12	96,98

24 horas	131,60	92,84	96,28	159,17	125,36	77,73	70,45	82,85
48 horas	122,54	178,01	94,18	116,27	115,59	64,77	69,49	141,67

Quadro 2 - Parâmetro cinético da ação de lipoxigenases de soja sobre ácido linoléico, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, de plantas submetidas ao ataque de lagarta da soja

Tempo (horas)	CAC-1 TN				CAC-1 TN KT			
	Controle		Tratamento		Controle		Tratamento	
	$K_{M \text{ app}} (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} (\text{nM/s})$	$K_{M \text{ app}} (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} (\text{nM/s})$	$K_{M \text{ app}} (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} (\text{nM/s})$	$K_{M \text{ app}} (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} (\text{nM/s})$
Em presença do inseto								
6 horas	241,80	87,14	173,13	76,89	227,51	62,08	225,63	63,01
12 horas	152,27	138,84	139,53	66,41	203,64	89,33	196,29	83,34
24 horas	167,29	144,57	114,48	66,25	192,10	62,30	187,29	129,11
Após a retirada do inseto								
6 horas	145,31	107,02	93,78	206,37	181,90	98,52	137,39	268,48
12 horas	118,88	123,78	95,44	118,44	129,46	164,84	128,79	157,45

24 horas	105,24	111,08	80,59	136,04	136,39	106,81	114,69	170,64
48 horas	101,33	85,29	67,07	124,21	125,36	144,72	113,61	123,77

BUNKER et al. (1995) observaram a indução da expressão de dois genes adicionais de lipoxigenases, *lox A* e *lox C*, em folhas de soja após a remoção da vagem. Em folhas de soja que sofreram injúria, houve aumento da expressão de LOX-7 e LOX-8 após ferimento (SARAVITZ e SIEDOW, 1996).

CARVALHO et al. (1997) mostraram que a eliminação genética de isoenzimas lipoxigenases da semente levou à redução da porcentagem de inibição de tripsina e quimotripsina, o que sugere que as lipoxigenases estejam envolvidas no mecanismo bioquímico de síntese de inibidores de proteases em semente de soja. O mesmo ocorreu para outras espécies vegetais, pois HILDEBRAND et al. (1988) sugeriram mecanismos semelhantes de síntese de inibidores de proteases em folhas de tomate, tabaco e alfafa.

No entanto, a diferença pouco pronunciada nos valores de $K_{M\ app}$, entre os quatro genótipos, sugere que a eliminação genética de lipoxigenases de sementes não alterou o mecanismo de resposta da planta ao ataque de lagarta da soja, pela da Via das Lipoxigenases. Assim, a expressão de lipoxigenases de folhas é independente de sua expressão em sementes.

A expressão de diferentes genes de lipoxigenases é induzida em folhas de soja em resposta a diferentes estresses. Assim, como a lagarta da soja é um inseto mastigador, este, ao alimentar-se da folha, pode estar produzindo uma resposta da planta a este estresse pela indução de diferentes genes de lipoxigenases. A expressão de diferentes formas da enzima poderia alterar o *pool* de lipoxigenases, o que refletiria na diminuição dos valores de $K_{M\ app}$. Como K_M é uma constante cinética que estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, e sendo improvável que esse nível seja expressivamente maior ou menor que o valor de K_M o decréscimo nos valores de $K_{M\ app}$, nas plantas atacadas pela lagarta, sugere uma melhor adaptação do substrato ao centro ativo da enzima, uma forma de melhorar a eficiência catalítica das lipoxigenases de folhas de soja, e, portanto, uma resposta da planta ao ataque da lagarta.

A planta de soja, em resposta ao estresse provocado pela lagarta de soja, estaria produzindo formas diferentes de lipoxigenases mais eficientes na catálise. Isso resultaria numa ativação da Via das Lipoxigenases com conseqüente produção daqueles produtos desta via bioquímica, que estariam envolvidos na resposta da planta ao ataque de lagarta, tais como inibidores de

proteases que inibem as proteases intestinais das lagartas levando à morte do inseto. Assim, a ativação da Via das Lipoxigenases possivelmente seja um mecanismo de defesa da planta de soja ao ataque de *A. gemmatilis*.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DA VIA DAS LIPOXIGENASES DE PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS À LAGARTA DA SOJA

1. INTRODUÇÃO

São várias as atividades econômicas que constituem o complexo agroalimentar, destacando-se entre elas a cadeia agroindustrial da soja. Acredita-se que o interesse mundial pelo cultivo da soja deva-se à excelente combinação que ela apresenta em termos de produtividade e porcentagens de óleo e proteínas, em média 20 a 40% do peso da semente, respectivamente (EMBRAPA, 2000). No entanto, a proteína da soja tem pouca aceitação em países ocidentais. Essa barreira alimentar está associada, basicamente, à presença de fatores antinutricionais no grão. Tal barreira é representada pelo sabor característico dos produtos derivados da soja, denominado *beany flavor*, e pelos inibidores de proteases que constituem um dos principais fatores antinutricionais da soja (RACKIS et al., 1979).

O *beany flavor* origina-se da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração protéica. Esses compostos orgânicos são produtos finais de uma série de reações que se iniciam com a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados, catalisada por lipoxigenases presentes no grão de soja. Dentre esses compostos, o hexanal é apontado como um dos

principais causadores dos sabores indesejáveis. Assim, lipoxigenases têm sido eliminadas geneticamente dos grãos de soja para eliminação do *beany flavor*.

Os inibidores de proteases, que representam 6% das proteínas presentes nos grãos de soja, são representados pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk (BBI). Entretanto, cerca de 80% da inibição da atividade triptica é causada pela ação do KTI em sementes de soja.

Os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra infestação por insetos e patógenos. No entanto, o papel fisiológico das lipoxigenases não está ainda bem definido em plantas, mas sua expressão aumenta em folhas quando há ocorrência de ferimentos, tendo sido também sugerido seu envolvimento no mecanismo de resistência a insetos e patógenos.

Dois principais caminhos para o metabolismo dos hidroperóxidos produzidos pela Via das Lipoxigenases têm sido propostos em plantas: um em que atua a hidroperóxido liase e outro a hidroperóxido ciclase. A hidroperóxido liase produz aldeídos, que têm sido propostos como inibidores do crescimento de insetos e patógenos (CROFT et al., 1993), podendo ainda estar agindo como um sinal químico na atração do inimigo natural do herbívoro para a planta danificada (PARÉ e TUMLISON, 1997). Já a hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico que dará origem ao ácido jasmônico, o qual está envolvido na regulação de processos de desenvolvimento assim como na resposta da planta ao ataque por insetos e patógenos, ou seja, na indução da expressão de genes que expressam inibidores de proteases (CROFT et al., 1993; GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992). Logo, a Via das Lipoxigenases está relacionada com o aumento da expressão diferencial de genes de defesa da planta ao ataque de insetos, principalmente aqueles que expressam inibidores de proteases.

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora bastante problemática em culturas brasileiras. Mesmo em baixas densidades populacionais, este inseto causa grandes danos à lavoura da soja, que vai desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. É um inseto mastigador que se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ele ataca outras partes da

planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens com conseqüente redução da produção de grãos (EMBRAPA, 2000).

Foi realizada a caracterização bioquímica de lipoxigenases assim como a determinação de compostos produzidos pela Via das Lipoxigenases em plantas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977), submetidas ao ataque da lagarta da soja de quatro genótipos da variedade CAC-1, contrastando para ausência e presença de genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases KTI nas sementes. As plantas de soja foram submetidas ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*) para verificar se elas respondem ao ataque de insetos pela Via das Lipoxigenases e, também, para verificar se as plantas que sofreram manipulação genética no grão, para aumentar sua aceitabilidade pela agroindústria, respondem a este estresse. Genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua susceptibilidade. Assim, o conhecimento da Via das Lipoxigenases sob o ponto de vista da relação estrutura / função será de grande valia nos programas de melhoramento genético de soja que visem a criação de cultivares resistentes a insetos praga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) de quatro genótipos derivados da variedade CAC 1, contrastando para a presença das enzimas lipoxigenases 1, 2 e 3 (LOX) e do inibidor de tripsina Kunitz (KTI). Esses genótipos foram obtidos por uma série de cinco retrocruzamentos com a variedade CAC-1, como progenitor recorrente; uma linhagem triplo nula (sem as três lipoxigenases), obtida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, como progenitor doador para ausência das enzimas lipoxigenases; e uma linhagem desenvolvida pela EMBRAPA-Soja, denominada BRM 92 5262, como doador do gene que confere ausência do inibidor de protease. No final do processo de retrocruzamentos, foram obtidos dois genótipos: um com ausência de lipoxigenases e outro com ausência do inibidor de proteases. Esses dois genótipos foram intercruzados e autofecundados para se produzir um novo genótipo com ausência das três enzimas lipoxigenases e do inibidor de protease (KTI). As sementes desses genótipos encontravam-se na geração F₃ quando foram plantadas e receberam as seguintes denominações:

- CAC-1 variedade comercial, com genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases nas sementes.

- CAC-1 KT genótipo com alteração genética nas sementes, apresentando os genes que codificam as lipoxigenases “Triplo – Positivo”, mas sem os genes que codificam os inibidores de proteases.
- CAC-1 TN “Triplo – Nulo”, genótipo com sementes alteradas por manipulação genética de sementes, sem os genes que codificam as lipoxigenases, mas com genes que codificam os inibidores de proteases.
- CAC-1 TN KT “Triplo – Nulo”, genótipo com alteração genética, sem genes que codificam as lipoxigenases e os inibidores de proteases nas sementes.

Foram obtidas três plantas de cada genótipo de soja, em vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, num total de 336 vasos, em condições de casa de vegetação. A avaliação da atividade das lipoxigenases e a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos foram feitos em plantas de soja submetidas a danos por lagarta *A. gemmatilis* no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977). Como fonte da enzima, foi utilizada a primeira folha trifoliolar das plantas de cada genótipo. Os três folíolos da primeira folha foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Estas plantas foram também utilizadas para a determinação de inibidores de proteases, aldeídos totais e hexanal.

2.2. Criação de lagarta da soja

As pupas de *A. gemmatilis* foram obtidas no Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA-Soja), Londrina, Paraná, e mantidas no laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV, a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase em placa de Petri. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4.

Após quatro dias as mariposas emergiram, sendo alimentadas com solução nutritiva de mel (10,5g), cerveja (350 mL), sacarose (60g), ácido

ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* foi realizada após três dias na superfície do papel que reveste internamente a gaiola e seus ovos eram de coloração verde-clara e achatados. As folhas de papel que revestiam internamente a gaiola foram retiradas cuidadosamente, cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas em copos plásticos de 500 mL com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram transferidos para uma câmara climatizada à 25 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas, mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia.

Após dois ou três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando iniciou-se a alimentação das lagartas de *A. gemmatalis* com dieta artificial, segundo a metodologia de HOFFMAN-CAMPO et al. (1985), colocando-se um cubo de dieta artificial. A cada 36 horas a dieta era trocada e as lagartas eram transferidas para um recipiente esterilizado com álcool a 96 °GL, com auxílio de um pincel também esterilizado com álcool. Em cada recipiente foram colocadas de oito a dez lagartas. As lagartas de terceiro e quarto ínstaes foram colocadas no primeiro trifolíolo da soja, iniciando-se assim o ataque do inseto às plantas.

As lagartas que não foram transferidas para a planta completaram seu desenvolvimento em três semanas, medindo cerca de 35 mm de comprimento e apresentando coloração variada.

2.2.1. Preparo da dieta artificial

Feijão (mulatinho) (125g), levedo de cerveja (62,4g), germe de trigo (100g), proteína de soja (100g), caseína (50g), ágar (35g) e água (2000 mL) foram processados e misturados, nesta ordem, utilizando-se um liquidificador industrial. Em seguida, a mistura foi autoclavada por uma hora à pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$, transferida novamente para o liquidificador e misturada. Adicionou-se, a seguir, ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (5g), formol 40% (6 mL) e solução vitamínica (10 mL); até se obter uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A seguir, esse material foi autoclavado antes de ser adicionado à mistura. A

dieta foi conservada em geladeira após ser resfriada em câmara germicida com luz ultravioleta.

2.2.2. Ataque de lagarta da soja

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas a uma lagarta em cada trifólio. Após 6, 12 e 24 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados para posterior obtenção de extratos foliares, quando as lagartas foram removidas nesses períodos. Os folíolos foram utilizados para a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos de lipoxigenases, e para os produtos da Via das Lipoxigenases, sendo os resultados comparados com aqueles de plantas-controle.

2.3. Obtenção de extratos foliares.

O extrato bruto foi preparado a 4 °C, de acordo com o método de OHTA et al. (1986), mas utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5.

Os folíolos de soja foram pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v), e, em seguida, centrifugado a 17.200 xg por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para a determinação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985), e para as demais análises bioquímicas.

2.4. Determinação da atividade de lipoxigenase

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada de acordo com o método de AXELROD et al. (1981), determinando-se o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo

aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 μL de ácido linoléico e 90 μL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, homogeneizou-se a solução com auxílio de uma pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi feito adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL envolvido por papel-alumínio, e o volume foi aferido. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos de plástico de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As atividades de lipoxigenases foram avaliadas em uma solução de 1,0 μL do extrato bruto foliar e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por períodos de 2,5 minutos; condições válidas também para o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. As velocidades iniciais, determinadas pela medida de absorção a 234 nm em função do tempo, foram obtidas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $25.000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o produto formado.

2.5. Determinação da concentração de proteínas

As determinações das concentrações de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinonínico (SMITH et al., 1985), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão, na concentração de 2,0 mg/mL em água deionizada.

Nas determinações de concentrações de proteínas, foi utilizado o *kit* SIGMA como reagente de trabalho, que se constituiu de uma solução de ácido bicinonínico e uma solução de sulfato de cobre (II) – pentaidratado 4% (p/v).

Para as determinações em triplicatas, a 50 μL da amostra adicionou-se 1,0 mL do reagente de trabalho - 100:2 solução de ácido bicinonínico: solução de sulfato de cobre (II). A solução foi agitada e colocada em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente por 20 minutos e a absorvância foi determinada a 562 nm.

2.6. Determinação da atividade específica de lipoxigenase em vários valores de pH

Os perfis de pH foram determinados com os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 M: 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).

As atividades de lipoxigenases, nos respectivos valores de pH, foram determinadas misturando-se 1,0 μ L do extrato bruto foliar e 4,0 μ L da solução-estoque de linoleato de sódio a 1,0 mL de tampão 0,05 M de cada faixa de pH descrito anteriormente, com três repetições. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por períodos de 2,5 minutos, a 25 °C.

2.7. Determinação da atividade específica de lipoxigenase em vários valores de temperatura

O efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação do ácido linoléico catalisada pela ação das lipoxigenases 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 sistema de temperatura controlada, para que elas se mantivessem nos mesmos valores de temperaturas.

As reações foram realizadas utilizando-se 1,0 mL de tampão fosfato 50 mM pH ótimo 6,5; 4,0 μ L de linoleato de sódio 10 mM como substrato; e 1,0 μ L de extrato foliar de soja. As absorvâncias das soluções a 234 nm foram utilizadas para as determinações da atividade de lipoxigenases.

2.8. Determinação de inibidores de proteases

Para a obtenção do extrato, folhas de soja foram pesadas e maceradas com auxílio de almofariz e pistilo, em nitrogênio líquido. O pó obtido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl_2 , na proporção 1:3 (p/v). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4 °C, a 17.200 xg. A presença de inibidores de proteases foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade trípica, na presença ou na ausência de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico para a análise do teste: 100 μL do extrato; 500 μL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50 μL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M foram adicionados em um tubo de ensaio. Para o controle da enzima foram adicionados, num outro tubo de ensaio, 600 μL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 μL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M. Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 500 μL dessa mistura de incubação, do teste e do respectivo controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500 μL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500 μL da solução de D,L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas.

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

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}$$

em que

A = absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 nm da amostra;

B = diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 μg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNA dá uma leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (KAKADE et al., 1974).

2.9. Determinação de hexanal

A determinação de hexanal foi realizada por cromatografia gasosa, pelo método do *head-space*, segundo ZHUANG et al. (1992), em frascos tipo penicilina hermeticamente fechados e aquecidos a 40 °C por 20 minutos. Um volume de 0,8 mL dos gases liberados do material foliar foi injetado automaticamente, com razão de *split* 1:3. Foi utilizado um cromatógrafo a gás SHIMADZU, modelo GC-14 B, equipado com detector de ionização de chama *head-space sampler*, modelo HSS-2B, e integrador C-R7A. As análises foram feitas em três repetições, sob as seguintes condições: temperatura inicial de coluna de 45 °C, programada para elevar 7 °C a cada minuto até 70 °C, temperatura esta mantida por cinco minutos, elevando-se posteriormente 15 °C por minuto, até 200 °C; temperatura do injetor de 200 °C; e temperatura do detector de 250 °C. Utilizou-se coluna carbowax (25 m x 0,53 mm), e o gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo de 5,9 mL/min. A identificação de hexanal foi realizada por injeção prévia de um padrão e os resultados foram expressos em área do pico, em milivolts/min.

2.10. Determinação de aldeídos totais

Na determinação de aldeídos totais nos extratos foliares foi usado o método colorimétrico desenvolvido por SANTOS et al. (1993), utilizando-se 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente de cor. De cada trifólio foram selecionadas aleatoriamente duas folhas sendo que de cada uma foi retirado um disco de 3 cm de diâmetro. A esses discos foram adicionados 3 mL de etanol 2%.

Após ser mantido por duas horas à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 31.000 x *g* por 15 minutos, a 15 °C. Para a reação do teste, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, na qual foram adicionados 0,5 mL de solução de MBTH 0,1% e 1,25 mL de FeCl₃ 0,23%. Exatamente seis minutos após a adição de FeCl₃, adicionaram-se 3 mL de acetona. Para a reação controle, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, à qual foram adicionados 3 mL de acetona, impedindo assim que a reação ocorresse,

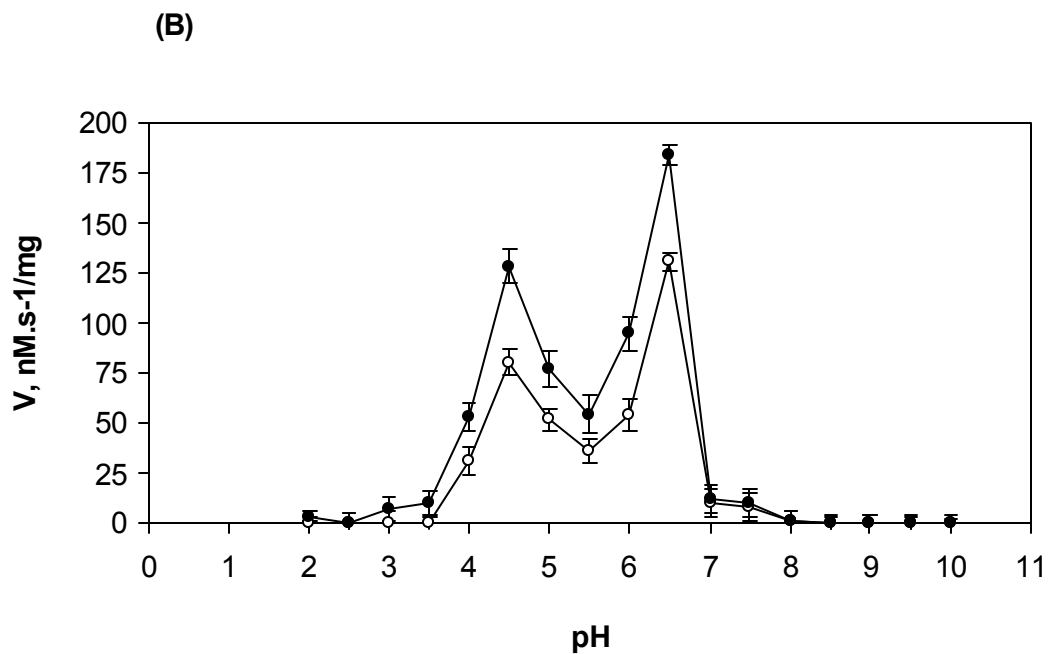
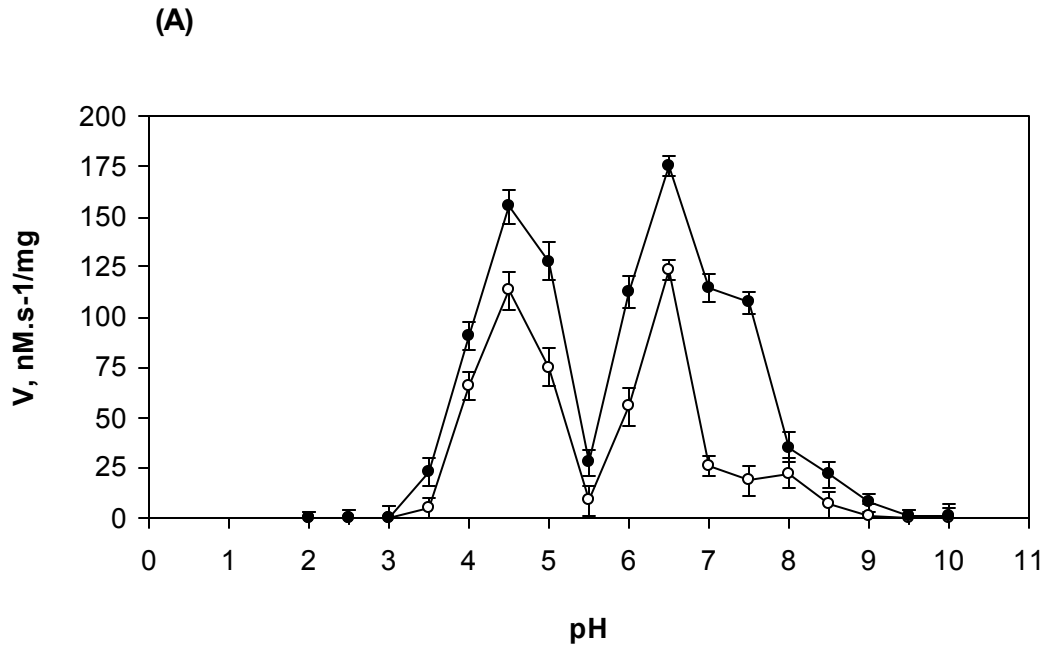
e, a seguir, 0,5 mL de MBTH 0,1% e 1,25 mL de FeCl_3 0,23%. As leituras da absorvância foram realizadas a 635 nm, sendo os resultados expressos como a diferença da absorvância observada no final da reação e na reação controle. As análises foram feitas em três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1. Efeito do pH sobre a atividade específica do *pool* de lipoxigenases de folhas em plantas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner)

Pode-se observar dois picos mais acentuados de atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,5, nos tratamentos e em seus respectivos controles (Figura 1). A presença de mais de um pico de atividade indica diferentes formas de lipoxigenases presentes no extrato foliar. Esses resultados são semelhantes aos observados por SARAVITZ e SIEDOW (1995), quando mostraram a presença de duas isoformas de lipoxigenases foliares de soja, uma apresentando ponto isoelétrico neutro e a outra ácido.

Os perfis de atividade específica de lipoxigenases em diferentes valores de pH, determinados neste experimento, também estão em concordância com os resultados obtidos por outros autores em plantas de soja (KATO et al., 1993; LANNA et al., 1996; SARAVITZ e SIEDOW, 1996; FORNAROLI et al., 1999., SILVA, 1999; DUBBS e GRIMES 2000; VIEIRA et al., 2001).



(o—o) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas controle.

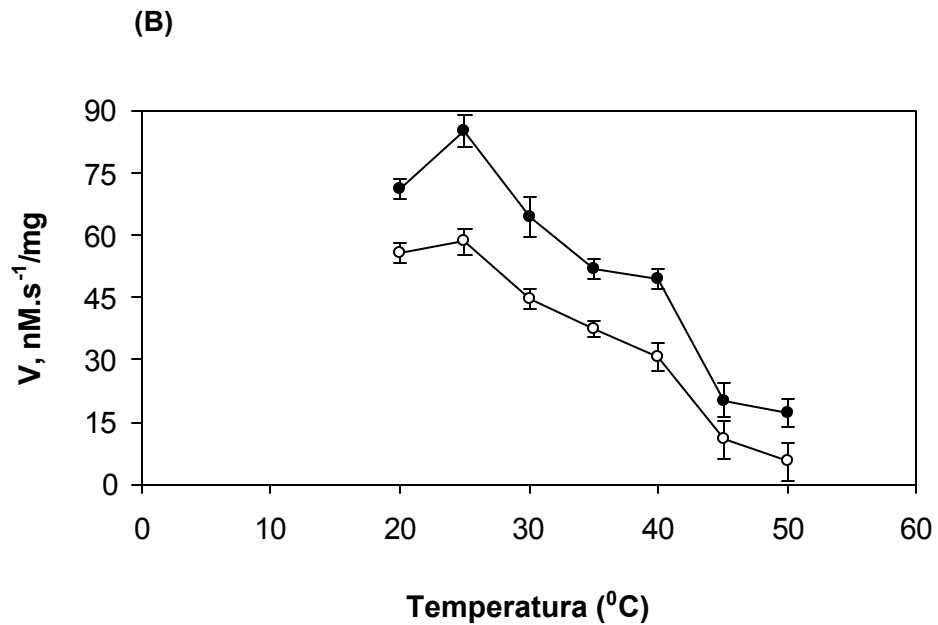
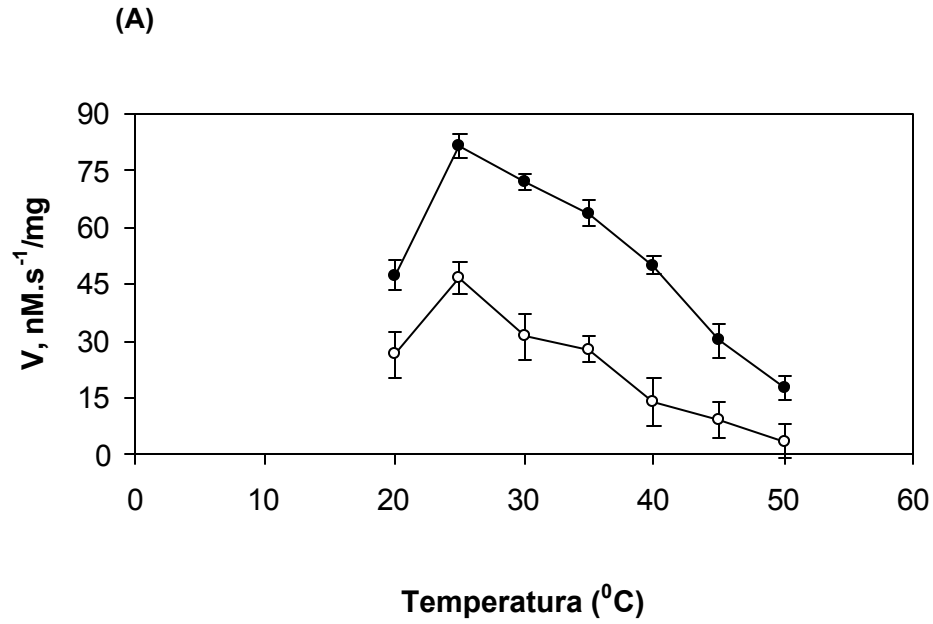
(●—●) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas.

Figura 1 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja no estágio V3 de desenvolvimento, variedades CAC-1 (A) e CAC-1 TN (B), coletadas 24 horas após retirada da lagarta da soja, e seus respectivos controles.

3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade específica do *pool* de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

Como o pico mais acentuado de atividade específica de lipoxigenases foi a pH 6,5, o perfil de temperatura versus atividade enzimática foi realizado utilizando-se este valor de pH. O valor mais acentuado de atividade específica foi a 25 °C, para os genótipos e seus respectivos controles (Figura 2). 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 no extrato foliar. Novamente, observou-se que os valores de atividade específica de lipoxigenases foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, nos quatro genótipos, em diferentes valores de temperatura. Esses resultados, sugerem uma resposta da planta de soja ao tratamento pelo aumento da atividade de lipoxigenases, como já verificado nas análises de efeito do pH. Estes dados estão de acordo com SILVA (1999), quando verificou aumento da atividade específica de lipoxigenases a 25 °C, em plantas de soja submetidas ao ataque da mosca branca *Bemisia argentifolii*, e da lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Os resultados sugerem ter havido uma resposta das plantas de soja ao ataque da lagarta (*A. gemmatalis*) por meio da Via das Lipoxigenases.

Os parâmetros cinéticos observados estão de acordo com os citados na literatura, visto que outros autores obtiveram valores de temperatura ótima a 25 °C para lipoxigenases foliares de soja: LANNA et al. (1996), trabalhando com plantas dos cultivares IAC-100 e Cristalina e da linhagem UFV-TN, e VIEIRA et al. (2001), analisando plantas da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, submetidas a ferimento mecânico. Esses autores verificaram pico de atividade a 25 °C.



(o—o) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas controle.
 (●—●) Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas tratadas.

Figura 2 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja no estágio V3 de desenvolvimento, variedades CAC-1 (A); CAC-1 TN (B), coletadas 24 horas após retirada da lagarta da soja, e seus respectivos controles.

Os perfis de pH e temperatura (Figuras 1 e 2) apresentam mais de um pico de atividade específica em diferentes valores, respectivamente. Estes resultados mostram que existem diferentes formas da isoenzima presentes nas folhas que podem estar respondendo ao ataque de lagarta pela Via das Lipoxigenases. Eles mostram ainda, que a eliminação genética de lipoxigenases ou de KTI das sementes não afetou a resposta da planta ao ataque de lagarta, pois os perfis de atividade de CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1 TN KT, são semelhantes e coincidentes.

A existência de mais de um pico de atividade pode estar relacionada ao fato de que, na planta, estas enzimas encontram-se organizadas em uma grande família multigênica que pode resultar em um dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas lipoxigenases que diferem quanto à especificidade pelo substrato, aos parâmetros bioquímicos e cinético-enzimáticos. Estima-se que o genoma de soja contém de 10 a 12 genes que expressam lipoxigenases (KOETJE e GRIMES, 1992). Além disso, tem sido relatado que o nível de atividade de lipoxigenases presentes em um dado tecido pode variar como resposta fisiológica da planta a diferentes tipos de estresses.

KATO et al. (1993) mostraram que a expressão do gene de soja para LOX-4 aumenta em folha em resposta à remoção dos primórdios florais. BUNKER et al. (1995) observaram a indução da expressão de dois genes adicionais de lipoxigenases, *loxA* e *loxC*, em folhas de soja após a remoção da vagem. Em folhas de soja que sofreram injúria mecânica, simulando ferimento causado por inseto, houve aumento da expressão de LOX-7 e LOX-8 (SARAVITZ e SIEDOW, 1996).

3.3. Determinação da atividade específica do *pool* de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner)

Nas Figuras 3 e 4 são apresentados os dados obtidos nas determinações de atividades específicas de lipoxigenases de plantas de soja, utilizando-se o ácido linoléico como substrato dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1TN KT, com os respectivos controles a 6, 12 e 24 horas na

presença do inseto e 6, 12, 24 e 48 horas após a retirada do inseto. Os valores de atividade específica, para os quatro genótipos, foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles em todos os tempos analisados. Além disso, observou-se que os valores de atividade específica tiveram aumento no período de 6 a 24 horas na presença do inseto e um aumento mais acentuado de atividade específica 24 e 48 horas após a retirada do inseto .

O genótipo CAC-1 TN teve aumento crescente de atividade no período de 6 a 24 horas na presença do inseto e de 6 a 48 horas após a retirada do inseto. O genótipo CAC-1 TN demonstra, ainda, valores de atividade específica nos tempos 24 e 48 horas após a retirada do inseto mais acentuados que os de plantas dos demais genótipos, sugerindo uma diferença no *pool* de lipoxigenases em relação aos demais genótipos.

Os valores de atividade específica sugerem que as plantas de soja respondem ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*) pelo aumento da atividade de lipoxigenases e que embora possa existir diferença no *pool* dessas isoenzimas, entre os genótipos, o comportamento cinético das mesmas é semelhante, evidenciando assim, que a remoção genética das isoenzimas lipoxigenases da semente não afetou a resposta das plantas ao ataque da lagarta da soja.

Provavelmente, o aumento da atividade específica de lipoxigenases tenha ocorrido na planta como uma resposta ao ataque da lagarta, acelerando a Via das Lipoxigenases para aumentar os níveis dos produtos dessa via, tais como: ácido jasmônico, aldeídos e inibidores de proteases, todos envolvidos no sistema de resposta da planta a vários tipos de estresses.

3.4. Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

É postulado que inibidores de proteases têm efeito em proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo a atividade de enzimas proteolíticas presentes no intestino desses herbívoros (HILDER et al. 1987; RYAN, 1990). Além disso, os inibidores mais abundantes nas plantas e

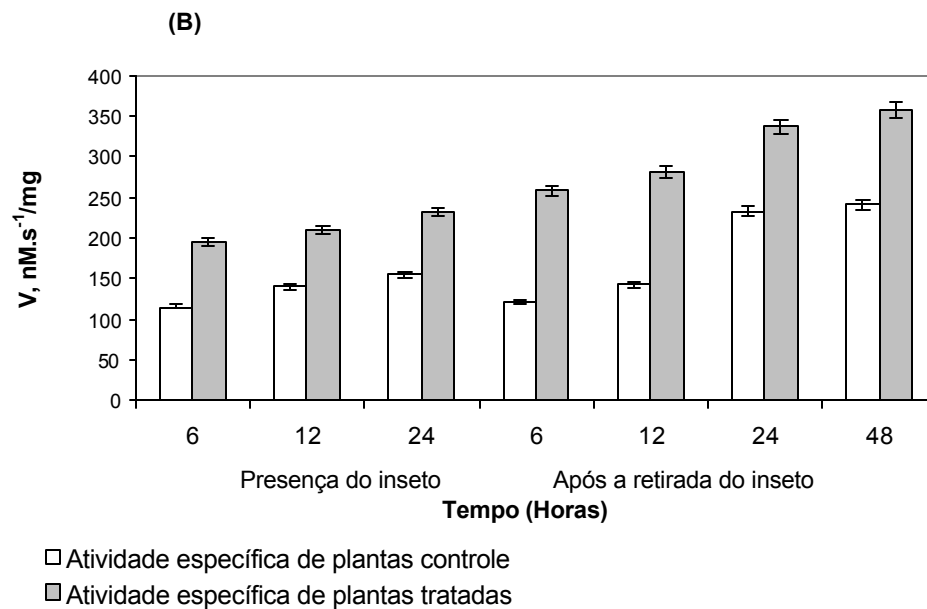
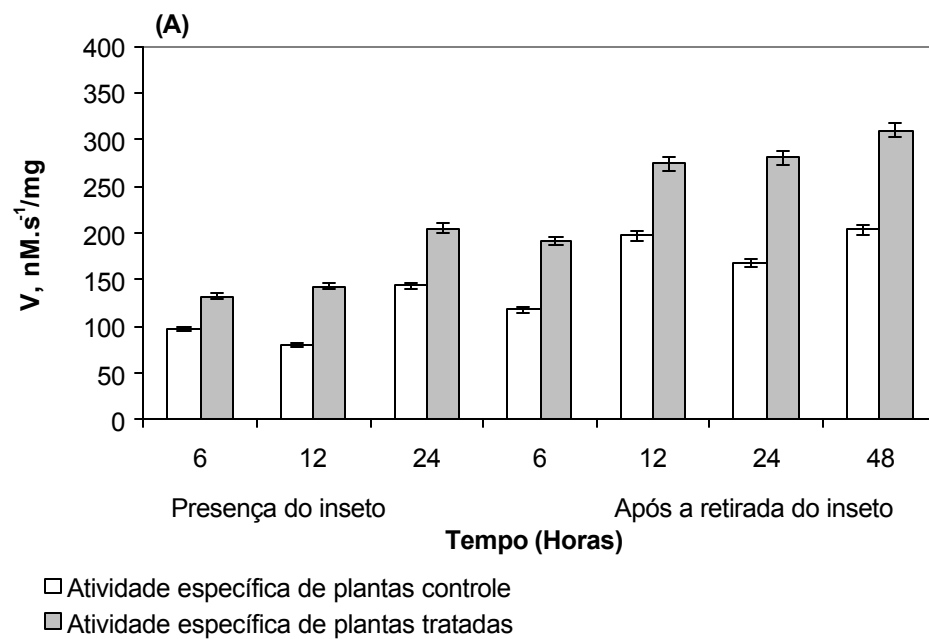


Figura 3 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, variedades CAC-1 (A) e CAC-1 TN (B), coletadas 6, 12 e 24 horas em presença de inseto e 6, 12, 24 e 48 horas na ausência do inseto.

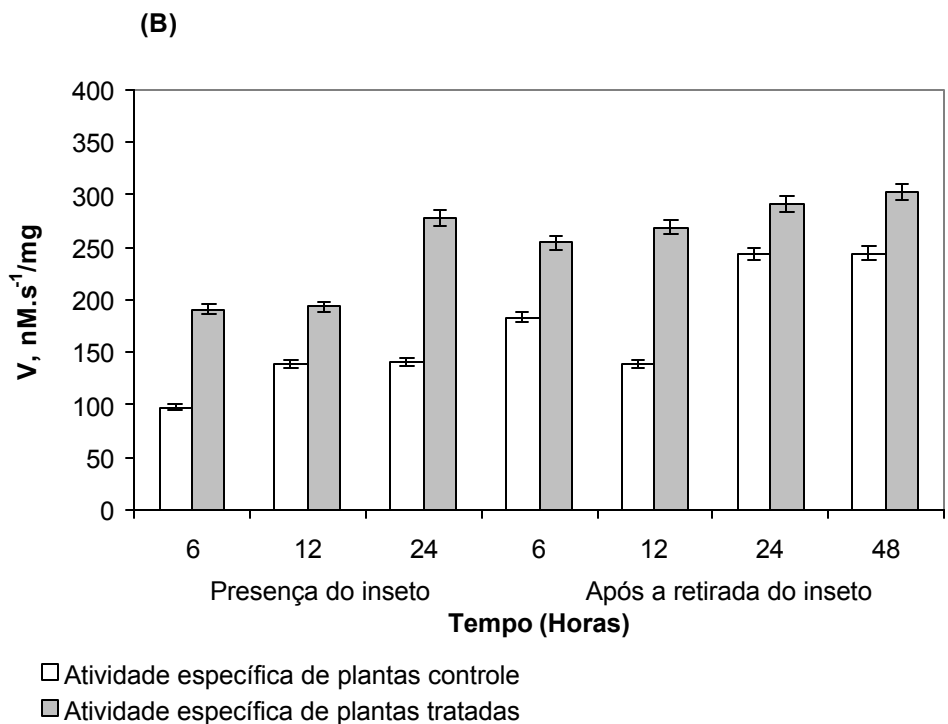
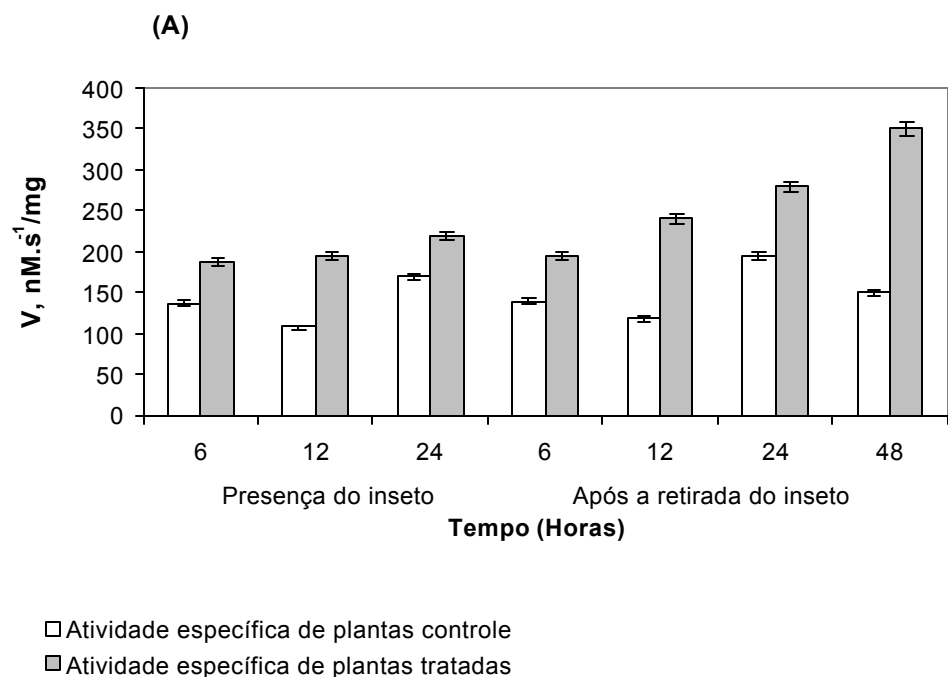


Figura 4 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, variedades CAC-1 KT (A) CAC-1 TN KT (B), coletadas 6, 12 e 24 horas em presença de inseto e 6, 12, 24 e 48 horas na ausência do inseto.

mais bem conhecidos sob o ponto de vista cinético-enzimático são os de serino proteases, os quais inibem as principais enzimas encontradas em insetos da ordem Lepidoptera (TERRA e FERREIRA, 1994).

Como a Via das Lipoxigenases pode produzir ácido jasmônico e esse ativa genes que codificam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992), realizou-se a determinação da inibição de tripsina, uma serino protease, frente aos extratos foliares. Observa-se nas Figuras 5 e 6 aumento dos níveis de inibidores de proteases das plantas submetidas à lagarta da soja em relação às plantas controles em todos os genótipos, tanto na presença quanto após a retirada dos insetos da planta. Observa-se, no Quadro 1, aumento significativo nas médias dos níveis de inibidores de proteases nos quatro genótipos em relação às plantas controle, indicando uma resposta diferenciada entre as plantas que foram submetidas ao inseto e aquelas que não sofreram ataque pelo inseto.

Observou-se aumento nos níveis de inibidores de proteases nos quatro genótipos, com o decorrer do tempo, após a remoção da lagarta da soja. O tempo de 6 horas, na presença do inseto, apresentou a menor resposta para todos os genótipos. O Quadro 1 indica, ainda, aumento na produção de inibidores de proteases 48 horas após a retirada da lagarta da soja em todos os genótipos, sendo esse aumento significativo para os genótipos CAC-1 e CAC-1 TN.

A comparação entre os quatro genótipos em relação à inibição trípica indica aumento no conteúdo de inibidores de proteases avaliados em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína, sendo este aumento mais significativo para as variedades CAC-1 e CAC-1 TN. No entanto, não houve diferença significativa nas médias da resposta da inibição trípica entre os genótipos CAC-1 TN, CAC-1KT e CAC-1 TN KT.

Esses dados mostram semelhança na produção de inibidores de proteases entre as plantas submetidas ao ataque da lagarta da soja nos quatro genótipos, sugerindo, portanto, que a remoção genética dos genes que codificam lipoxigenases e KTI na semente, não influenciou na expressão dos genes que codificam as lipoxigenases e inibidores de proteases foliares, o que é extremamente importante no processo de defesa da planta a insetos e patógenos.

Quadro 1 - Inibição de tripsina por inibidores de proteases em extratos de folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1TN KT submetidos ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

	CAC-1		CAC-1 KT		CAC-1 TN		CAC-1 TN KT		
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	
Presença do inseto	6 horas	5,079 ¹ B	13,823 A c	5,187 B	9,349 A c	4,245 A	5,882 A d	7,582 A	8,856 A b
	12 horas	13,469 A	18,864 A b c	10,215 A	14,416 A b	14,800 B	17,573 A c	16,512 A	16,541 A a
	24 horas	13,395 B	17,158 A b c	14,940 B	19,490 A a	12,058 B	17,601 A c	12,064 A	15,876 A a
	Média	10,648	16,615	10,114	14,418	10,368	13,685	12,053	13,758
Após a retirada do inseto	6 horas	12,096 B	18,151 A b c	8,692 B	14,512 A b	9,2041 A	14,937 A c	8,692 B	14,512 A a b
	12 horas	14,217 B	21,486 A b	8,324 A	12,186 A b c	9,7823 B	16,712 A c	5,714 B	15,165 A a b
	24 horas	10,905 B	22,526 A a b	11,737 B	19,830 A a	15,722 B	24,559 A b	4,206 B	17,002 A a
	48 horas	7,918 B	27,177 A a	17,685 B	22,637 A a	17,243 B	29,406 A a	12,123 B	19,603 A a
	Média	11,284	22,335	11,610	17,291	12,988	21,404	7,684	16,571
Média	11,011 B	19,884 A A	10,969 B	16,060 A B	11,865 B	18,096 A AB	9,556 B	15,365 A B	

¹Valores são a média das análises de três repetições.

Nas colunas, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Nas linhas, dentro de uma mesma variedade genética, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

Nas linhas, considerando as quatro variedades genéticas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em negrito não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

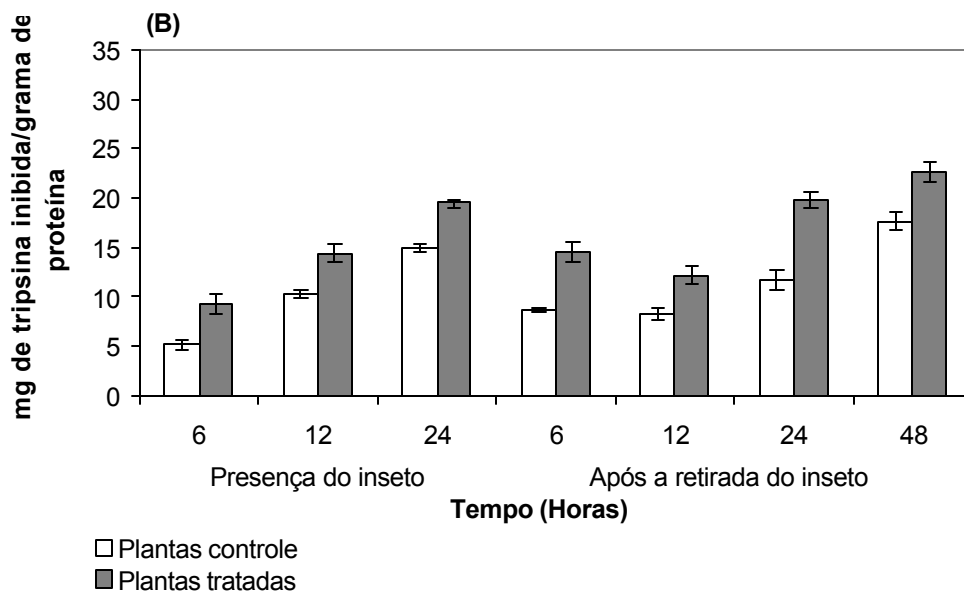
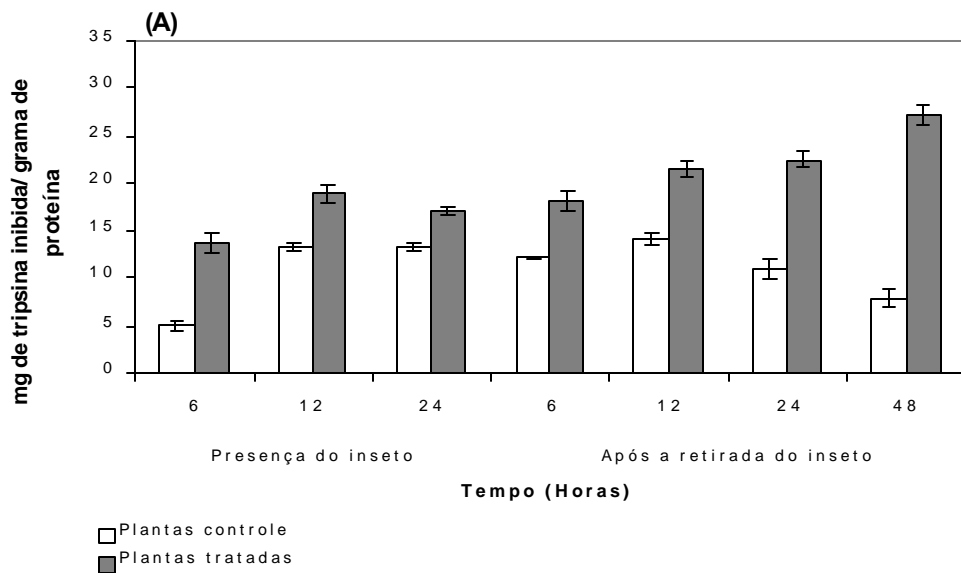


Figura 5 - Inibição de tripsina por inibidores de proteases em extratos de folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 (A) e CAC-1 TN (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*).

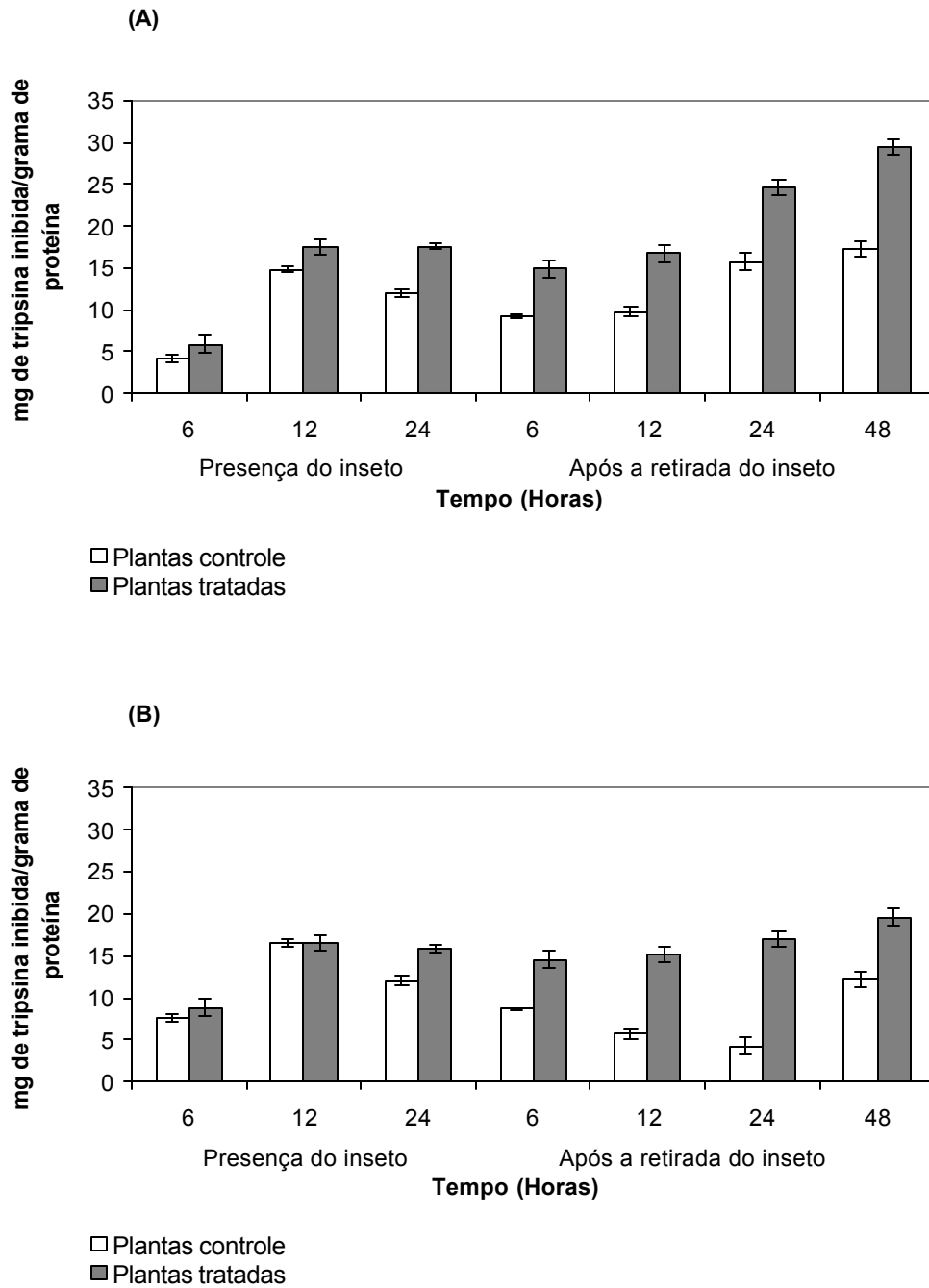


Figura 6 - Inibição de tripsina por inibidores de proteases em extratos de folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 KT (A) e CAC-1 TN KT (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatilis*).

Esses resultados, juntamente com os dados de parâmetros cinéticos, indicam ainda um possível mecanismo de resposta da planta de soja ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*), passando pela Via das Lipoxigenases; o que parece ocorrer pelo aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e, em seguida, pelo aumento da ação da hidroperóxido ciclase, levando à conversão dos hidroperóxidos formados em ácido 12-oxo-fitodienólico e, posteriormente, a ácido jasmônico. Este último é proposto para interagir com um receptor de membrana, ativando a expressão de genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992).

Os dados estão de acordo com aqueles obtidos por GREEN e RYAN (1972), FARMER e RYAN (1992), DAMMAN et al. (1997) e CREELMAN e MULLET (1997), em que se sugere que o ácido jasmônico seja parte integral de um sistema de transdução de sinais intracelulares que regulam a transcrição de genes que codificam inibidores de proteases. GREEN e RYAN (1972) mostraram que ferimentos em folhas de batata ou em folhas de tomate causados pelo besouro Colorado ou por suas larvas, induzem um rápido acúmulo de inibidores de proteases em todos os tecidos aéreos de plantas. THOMAS et al. (1995) também relataram que a expressão de inibidores de tripsina em plantas de tabaco mostrou redução na reprodução de mosca branca (*Bemisia tabaci*). TAYLOR e LEE (1997) sugerem que os inibidores de proteases atuam na proteção de plantas contra Lepidoptera. SILVA (1999), submetendo plantas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN ao ataque de mosca branca, *Bemisia argentifolii*, e lagarta da soja (*A. gemmatalis*) observou aumento significativo nos níveis de inibidores de proteases.

A ingestão de folhas contendo inibidores de proteases, pelo inseto, leva à inibição de enzimas proteolíticas interferindo na biodisponibilidade de aminoácidos para a biossíntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e na reprodução do inseto. Postula-se também que esta ingestão de inibidores de proteases levaria ao aumento da biossíntese de mais proteases para compensar os baixos níveis de aminoácidos biodisponíveis. Entretanto, os aminoácidos produzidos seriam deslocados para a biossíntese de mais proteases em detrimento à biossíntese de outras proteínas essenciais ao inseto, o que o levaria à morte (BROADWAY, 1995).

Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o aumento nos níveis de inibidores de proteases, em resposta ao ataque de herbívoros, seja um provável mecanismo de defesa da planta ao inseto .

CARVALHO et al. (1997), trabalhando com sementes de vários genótipos de soja contrastando para ausência e presença de genes que codificam lipoxigenases e KTI, mostraram que a eliminação genética de lipoxigenases nas sementes, conseqüentemente, diminuía os níveis de KTI. Estes autores verificaram que a produção de KTI em sementes estava relacionada com os níveis de lipoxigenases. Portanto, a Via das Lipoxigenases estaria envolvida com o mecanismo bioquímico de produção de KTI em sementes. Assim, os resultados obtidos mostraram, ainda, que a manipulação genética feita na semente, com a retirada das lipoxigenases para diminuir o *beany flavor* e a retirada do inibidor de proteases Kunitz, fator antinutricional , com o objetivo de obter um grão de soja de melhor qualidade para a agroindústria, não afetou a expressão dos genes de inibidores de proteases e de lipoxigenases em folhas os quais têm sido relatados como componentes importantes no mecanismo de defesa de plantas a insetos e patógenos.

3.5. Determinação dos níveis de hexanal em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

A Via das Lipoxigenases pode produzir também compostos carbonílicos tais, como hexanal e outros aldeídos. Assim, realizou-se a determinação de hexanal e de aldeídos totais nos extratos foliares com o objetivo de verificar se o ataque da lagarta da soja às plantas de soja iria produzir aumento nos níveis de hexanal e aldeídos totais.

No Quadro 2 e nas Figuras 7 e 8 são apresentados os níveis de hexanal determinados em plantas de soja dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1 TN KT, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas ao ataque da lagarta da soja e coletadas 6, 12 e 24 horas, na presença do inseto, e 6, 12, 24, e 48 horas após a retirada do inseto, e seus respectivos controles

Os níveis de hexanal dos quatro genótipos são mostrados no Quadro 2. Comparando-se as médias dos tratamentos com as médias dos seus respectivos controles, observou-se um aumento nos níveis de hexanal nos

Quadro 2 - Níveis hexanal em folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1TN KT submetidos ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

	CAC-1		CAC-1 KT		CAC-1 TN		CAC-1 TN KT		
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	
Presença do inseto	6 horas	2.600,667 ¹	3.449,333 a	3.272,333	3.296,333 a	2.817,000	3.456,333 a	1.837,333	2.220,000 e
	12 horas	1.677,333	1.909,333 c d	2.200,667	2.339,000 b	2.144,667	2.086,333 d	1.802,333	2.458,333 d e
	24 horas	1.340,333	1.531,333 d	2.441,667	3.496,333 a	1.833,000	1.805,000 d	2.727,667	2.996,000 c d
	Média	1.872,778	2.296,666	2.638,222	3.043,889	2.264,889	2.449,222	2.122,444	2.558,111
Após a retirada do inseto	6 horas	1.438,333	2.360,000 b c	2.484,667	3.289,667 a	2.288,000	2.740,000 b	2.192,333	3.827,000 b
	12 horas	2.152,667	2.168,000 b c	2.579,667	3.384,333 a	2.311,333	2.586,000 b c	2.016,333	2.960,333 d
	24 horas	2.658,333	2.559,333 b	2.348,000	2.629,333 b	1.997,333	2.108,000 d	2.678,000	4.922,667 a
	48 horas	3.437,333	2.627,333 b	1.675,667	2.733,333 b	2.176,667	2.205,333 c d	2.515,667	3.546,667 b c
	Média	2.421,667	2.428,667	2.272,000	3.009,167	2.193,333	2.409,833	2.350,583	3.814,167
	Média	2.186,428 A	2.372,095 A B	2.428,952 B	3.024,048 A A	2.224,000 A	2.426,714 A B	2.252,810 B	3.275,857 A A

¹ Valores são a média das análises de três repetições.

Nas colunas, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Nas linhas, dentro de uma mesma variedade genética, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

Nas linhas, considerando as quatro variedades genéticas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em negrito não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

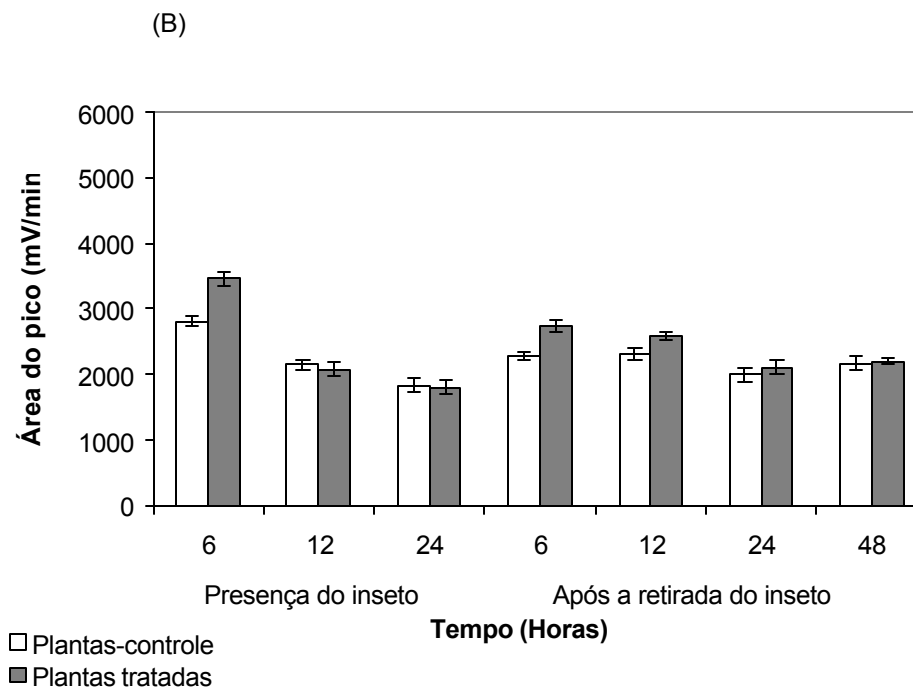
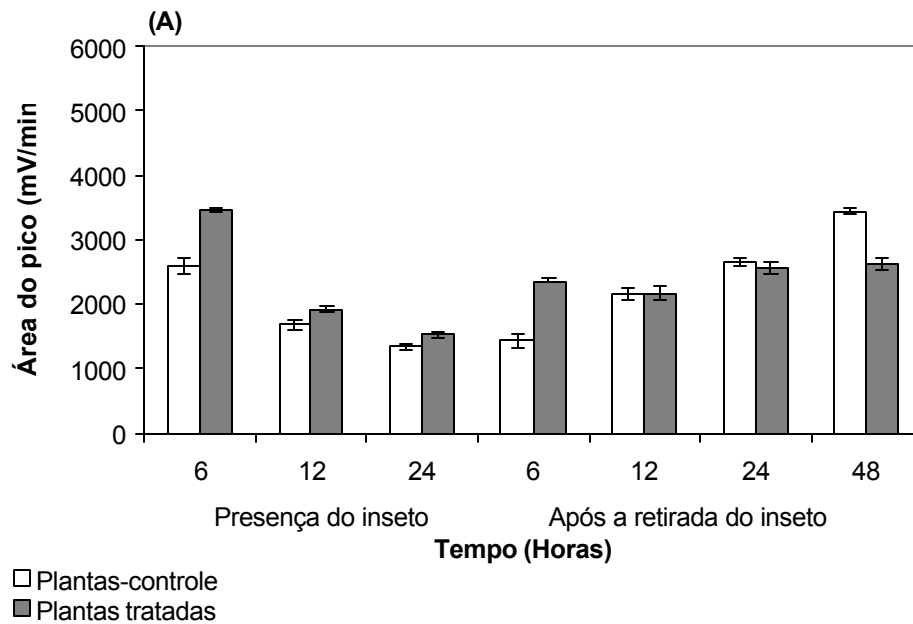


Figura 7 - Níveis de hexanal em folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 (A) e CAC-1 TN (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatilis*).

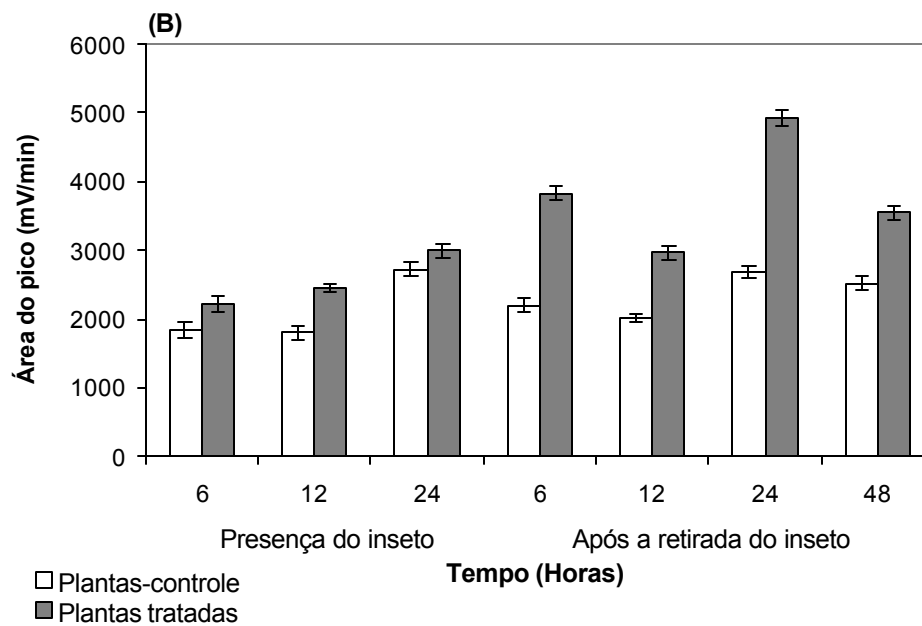
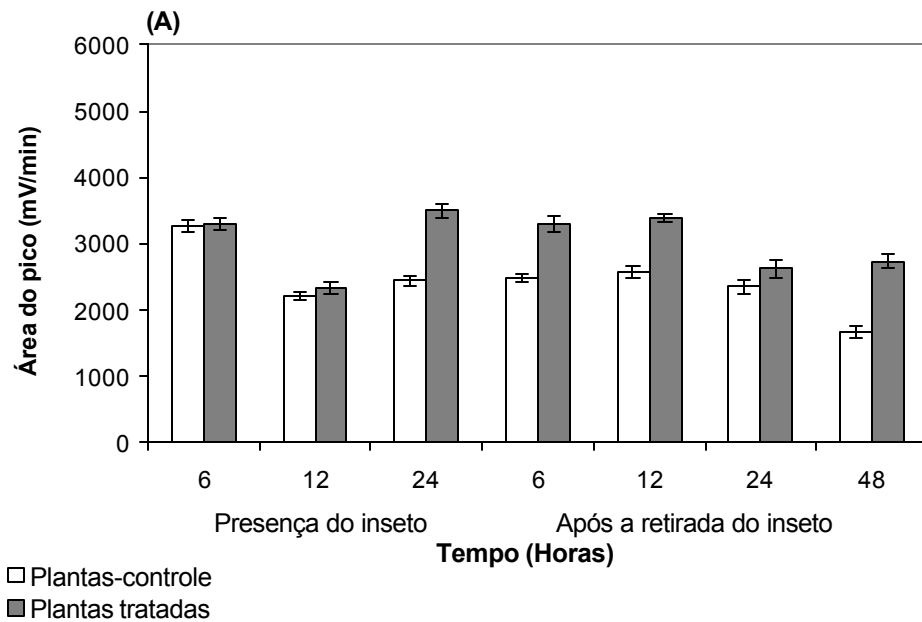


Figura 8 - Níveis de hexanal em folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 KT (A) e CAC-1 TN KT (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*).

quatro genótipos, sendo esse aumento significativo para os genótipos CAC-1 KT e CAC-1 TN KT. Os genótipos CAC-1 e CAC-1 TN não apresentaram diferença significativa entre as médias dos tratamentos e as médias dos seus respectivos controles.

No Quadro 2 são apresentados ainda, nas colunas de cada material genético, os respectivos tempos de tratamento. Verificou-se um aumento significativo nos níveis de hexanal para os genótipos CAC-1 e CAC-1 TN, 6 horas na presença do inseto. O genótipo CAC-1 KT apresenta um aumento significativo nos níveis de hexanal 12 horas após a retirada do inseto, e observa-se ainda que não houve diferença significativa nos níveis de hexanal 6 e 24 horas na presença do inseto e 6 horas após a retirada do inseto em relação a 12 horas após a retirada do inseto. O genótipo CAC-1 TN KT apresenta um aumento significativo nos níveis de hexanal 24 horas após a retirada do inseto. A comparação entre as médias dos tratamentos dos quatro genótipos é demonstrada nas médias das linhas do Quadro 2, indicando que não houve diferença significativa nos níveis de hexanal entre os genótipos CAC-1 e CAC-1 TN e entre os genótipos CAC-1 KT e CAC-1 TN KT.

3.6. Determinação dos níveis de aldeídos totais em folhas de soja submetidas ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner)

No Quadro 3 e nas Figuras 9 e 10 são apresentados os níveis de aldeídos totais determinados em plantas de soja dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1 TN KT, no estágio V3 de desenvolvimento, e seus respectivos controles, submetidas ao ataque da lagarta da soja e coletadas 6, 12, 24 horas na presença do inseto e 6, 12, 24, e 48 horas após a retirada do inseto. Observando-se os níveis de aldeídos totais dos quatro genótipos e comparando-se as médias dos tratamentos com as médias dos seus respectivos controles, verificou-se um aumento nos níveis de aldeídos totais nos quatro genótipos, sendo esse aumento significativo para os genótipos CAC-1, CAC-1 KT e CAC-1 TN (Quadro 3). O genótipo CAC-1 TN KT não apresentou diferença significativa entre as médias dos tratamentos e as médias dos seus respectivos controles.

Quadro 3 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja, folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1, CAC-1 KT, CAC-1 TN e CAC-1TN KT submetidos ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

		CAC-1		CAC-1 KT		CAC-1 TN		CAC-1 TN KT	
		Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Presença do inseto	6 horas	0,684 ¹ A	0,715 A e	0,698 B	0,971 A a b	0,867 B	0,943 A a b	1,186 A	1,265 A a
	12 horas	0,550 B	0,888 A c d	0,821 B	0,978 A a	0,509 B	0,800 A b	0,760 B	0,939 A b c
	24 horas	0,985 B	1,170 A a	0,793 B	0,849 A b c	0,622 B	0,841 A b	0,782 B	0,909 A b c
	Média	0,740	0,924	0,771	0,933	0,666	0,861	0,909	1,038
Após a retirada do inseto	6 horas	0,792 A	0,817 A d e	0,731 B	0,867 A a b c	0,966 A	0,994 A a	0,994 A	0,997 A b
	12 horas	0,888 B	0,990 A b c	0,761 B	0,972 A a b	0,703 A	0,646 A c	0,869 B	1,021 A b
	24 horas	0,655 B	1,039 A a b	0,781 B	0,839 A c	0,764 B	0,914 A a b	1,062 B	1,233 A a
	48 horas	0,631 B	0,789 A d e	0,794 A	0,814 A c	0,705 B	0,873 A a b	0,785 A	0,794 A c
	Média	0,742	0,909	0,767	0,873	0,785	0,857	0,928	1,011
	Média	0,741 B	0,915 A B	0,769 B	0,899 A B	0,734 B	0,859 A B	0,920 A	1,023 A A

¹Valores são a média das análises de três repetições.

Nas colunas, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Nas linhas, dentro de uma mesma variedade genética, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

Nas linhas, considerando as quatro variedades genéticas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em negrito não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de tukey.

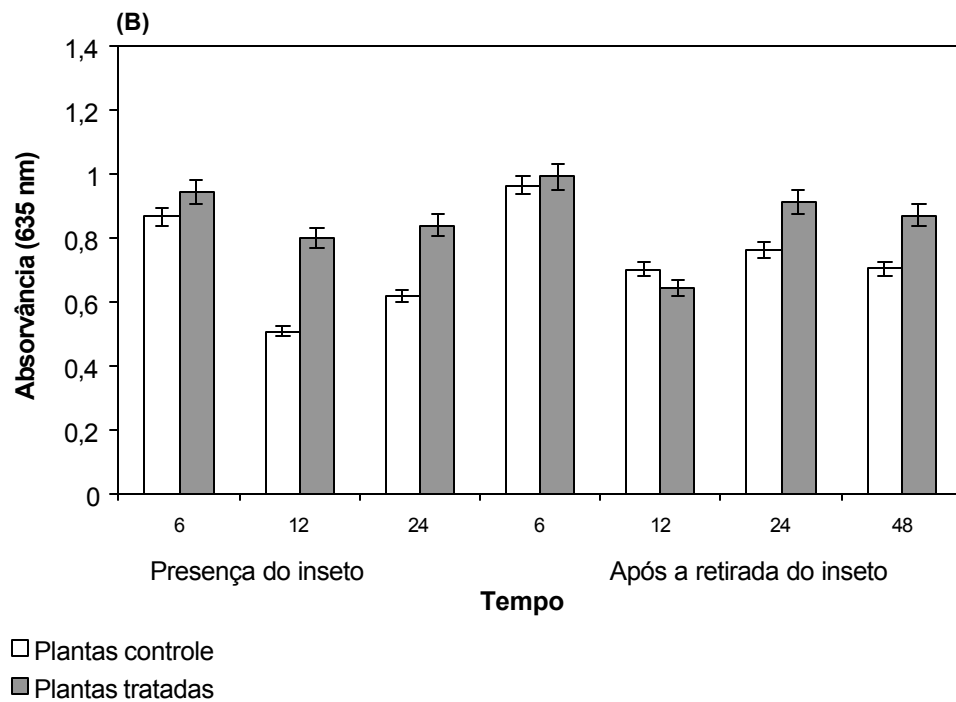
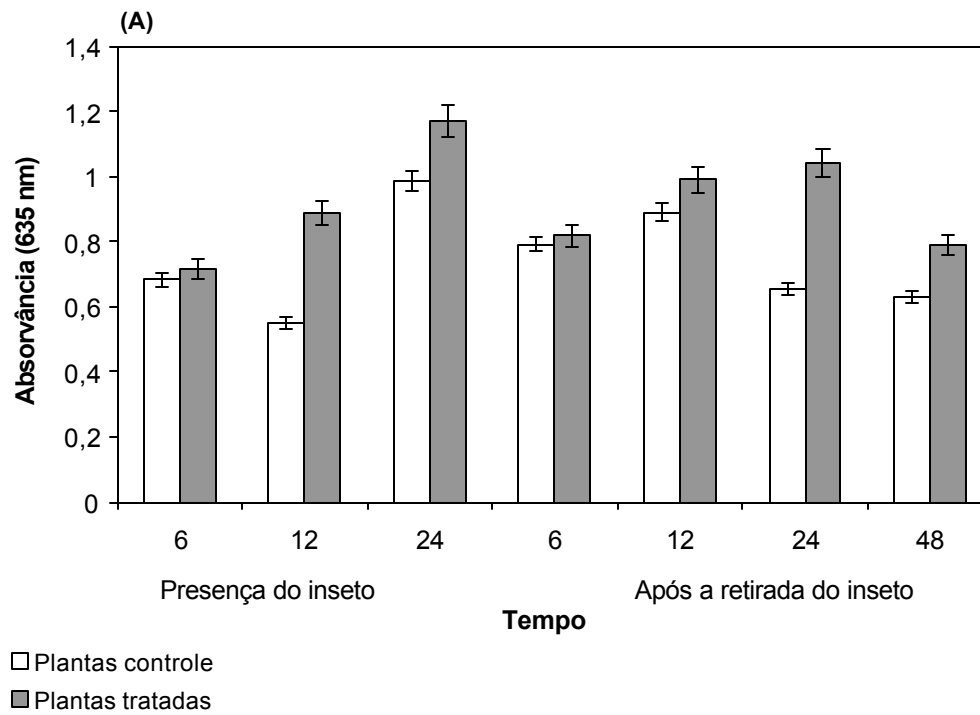


Figura 9 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 (A) e CAC-1 TN (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatilis*).

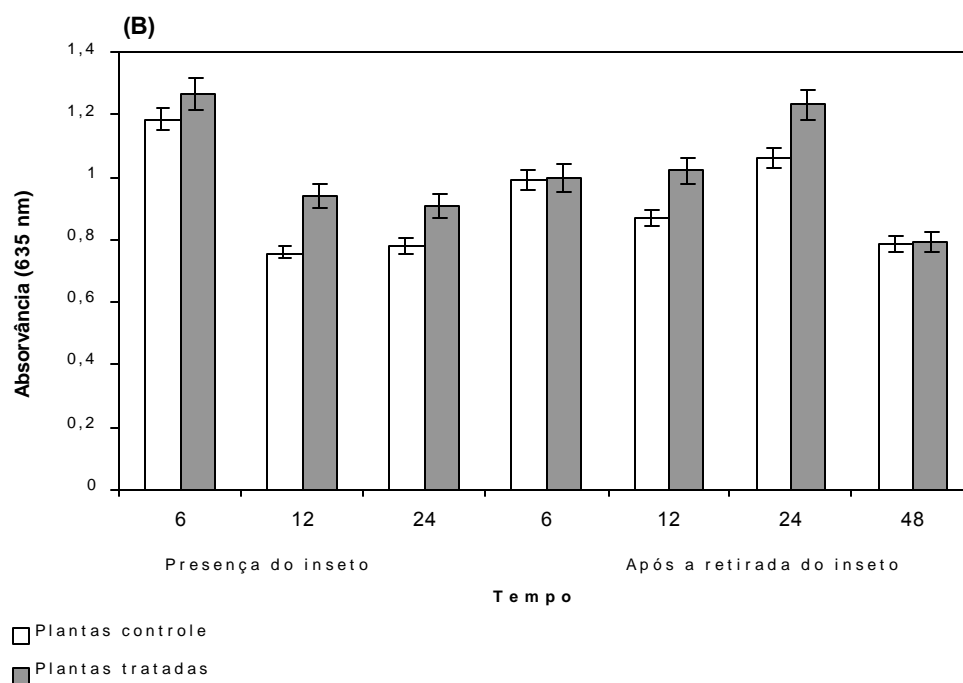
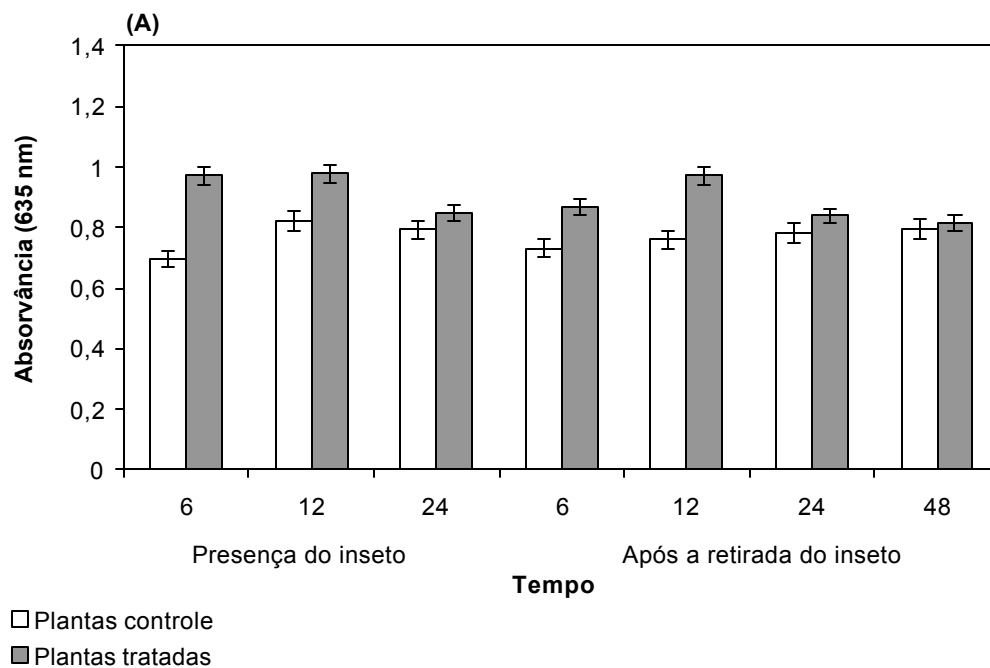


Figura 10 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos CAC-1 KT (A) e CAC-1 TN KT (B) submetidos ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatilis*).

A comparação entre os tempos de tratamentos de cada material genético é mostrada nas colunas do Quadro 3. Observou-se aumento significativo nos níveis de aldeídos totais para o genótipo CAC-1 24 horas na presença do inseto e 24 horas após a retirada do inseto; para o genótipo CAC-1 KT 12 horas na presença do inseto e 12 horas após a retirada do inseto; para o genótipo CAC-1 TN 6 horas na presença do inseto e 6 horas após a retirada do inseto e para o genótipo CAC-1 TN KT 6 horas na presença do inseto e 24 horas após a retirada do inseto. Observou-se, ainda, uma redução nos níveis de aldeídos totais 48 horas após a retirada do inseto para todos os genótipos, sendo essa redução mais acentuada para os genótipos CAC-1 e CAC-1 TN. A comparação entre as médias dos tempos de tratamentos dos quatro genótipos é demonstrada nas médias das linhas do Quadro 3, indicando que não houve diferença significativa nos níveis de aldeídos totais para os genótipos CAC-1, CAC-1 KT e CAC-1 TN.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a capacidade de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) de responder ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner) pela da Via das Lipoxigenases. Para isso, analisou-se o efeito do ataque do inseto em folhas de soja sobre a atividade do *pool* de lipoxigenases e sobre a produção dos produtos finais da Via das Lipoxigenases.

As plantas de soja dos quatro genótipos foram submetidas ao ataque da lagarta da soja e o primeiro trifolíolo foi coletado 6, 12 e 24 horas na presença do inseto. A seguir, o primeiro trifolíolo foi coletado 6, 12, 24 e 48 horas após a retirada do inseto. Os extratos foliares, obtidos a partir do trifolíolo, foram utilizados na avaliação das atividades de lipoxigenases, na determinação dos parâmetros cinéticos, na dosagem de proteínas, na determinação dos níveis de inibidores de proteases e na determinação dos níveis de aldeídos totais. Foi analisada a resposta de quatro genótipos da variedade CAC-1, CAC-1 TN, CAC-1 KT e CAC-1 TN KT.

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Os dois picos mais acentuados de atividade a pH 4,5 e 6,5, nos tratamentos e respectivos controles, indicam as diferentes formas de isoenzimas lipoxigenases do extrato foliar. Os valores de atividade foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, em todos os genótipos.

- O valor mais acentuado de atividade foi a 25 °C para os genótipos e seus respectivos controles. Os valores de atividade de lipoxigenases foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, nos quatro genótipos, em diferentes valores de temperatura. Esses resultados sugerem resposta das plantas de soja ao ataque da lagarta (*A. gemmatalis*) por meio da Via das Lipoxigenases.
- Os valores de K_{Mapp} , determinados no *pool* de lipoxigenases de folhas em presença do inseto, foram menores que nos respectivos controles para todos os genótipos. Além disso, os valores de K_{Mapp} decresceram para os quatro genótipos, com o tempo de ataque da planta pela lagarta; ou seja, decresceram de 6 até 24 horas em presença do inseto. Os valores de K_{Mapp} do *pool* de lipoxigenases dos quatro genótipos diminuíram até 48 horas após a remoção do inseto. Isto evidencia que tais plantas continuaram respondendo ao ataque da lagarta da soja, pela da Via das Lipoxigenases, até 48 horas após esta remoção.
- ♦ A atividade específica, para os quatro genótipos, foi maior nos tratamentos que nos respectivos controles em todos os tempos analisados; o que sugere que as plantas de soja respondem ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*) pelo aumento da atividade de lipoxigenases e que, embora possa existir diferença no *pool* dessas isoenzimas, entre os genótipos, o comportamento cinético das mesmas é semelhante, evidenciando, assim, que a remoção genética das isoenzimas lipoxigenases da semente não afetou a resposta das plantas ao ataque da lagarta da soja.
- Os quatro genótipos mostraram aumento da inibição trípica após ataque da lagarta da soja e os valores em mg de tripsina inibida/grama de proteínas foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles. Assim, pode-se também verificar que a remoção de lipoxigenases e de inibidores de proteases nas sementes não alterou a produção de inibidores de proteases e lipoxigenases nas folhas. As plantas de soja responderam ao ataque de lagarta aumentando o nível de inibidores de proteases.

- Os níveis de hexanal foram maiores nos genótipos CAC-1 e CAC-1 TN, 6 horas na presença do inseto, 12 horas após a retirada do inseto para o genótipo CAC-1 KT e 24 horas para o genótipo CAC-1 TN KT. O nível de hexanal reduziu 48 horas após a retirada do inseto em todos os genótipos.
- Os níveis de aldeídos totais foram maiores para o genótipo CAC-1, 24 horas na presença do inseto e 24 horas após a retirada do inseto; para o genótipo CAC-1 KT, 12 horas na presença do inseto e 12 horas após a retirada do inseto; para o genótipo CAC-1 TN, 6 horas na presença do inseto e 6 horas após a retirada do inseto e para o genótipo CAC-1 TN KT, 6 horas na presença do inseto e 24 horas após a retirada do inseto. O nível de aldeídos totais foi menor 48 horas após a retirada do inseto para todos os genótipos em relação a tempos anteriores de maior produção.
- Os resultados mostram que, para os quatro genótipos de soja, houve uma redução na produção de hexanal e de aldeídos totais 48 horas após a retirada do inseto. Isto indica que a Via das Lipoxigenases está sendo ativada em resposta ao ataque da lagarta da soja, mas não segue a via de produção de aldeídos totais. É possível que a planta, em resposta ao ataque da lagarta da soja, ative a Via das Lipoxigenases e, após a formação de hidroperóxidos, ocorra a ação enzimática de hidroperóxido ciclase, seguindo a via de produção de ácido jasmônico que, subsequentemente, ativa a expressão de genes de inibidores de proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKO, H., FOSTER, R.J., RYAN, C.A. (1974). Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors. Studies with anhydrotrypsin and anhydrochymotrypsin purified by affinity chromatography. **Biochemistry**, 13:132-139.
- ANDERSON, J.M., SILATRO, S.R., KLAUER, S.F., FRANCESCHI, V.R. (1989). Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, 62:45-52.
- ANDERSON-HAFMANN, J.C., ZHANG, Y., PARSONS, C.M. (1992). Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz Trypsin inhibitor-free soybeans. **Poultry Science**, 71:1700-1709.
- ANSTIS, P.J.P., FRIEND, J. (1974). The isozyme distribution of etiolated pea seedling lipoxigenase. **Planta**, 115:329-335.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. (1981). Lipoxygenases from soybeans. **Methods Enzymol.**, 71:441-451.
- BAILLARGEON, M.W., LASKOWSKI, Jr. M., NEVES, D.E., PORUBCAN, M.A., MARKLEY, J.L. (1980). Soybean trypsin inhibitor (kunitz) and its complex with trypsin. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the reactive site arginine, **Biochemistry**, 19:5703-5708.
- BELL, E., CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabiopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:8675-79.
- BELL, E., MULLET, J.E. (1991). Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Mol. Gen. Genet.**, 230:456-462.

- BELL, E., MULLET, J.E. (1993). Characterization of an arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiol.**, 103:1133-1137.
- BLOW, D.M., AND STEITZ, T.A. (1970). X-Ray diffraction studies of enzymes. **Ann. Rev. Biochem.**, 39:63-96.
- BOHLAND, C., BALKENHOHL, T., LOERS G., FEUSSNER I., GRAMBOW, H.J. (1997). Differential induction of lipoxygenases isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, 114:679-685.
- BRANDON, D.L., BATES, A.H., FRIEDMAN, M. (1993). Antigenicity of soybean protease inhibitors. **J. Agric. Food. Chem.**, 107-129.
- BRANDON, D.L., HAQUE, S., FRIEDMAN, M. (1987). Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **J. Agric. Food. Chem.**, 35:195-200.
- BROADWAY, R.M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors. **J. Ins. Physiol.**, 41:107-116.
- BUNKER, T.W., KOETJE, D.S., STEPHENSON, L.C., CREELMAN, R.A., MULLET, J.E., GRIMES, H.D. (1995). Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331.
- CARVALHO, W.A. (1997). Efeito da eliminação genética de lipoxigenases sobre os níveis de inibidores de proteases em sementes de soja. VIÇOSA-UFV: MG, 89p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa.
- CHRISTELLER J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J.; (1994). Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 22:735-746.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 48:355-381.
- CROFT, K.P.C., JÜTTNER, F., SLUSARENKO, A.J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiol.**, 101:13-24.
- CROFT, K.P.C., VOISER, C.R., SLUSARENKO, A.J. (1990). Mechanism of hypersensitive cell collapse: Correlation of increase lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L) inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Mol. Plant Physiol.**, 36:49-62.

- DAMMAN, C., ROJO, E., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. (1997). Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant J.**, 11(4):773-782.
- DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. (2000). Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. **Plant Physiol.**, 123:1269-1279.
- ELISOR, L.O. (1942). Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner. **La. Agr. Exp. Sta. Bull.**, Louisiana, 350:15-25.
- EMBRAPA. Agronegócio da soja no Brasil. In: **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 2000/2001**. Londrina, PR: EMBRAPA Soja.-Londrina: EMBRAPA Soja/Fundação MT, (2000).11-46.
- EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste (CPAO). In: **Recomendações técnicas para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso**. Dourados, MS: (1996). 125-139 (EMBRAPA-CPAO. Circular Técnica, 3)
- ESTELL, D.A., WILSON, K.A., LASKOWSKI, M. Jr (1980). Thermodynamics and kinetics of hydrolysis of the reactive-site peptide bond in pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) by *Dermasterias imbricata* trypsin. **Biochemistry**, 19:131-37.
- EVERARD, J.D., FRANCESCHI, V.R., KU, M.S.B. (1990a). Characteristics and carbon metabolism of mesophyll and paraveinal mesophyll protoplasts from leaves of non-modulated *Glycine max*. **Plant Sci.**, 66: 67-172.
- EVERARD, J.D., KU, M.S.B., FRANCESCHI, V.R. (1990b). Distribution of metabolites and enzyme of nitrogen metabolism between the mesophyll and paraveinal mesophyll of non-nodulated *Glycine max*. **J. Exp. Bot.**, 41:855-861.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell.**, 4: 129-134.
- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. (1977). **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, 11p. (Special Report, 80)
- FIDANTSEF, A.L., BOSTOCK, R.M. (1998). Characterization of potato tuber lipoxygenase cDNAs and lipoxygenase expression in potato tubers and leaves. **Physiol. Plantarum**, 102: 257-271.
- FISHER, D.B. (1967). An usual layer of cells in the mesophyll of the soybean leaf. **Bot. Gaz.**, 128:215-221.

- FORD, B.J., STRAYER, J.R., GODFREY, G.L. (1975). The literature of arthropods associated with soybean. IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae). (Biological Notes, 92). Urbana, 111. **Nat. Hist. Surv.**, 15p.
- FORNAROLI, S., PETRUSSA, E., BRAIDOT, E., VIANELLO, A., MACRÌ, F. (1999). Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. **Plant Sci.**, 145:1-10.
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. (1983a). The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. **Planta**, 157:411-421.
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. (1983b). The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. II. Structural, metabolic and compartmental changes during reproductive growth. **Planta**, 157:422-431.
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. (1983c). Specialized cellular arrangements in legume leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation: comparison of the paraveinal mesophyll. **Planta**, 159:415-422.
- FRANCESCHI, V.R., WITTENBACH, V.A., GIAQUINTA, R.T. (1983). The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. III. Immunohistochemical localization of specific glycopeptides in the vacuole after depodding. **Plant Physiol.**, 72:586-589.
- GARDNER, W.H. (1991). Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochem. Biophys. Acta**, 1084: 221-239.
- GEERTS, A., FELTKAMP, D., ROSAHL, S. (1994). Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiol.**, 105:269-277.
- GREEN, T.R., RYAN, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, 175:776-777.
- GREENE, G.L. (1974). Sexual dimorphism of *Anticarsia gemmatilis* leg scales. **Fla. Entomol.**, Florida, 57:280-285.
- GREENE, G.L., REID, J.C., BLOUNT, V.N., RIDDLE, T.C. (1973). Mating and oviposition behavior of the velvetbean caterpillar in soybean. **Environ. Entomol.**, College Park, 2:1113-1115.
- GUYTON, F.E. (1940). An outbreak of the velvetbean caterpillar in Alabama with data on control. **J. Econ. Entomol.**, College Park, 33:635-639.

- HATANAKA, A., KAJIWARA, T., SEKIYA, J., IMOTO, M., INOUE, S. (1982) Participation and properties of lipoxygenase and hidroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. **Plant Cell Physiol.**, 23:91-99.
- HEITZ, T., BERGEY, D.R., RYAN, C.A. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, 114:1085-1093.
- HILDEBRAND, D.F. (1989). Lipoxygenases. **Physiol. Plantarum**, 76: 249-253.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. (1988). Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochem. and Physiol.**, 7:201-219.
- HILDEBRAND, D.F., RODRIGUES, J.G., LEGG, C.S., BROWN, G.C., BOOKJANS, G. (1989). The effects of wounding and mite infestation on soybean leaf lipoxygenase levels. **Z. Naturforsch**, 44c:655-659.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, 300:160-160.
- HINDS, W.E., OSTERBERGER, B.A., (1931). The soybean caterpillar in Louisiana **J. Econ. Entomol.**, College Park, 24:1168-1173.
- HIXSON, H.F., LASKOWSKI, M. Jr. (1970). Formation from trypsin and modified soybean trypsin inhibitor of a complex which upon kinetic control dissociation yields trypsin and virgin inhibitor **J. Biol. Chem.** 245:2027-2031.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. (1985). Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina. **EMBRAPA-CNPSO**, 5-23.
- HÜBER, R., KUKLA, D., BODE, W., SCHWAGER, P., BARTELS, K., DEISENHOFER, J., STEIGERMANN, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II – Crystallographic refinement at 1,9 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 89:73-101.
- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E., PUSKI, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chem.**, 51: 376-382.
- KASHLAN, N., RICHARDSON, M. (1981). The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amylase, **Phytochemistry**, 20-25.
- KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. (1993). Soybean lipoxygenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissue: expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiol.**, 34:1063-1072.

- KOCH, E., MEIER, B.M., EIBEN, H.G., SLUSARENKO, A. (1992). A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonas*. **Plant Physiol.**, 99: 571-576.
- KOETJE, D.S., GRIMES, H.D. (1992). Molecular characterization of *loxN*, a nitrogen-responsive lipoxygenase gene of soybeans (abstract N° 484). **Plant Physiol.** 99: S-81.
- KRAUT, J. (1977). Serine protease: Structure and mechanism of catalysis. **Ann. Rev. Biochem.**, 46:331-358
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. (1996). Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **Brazilian Journal. of Plant Physiol.**, 8:87-92.
- LASKOWSKI, Jr M., KATO, I., (1980). Protein inhibitor of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.**, 49:593-626.
- LEATHERBARROW, R.J. (1987). Enziffiter manual. **Biosoft. London**, 13-42.
- LEÓN, J., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. (1999). Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. **Plant. Physiol. Biochem.**, 37:373-380.
- LEPPLA, N.C. (1976). Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, 69:45-48
- MACK, A.J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. (1987). Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Cur Top Biol. Med. Res.**, 13:127-54.
- MAHONEY, W.C., HERMODSON, M.A., JONES, B., POWERS, D.D., CORFMAN, R.S., REECK, G.R. (1984). Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of the trypsin and activated Hageman factor. **J. Biol. Chem.**, 259: 8412-8419.
- MATSUI, K., HIJIYA, K., TABUCHI, Y., KAJIWARA, T. (1999). Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action an lipid bodies. **Plant Physiol.**, 119:1279-1288.
- MCPHALEN, C.A., SCNEBLI, H.P., JAMES, M.N.G. (1985). Crystal and molecular structure of the inhibitor eglin from leeches in complex with subtilisin Carlsberg, **FEBS Lett.**, 188:55-60.
- MELAN, M.A., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS, K.R., AUSUBEL, F.M., PETERMAN, T.K. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, 101:441-450.

- MOSCARDI, F. (1979). Effect of soybean crop phenology on development, leaf consumption, and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* Hübner. 139p. Dissertation. (PhD), Univ. Gainesville, USA.
- MULLER, M.J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. (1997). **Physiol Plant**, 100:653-663.
- NICKLE, D.A. (1977). The peanut agroecosystem in central Florida; economic threshold for defoliating noctuids (Lepidoptera, Noctuidae), associated complex (Hymenoptera, Braconidae). 131p. Dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA.
- ODANI, S., KOIDE, T., ONO, T. (1983). The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. **J. Biol. Chem**, 258:7998-8003.
- OHTA, H., IDA, S., MIKAMI, B., MORITA, Y. (1986). Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant Cell Physiol.**, 22(5):911-918.
- OHTA, H., SHIDA, K., PENG, Y.L., FURUSAWA, I., SHISHIYAMA, J., AIBARA, S., MORITA, Y. (1991). A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Physiol.**, 97:94-98.
- PANIZZI, A.R., CORREA, B.S., GAZZONI, D.L., OLIVEIRA, E.B., NEWMAN, G.C., TURNIPSEED, S.G. (1977). Insetos de soja no Brasil. Londrina, **EMBRAPA CNPSoja**, 20p (Boletim Técnico, nº 1).
- PARÉ, W.P., TUMLINSON, H.J. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant. Physiol.**, 114:1161-1167.
- PARK, T.K., HOLLAND, M.A., LASKEY, J.G., POLACCO, J.C. (1994). Germination-associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Sci.**, 96:109-117.
- PAZ-ARE, J., PONZ, F., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., LÁZARO, A., HERNANDEZ-LUCAS, C., GARCIA-OLMEDO, F., CARBONERO, P. (1986). Characterization of cDNA clones of the family of trypsin/ α -amylase inhibitors (CM-proteins) in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.**, 71:842-846
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S., RYAN, C.A. (1991). A polipeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science.**, 253: 895-898.
- RACKIS, J.J., SESSA, D.J., HONI, D.H. (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 56:262-271.

- READ, R.J., FUJINAGA, M., SIELECKI, A.R., JAMES, M.N.G. (1983). Structure of the complex of streptomyces griseus protease B and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor at 1.8 Å resolution. **Biochemistry**, 22:4420-4426.
- REDDY, P.S., KUMAR, T.C., REDDY, M.N., SARADA, C., REDDANNA, P. (2000) Differential formation of octadecadienoic acid and octadecatrienoic acid products in control and injured/enfected potato tubers. **Biochim. and Biophys. Acta.**, 1483:294-300.
- REID, J.C., (1975). Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae), in the laboratory 118p. dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA.
- REINBOTHE, C., PARTHIER, B., REINBOTHE, S. (1997). Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. **Planta**, 201:281-287.
- RICKAUER, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. (1992). Regulation of proteinase production in tobacco cells by fungal elicitors and methyl jasmonate. **Plant Physiol. Biochem.**, 30(5):579-584.
- RICKAUER, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., VÉRONÉSI, C., GRIMAL, H., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. (1997). The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. **Planta.**, 202:155-162.
- ROSAHL, S. (1996). Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. **Z. Naturforsch.**, 51:123-128.
- ROUET-MAYER, M., BUREAU, J., LAURIERI, C. (1992). Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiol.**, 98: 971-978.
- RUSTERUCCI, C., MONTILLET, J.L., AGNEL, J.P., BATTISTI, C., ALONSO, B., KNOLL, A., BESSOULE, J.J., ETIENNE, P., SUTY, L., BLEIN, J.P., TRIANTAPHYLIDES, C. (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. **J. Biol. Chem.**, 274:36446-36455.
- RYAN, C.A. (1990). Genes for improving defences against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 28:425-449.
- RYU, S.B., WANG, X. (1995). Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence, **Plant Physiol.**, 108:713-719

- SANTOS, I.C., REIS, W.J.P., MOREIRA, M.A., REZENDE, S.T., ROCHA, V.S., SEDIYAMA, C.S. (1993). Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. **Revista Ceres**, 40:438-444.
- SANZ, L.C., PÉREZ, A.G., OLÍAS, J.M. (1992). La lipoxigenasa en el reino vegetal I. **Propiedades Informacion.**, 43:287-290.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. (1995). Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiol.**, 107:535-543.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. (1996). The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiol.**, 110:287-299.
- SIEDOW, J.N. (1991). Plant lipoxygenase: struture and function. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 42:145-188.
- SILVA, F.B. (1999). Caracterização da “via das lipoxigenases” de folhas de soja submetidas a insetos-pragas. (1999). Viçosa: UFV, 67p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa,
- SIVASANKAR, S., SHELDRIK, B., ROTHSTEIN, S.J. (2000). Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiol.**, 122:1335-1342.
- 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. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, 15:76-85.
- STAHLHUT, R.W., HYMOWITZ, T. (1983). Variation in the low molecular weight proteinases inhibitor of soybeans. **Crop Sci.**, 23:766-769.
- STEPHENSON, L.C., BUNKER, T.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. (1998). Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol.**, 116:923-933.
- TARRAGÓ, M.F.S., SILVEIRA NETO., S., CARVALHO S., BARBIN D., (1977). Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner., e *Rachiplusia nu* (Guen) em Santa Maria-RS. **Anais da sociedade Entomológica do Brasil**, 6(2):180-193.
- TAYLOR, M.A.J., LEE, M.J. (1997). Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides *in vitro*. **Bioch. Biophys. Resear. Communucat.**, 235:606-609.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109B:1-62.

- THOMAS J.C., ADAMS, D.G., KEPPELNE, V.D., WASMANN, C.C., BROWN, J.K., KANOST, M.R., BOHNERT, H.J. (1995). **Plant Physiol. Biochem.**, 33:611-614.
- TOLEDO, J.F.F. (1999). Conferência mundial de pesquisa a soja no Brasil. **Revista Agrosoft 07**. (2000). Disponível em: <<http://www.agrosoft.com/revista/numero7/>>. Acesso em: 11 de maio de 2001.
- TRANBARGER, T.J., FRANCESCHI, V.R., HILDEBRAND, D.F., GRIMES, H.D. (1991). The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **Plant Cell.**, 3:973-987.
- VICK, B., ZIMMERMAN, D.C. (1987). Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. (Eds.) **The Biochem. of Plants**. Orlando: Academic Press, 9:53-97.
- VIEIRA, A.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; JOSÉ, I.C.; PIOVESAN, N.D.; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. (2001). Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plant submitted to wounding. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.**, 13(1):1-12.
- WANG, C., ZIEN, C.A., AFITLHILE, M., WELTI, R., HILDEBRAND, D.F. WANG, X. (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 12:2237-2246.
- WASTERNAK, C., PARTHIER, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Sci.**, 2:302-307.
- WATSON, J.R. (1916). Life-history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **J. Econ. Entomol.**, College Park, 9:521-528
- WIECZOREK, M., OTLEWSKI, J., COOK, J., PARKS, K., LELUK, J., WILIMOWSKA-PELC, A., POLANOSWSKI, A., WILUSZ, T., LASKOWSKI, Jr. M. (1985). The squash family of serine inhibitors. Amino acid summer squash, zucchini, and cucumber seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 126:646-651.
- WILLE, J.E., (1943). **Entomologia Agrícola del Peru**. Lima, Estacion Experimental Agrícola de la Molina. 468p.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D.P.S, SHOEMAKER, R.C. (1996). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology.**, USA: CAB INTERNATIONAL, 165-188.
- YAMAMOTO, H., TANI, T. (1986). Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oat to *Puccinia coronata avenae*. **J. Phytopathol.**, 116:329-337.

ZHUANG, H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A, HILDEBRAND, D.F. (1992). Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. **Plant Physiol.**, 100:80-87.

ZIMMERMAN, D.C., COUDRON, C.A. (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. **Plant Physiol.**, 63:536-541.