

ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA VIA DAS LIPOXIGENASES DE FOLHAS DE SOJA
SUBMETIDAS A FERIMENTO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Mestrado em
Agroquímica, para obtenção do título
de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
MAIO - 1999

ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA VIA DAS LIPOXIGENASES DE FOLHAS DE SOJA
SUBMETIDAS A FERIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroquímica, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

APROVADA: 15 de dezembro de 1998.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof.^a Tânia Toledo de Oliveira

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

A Deus.

Aos meus pais Joaquim Vieira e Maria Imaculada.

Às minhas irmãs, aos meus irmãos e familiares.

Ao meu amigo especial Cilim, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao BIOAGRO - Núcleo de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária, pela oportunidade de treinamento e realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, amizade, dedicação, pelos ensinamentos e pelas sugestões no decorrer da pesquisa.

Aos meus conselheiros, professores Maurílio Alves Moreira e Everaldo Gonçalves Barros, pelo apoio e pelos ensinamentos.

À professora Elizabeth Pacheco Fontes, na qualidade de conselheira, pelo apoio.

Ao professor Sebastião Tavares Rezende, pelas sugestões, pela ajuda e pelo agradável convívio.

À professora Maria Cristina Baracat, pela força, amizade, pelas sugestões e pelo agradável convívio.

A todos os professores do curso, pela amizade e pelo agradável convívio.

Aos estudantes de Iniciação Científica William e Christiano Pires, pela ajuda na realização de várias etapas do trabalho, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Núcleo de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO), em especial ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela colaboração, pela amizade e pelo agradável convívio.

Ao Newton Denis Piovesan, pela ajuda, pelas valiosas sugestões e pelo apoio incondicional na condução dos experimentos em casa de vegetação.

Ao Valdecir, pela ajuda na execução dos trabalhos em casa de vegetação.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho de laboratório: Janai, Rodrigo, Inês, Ritinha, Lucinete, Francine, Giordani, Cristiano, Marcelo e Francis, pela amizade, pelo companheirismo e pela ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Eduardo e Solange, pela atenção e presteza.

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

BIOGRAFIA

ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA, filha de Joaquim Vieira e de Maria Imaculada Soares Vieira, nasceu em 18 de agosto de 1970, em Pará de Minas, Estado de Minas Gerais. Passou sua infância em Florestal-MG, onde cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Serafim Ribeiro do Rezende.

Aos 18 anos de idade, concluiu o curso médio (2º grau) na Escola Estadual Dr. Raimundo Alves Torres, situada na cidade de Viçosa-MG.

Em janeiro de 1990, iniciou o curso de Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Viçosa e o concluiu em julho de 1995.

Em fevereiro de 1996, iniciou a carreira de professora de Química do 2º grau nas Escolas Estaduais de Pará de Minas: Fernando Otávio e Nossa Senhora Auxiliadora. Em outubro do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 1998.

Atualmente, atua como professora de Química e Biologia do 2º grau na Escola Estadual Serafim Ribeiro de Rezende, em Florestal-MG.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
EXTRATO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cinética das lipoxigenases	3
2.2. Lipoxigenases de sementes de soja.....	4
2.3. Caracterização de lipoxigenases de folhas	6
2.4. Funções fisiológicas das lipoxigenases de folhas	7
2.5. Síntese de moléculas regulatórias.....	12
2.6. Resposta a ferimentos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material.....	18
3.1.1. Reagentes.....	18
3.1.2. Equipamentos	18
3.1.3. Materiais genéticos	19
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Ferimento das plantas.....	20
3.2.2. Obtenção de extratos foliares	20
3.2.3. Determinação de proteínas totais no extrato bruto	20

	Página
3.2.4. Métodos analíticos cinéticos	22
3.2.4.1. Medida da atividade de lipoxigenases	22
3.2.4.2. Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico.....	23
3.2.4.3. Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico	24
3.2.4.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases em plantas de soja submetidas a ferimentos foliares	24
3.3. Determinação de inibidores de proteases	24
3.3.1. Preparo do extrato	24
3.3.2. Determinação de inibidores de proteases.....	25
3.4. Determinação de aldeídos totais	25
3.4.1. Determinação de hexanal	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico.....	27
4.2. Efeito da temperatura sobre a taxa de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico.....	32
4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{máx. app}}$..	35
4.4. Níveis de inibidores de proteases.....	46
4.5. Níveis de aldeídos totais e hexanal	48
5. RESUMO E CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE QUADROS

		Página
1	Propriedades bioquímicas das isoenzimas lipoxigenases de soja.....	6
2	Parâmetro cinético, K_M aparente ($K_{M\text{ app}}$) e velocidade máxima aparente ($V_{M\text{ áx. app}}$) das lipoxigenases que atuam em pH 6,0, obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando o programa de computação Enzfitter. Valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{M\text{ áx. app}}$ determinados nas respostas locais (folíolos da segunda folha trifoliolar) e sistêmicas (folíolos da primeira folha trifoliolar) da variedade IAC-100 submetida a ferimento mecânico, coletada após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas.....	44
3	Parâmetro cinético, K_M aparente ($K_{M\text{ app}}$) e velocidade máxima aparente ($V_{M\text{ áx. app}}$) das lipoxigenases que atuam em pH 6,0, obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando o programa de computação Enzfitter. Valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{M\text{ áx. app}}$ determinados nas respostas locais (folíolos da primeira folha trifoliolar) e sistêmicas (folíolos da segunda folha trifoliolar) do genótipo IAC-100 TN submetido a ferimento mecânico, coletado após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas.....	45
4	Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja do genótipo IAC-100 submetidas a ferimento mecânico	47
5	Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a ferimento mecânico.....	47

6	Níveis de hexanal em folhas de soja da variedade IAC-100 submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles	49
7	Níveis de hexanal de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles.....	49
8	Níveis de aldeídos totais em folhas de soja da variedade IAC-100 submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles	50
9	Níveis de aldeídos totais em folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles	50

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Modelo que descreve o comportamento cinético das lipoxigenases.....	4
2	Via das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linoléico.....	11
3	Modelo proposto por FARMER e RYAN (1992) para sinalização, que regula a expressão de genes de inibidores de proteases em folhas de tomate. PK = proteína cinase. ...	14
4	Via de sinalização dos octadecanóides, atuando na expressão de genes de defesa em tomates.	17
5	Folha ferida nas nervuras centrais e secundárias.	21
6	Planta ferida na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento.....	21

- 7 Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas feridas e -o- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta local): 1,58 mg/mL; folhas de plantas-controle: 1,82 mg/mL. 28
- 8 Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas feridas e -o- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/ fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto:1 µL. Concentração de proteína total (resposta sistêmica) - 1,58 mg/mL; controles: 1,82 mg/mL. . 29
- 9 Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas feridas e -o- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto:1,0 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta local): 1,72 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,70 mg/mL. 30

- 10 Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas do genótipo IAC 100 TN. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas feridas e -o- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódico pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total (resposta sistêmica) - 1,71 mg/mL; controles: 1,81 mg/mL. . 31
- 11 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 4,5. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 0,63 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,09 mg/mL..... 33
- 12 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 4,5. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,32 mg/mL. 34
- 13 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 6,0. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,13 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,09 mg/mL..... 36

- 14 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 6,0. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta sistêmica) - 0,85 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,16 mg/ml 37

- 15 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 6,0. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,32 mg/mL. 38

- 16 Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 4,5. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) e -o- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta sistêmica) - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,33 mg/mL. 39

- 17 Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,14 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_M app e $V_{m\acute{a}x}$ app. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk. ($r = 0,9623$). 40

- 18 Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidropéroxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,09 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de $k_{m\ app}$ e $V_{máx\ app}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9480$). 41
- 19 Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidropéroxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja controles da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Controle (folíolos da primeira folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1,0 µL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,14 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_{Mapp} , V_{app} e $V_{máx\ app}$. Os pontos são experimentais. inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9841$)..... 42
- 20 Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidropéroxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Controle (folíolos da segunda folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,07 mg/mL. 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. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9810$)..... 43

EXTRATO

VIEIRA, Angélica Aparecida, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 1999. **Caracterização da via das lipoxigenases de folhas de soja submetidas a ferimento**. Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira, Everaldo Gonçalves Barros e Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

No presente trabalho foi avaliada a capacidade da planta de soja de responder ao ferimento mecânico através da via das lipoxigenases. Para isso, foi analisado o efeito do ferimento mecânico em folhas de soja sobre a atividade do “pool” de lipoxigenases (LOXs) e os possíveis produtos finais da via. Foram utilizados dois genótipos: um normal (variedade IAC-100) e outro com ausência de LOXs em suas sementes (linhagem IAC-100 TN). Folhas de plantas de soja dos dois genótipos foram submetidas a ferimento mecânico e coletadas 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas após o ferimento. Foram analisadas a resposta local e a resposta sistêmica. Os resultados do estudo bioquímico e cinético das LOXs de folhas de soja dos genótipos revelaram dois picos mais acentuados de atividade de LOXs a pH 4,5 e 6,0, tanto na resposta local quanto na sistêmica. O valor da temperatura ótima das isoenzimas de LOXs a pH 6,0 foi a 25 °C; valores de K_M aparente na resposta local e na sistêmica aumentaram consideravelmente seis horas após o ferimento e diminuíram a

partir de 12 horas, tendo em 168 horas o menor valor. O menor valor de K_{Mapp} em 168 horas sugere uma alteração do “pool” de LOXs em resposta ao ferimento nos dois genótipos analisados. Estes resultados indicam que a remoção genética das LOXs de semente de soja não está interferindo na expressão dos genes que codificam para as LOXs que atuam no mecanismo de defesa da planta de soja contra danos causados por ferimento. Os resultados do estudo dos produtos da via das lipoxigenases revelaram que nos dois genótipos ocorreu aumento de inibição trípica após ferimento na resposta local e na sistêmica. Os valores em mg de tripsina inibida de proteína foram maiores em 6, 12, 24, 48 e 168 horas. Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que em folhas de soja ocorre aumento da produção de inibidores de proteases em resposta a ferimento. Em ambos os genótipos estudados ocorreu ligeiro aumento dos níveis de hexanal em 48 e 168 horas e de aldeídos totais em 168 horas após tratamento. Neste estudo, os resultados mostraram que ocorreu aumento da atividade de lipoxigenases e de inibidores de proteases nas plantas de soja submetidas a ferimento. A remoção genética de LOXs da semente de soja no genótipo IAC 100 TN não interferiu na defesa da planta, pela via das lipoxigenases, em resposta ao ferimento mecânico.

ABSTRACT

VIEIRA, Angélica Aparecida, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 1999.
Characterization of the lipoxygenase pathway of soybean leaves submitted to wounding. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Committee Members: Maurílio Alves Moreira, Everaldo Gonçalves Barros and Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

In the present work the capacity of the soybean plant was evaluated to response to the mechanical wound through the pathway of the lipoxygenases. For that the effect of the mechanical wound was analyzed in soybean leaves about the activity of the " lipoxygenases pool " (LOXs) and the possible end products of the pathway. Was used: a normal genotype (variety IAC-100) and another with absence of LOXs in its seeds (lineage IAC-100 TN). Leaves of plants of soybean genotypes were submitted to mechanical and collected 0, 6, 12, 24, 48 and 168 hours, after the wound. The local response and response systemic were analyzed. The results of the biochemical and kinetic study of LOXs of leaves of soybean of the two genotypes revealed: two accentuated picks of activity of LOXs the pH 4,5 and 6,0, so much in the local response as in the systemic. The value of the great temperature of the enzymes of LOXs the pH 6,0 went for 25 °C, values of apparent K_M in the local response and systemic increased considerably 6 hours after the wound and it decreased starting from

12 hours, tends in 168 hours the smallest value. The smallest value of K_{Mapp} in 168 hours suggests an alteration of the " pool " of LOXs in response to the wound in the two analyzed genotypes. These results indicate that the genetic removal of LOXs of soy seed is not interfering in the expression of the enzymes that act in the defense mechanism of the soybean plant to damages caused by wound. The results of the study of the products of the road of the lipoxygenases revealed that in the two genotypes happened increase of inhibition tryptic after wound in the local answer and systemic. The values in mg of inhibited trypsin of protein were larger in 6, 12, 24, 48 and 168 hours. Our results reinforce the hypothesis that in soybean leaves happens increase of the production of proteinases inhibitors in response to wound. In both studied genotypes it happened a slight increase of the levels of hexanal 48 and 168 hours and of total aldehydes in 168 hours after treatment. Our results showed that happened increase of the lipoxygenases activity and of proteinases inhibitors in the soybean plants submitted to wound. The genetic elimination of LOXs of the soybean seed didn't affect in the defense of the plant, for the pathway of the lipoxygenases, in response to the mechanical wound.

1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidorreductase, E.C. 1.13.11.12), pertencentes à classe das oxirredutases, são dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular a moléculas de ácidos polinsaturados contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno. Este sistema ocorre comumente nos ácidos graxos di e triinsaturados, como o ácido linoléico e o ácido linolênico, os quais são os principais substratos para 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 lipídeos de membrana dos cloroplastos. O ácido linoléico é encontrado em maior concentração em sementes e embriões (HILDEBRAND et al., 1988).

As lipoxigenases (LOXs) são amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em plantas e animais superiores (HATANAKA et al., 1982; MACK et al., 1987), bem como em fungos e leveduras (HILDEBRAND, 1989). Os níveis de expressão variam enormemente entre diferentes tecidos (HILDEBRAND et al., 1988). As atividades de LOXs em soja variam também entre os diferentes estádios de desenvolvimento da planta (SIEDOW, 1991).

Em grãos de soja, os produtos derivados da oxidação de lipídeos catalisada pelas LOXs constituem um problema na indústria de alimentos, por serem responsáveis pela redução da aceitabilidade da soja pelo consumidor. A eliminação genética das LOXs no grão é a melhor alternativa para solucionar este problema. Entretanto, esta alternativa só é viável se não afetar a

sobrevivência da planta, uma vez que as LOXs participam de vários processos fisiológicos (SIEDOW, 1991). No caso da soja, existe ainda pouca informação sobre o papel dessas enzimas na fisiologia da planta. A disponibilidade de genótipos com ausência completa de LOXs, em suas sementes, oferece uma oportunidade ímpar para estudos que visem elucidar o papel da via das LOXs em plantas de soja. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ferimento na via das LOXs em genótipos com e sem LOXs, para inferir o papel fisiológico de LOXs, 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.

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização bioquímica e cinética do “pool” de lipoxigenases de folhas de plantas de soja submetidas a ferimento mecânico, na variedade comercial IAC-100 e em uma linhagem dela derivada por retrocruzamentos, com ausência completa de lipoxigenases em suas sementes (IAC-100 TN).

Foram os seguintes os objetivos específicos deste estudo:

- Construir uma curva de tempo (A_{234} versus tempo) e determinar um intervalo de tempo linear para as análises de atividade de lipoxigenases.
- Verificar o efeito de pH sobre a taxa de oxidação do ácido linoléico, catalisada pela lipoxigenase.
- Verificar o efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação do ácido linoléico, catalisada pela lipoxigenase.
- Determinar os parâmetros cinéticos K_M aparente e $V_{máx.}$ aparente das lipoxigenases nas respostas local e sistêmica de folhas de plantas de soja submetidas a ferimento.
- Verificar se há aumento da atividade das lipoxigenases nas respostas local e sistêmica de folhas de plantas submetidas a ferimento.
- Avaliar a indução da produção de inibidores de proteases e aldeídos, como resposta da planta a ferimento.

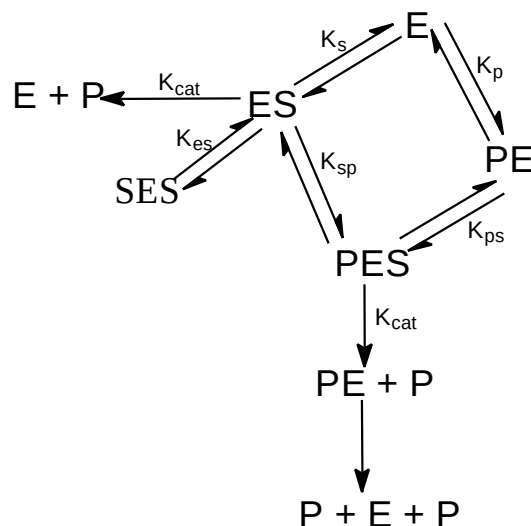
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cinética das lipoxigenases

O mecanismo da reação de LOX foi mais extensivamente estudado utilizando LOX 1 de soja, e estima-se que o comportamento de LOX 2 e LOX 3 seja similar (GARDNER et al., 1991; SIEDOW, 1991). O cofator da reação é o íon Fe^{+2} associado à forma inativa da enzima e o Fe^{+3} associado à forma ativa (SHILSTRA et al., 1993).

Um modelo para descrever o comportamento cinético das LOXs foi proposto por LAGOKI et al. (1976). Este modelo mostra a ligação simultânea de duas moléculas ligantes à enzima, evidenciando assim a existência de dois sítios: um catalítico e outro secundário. No sítio secundário ocorre a acomodação do produto ou de seu derivado, requisito básico para a reação ocorrer quando a enzima se encontra na forma Fe^{+2} . Por outro lado, quando o substrato se liga ao sítio secundário, a ação enzimática é impedida, logo, ele não é transformado em produto. Por meio do esquema mostrado na Figura 1, podem-se visualizar dois complexos: E – S e P - E - S, por meio dos quais a enzima transforma quimicamente o substrato em produto.

TAPPEL (1962) verificou que LOX 1 de semente de soja, a pH 7,0, em presença de baixas concentrações de substrato, obedece à cinética de Michaelis-Menten, o que está em concordância com a hipótese descrita por LAGOKI et al. (1976). A função do hidroperóxido, no sítio secundário, é a de



Fonte: LAGOKI et al. (1976).

Figura 1 - Modelo que descreve o comportamento cinético das lipoxigenases.

transformar a forma inativa da enzima (LOX-Fe^{+2}) na forma ativa (LOX-Fe^{+3}). Na sua ausência, observa-se um período de indução na reação aeróbica. Portanto, uma das características da reação enzimática das LOXs é o período inicial de indução (SANZ et al., 1992). Este período foi verificado também por SCHILSTRA et al. (1993), que avaliaram o efeito da redistribuição transitória da enzima nas formas Fe^{+2} e Fe^{+3} durante o processo da reação e demonstraram que a duração do período de indução é inversamente proporcional à concentração da enzima. Além disso, SMITH e LANDS (1972) mostraram que a reação aeróbica está sujeita à inibição por excesso de substrato e que tal inibição foi mais pronunciada em concentrações baixas de oxigênio.

2.2. Lipoxigenases de sementes de soja

A semente de soja é uma fonte rica em isoenzimas de LOX e, por isso, tem sido o material biológico mais utilizado para os estudos enzimáticos dessa enzima. Atualmente, pesquisas revelaram que sementes de soja apresentam três isoenzimas distintas, denominadas LOX 1, 2, 3 (AXELROD et al., 1981).

As três LOXs de semente de soja podem ser agrupadas em dois tipos: I e II. A tipo I inclui a isoenzima LOX 1, assim denominada em razão de seu pH de ação alcalino, sendo seu pH ótimo em torno de 9,5. A tipo II inclui as duas restantes, denominadas acídicas, com pH ótimo entre 5,8 e 6,2 (GALLIARD e CHAN, 1980). As três isoenzimas apresentam um átomo de ferro não-hêmico por molécula de enzima e uma grande similaridade na composição de aminoácidos. LOX 1 apresenta 838 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 94.038; LOX 2, 865 resíduos com peso molecular de 97.035; e LOX 3, 859 resíduos com peso molecular de 96.541. Além disso, apresentam de 4 a 7 resíduos de cisteína, 13 resíduos de triptofano e 6 resíduos de histidina, dos quais 4 deles mantêm o átomo de ferro ligado ao centro ativo da enzima, sendo importantes na catálise enzimática (SHIBATA et al., 1987).

LOXs 1 e 2 foram originalmente separadas de LOX 3 com base em seus diferentes pontos isoelétricos, sendo eles em pH 5,68; 6,25; e 6,15 (CHRISTOPHER et al., 1972). As três isoenzimas são proteínas globulares, cada uma constituída de um único polipeptídeo (AXELROD et al., 1981).

As três LOXs de semente de soja catalisam a hidroxidação de vários substratos, incluindo ácido linoléico, álcool linolil, hidroxamatos, metil linoleato, óleos de sementes fracionados e mono e dilinoleínas (ESKIN et al., 1977). LOX 1 é a mais reativa ao ácido linoléico, ao passo que LOXs 2 e 3 apresentam maior afinidade por metil linoleato (AXELROD et al., 1981). A hidroxidação do ácido linoléico catalisada por LOX 2 levou à formação do 13- e 9-hidroperóxido linoléico em igual proporção; LOX 3 produziu os dois hidroperóxidos na proporção de 35:65, respectivamente. LOX-1 dá como produto quase que exclusivamente o 13-hidroperóxido linoléico na proporção 95:5 (AXELROD et al., 1981).

LOX 1 pode também catalisar reações secundárias e ter como produtos hidroperóxidos e cetodienos na ausência de oxigênio; por outro lado, a LOX 3 catalisa reações secundárias e forma cetodienos até mesmo em presença de oxigênio. Já a LOX 2 não catalisa a formação de produtos secundários, não produzindo cetodienos (GALLIARD e CHAN, 1980).

A maioria das LOXs é inibida por agentes antioxidantes ou substâncias análogas e alguns agentes quelantes, como 4-nitrocatecol e compostos

o-fenólicos, por interagirem com o grupo prostético, ou seja, o ferro não-hêmico da enzima (SANZ et al., 1992).

SHIBATA et al. (1987) estudaram a estrutura da LOX 1 de soja por meio de espectroscopia de massa e difração de raio-X e concluíram que a LOX 1 possui uma estrutura constituída de dois domínios: um apresenta uma conformação β -cilíndrica associada a uma α -hélice e o outro oito conformações em β -pregueada associada a 22 em α -hélice.

As principais propriedades bioquímicas das isoenzimas lipoxigenases de soja estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1- Propriedades bioquímicas das isoenzimas lipoxigenases de soja

Parâmetros	Isoenzimas		
	LOX 1	LOX 2	LOX 3
Peso molecular	94.038	97.053	96.857
Ponto isoelétrico	5,68	6,25	6,15
pH (ótimo)	9,5	6,5	5,0 - 9,0
Produto formado	*13-HPO:** 9-HPO 95:5	13-HPO: 9-HPO 50:50	9-HPO:13-HPO 65:35
Estabilidade	alta	baixa	média
Especificidade pelo substrato	ácidos graxos ionizados	ácidos graxos não-ionizados	ácidos graxos não- ionizados

* 13-HPO: 13- hidroperóxido linoléico.

** 9-HPO: 9-hidroperóxido linoléico.

2.3. Caracterização de lipoxigenases de folhas

As LOXs de semente de soja têm sido extensivamente estudadas, ao passo que as LOXs de folhas vêm sendo pouco pesquisadas. As LOXs de folhas desempenham diversas funções na fisiologia da planta, e pouco se conhece da relação estrutura/função dessas isoenzimas (GRAYBURN et al., 1991).

Estima-se que haja de 10 a 12 genes para lipoxigenases de soja. LOXs 1, 2, 3 de sementes de soja tiveram seus genes seqüenciados por

SHIBATA et al. (1987). KATO et al. (1993) mostraram que a expressão do gene para LOX 4 é aumentada em folhas de soja após a remoção dos primórdios florais. BUNKER et al. (1995) observaram aumento na expressão dos genes de LOXs 5 e 6 em folhas de soja após a remoção da vagem. Mais recentemente, SARAVITZ e SIEDOW (1996) identificaram dois genes de LOXs 7 e 8 que tiveram sua expressão aumentada em folhas de soja submetidas a ferimento.

Embora a expressão de LOX 7 e LOX 8 seja aumentada após o ferimento e após a aplicação de metil jasmonato, ela também aparece em níveis elevados em folhas jovens, flores e tecidos embrionários imaturos. É possível que a LOX 7 e a LOX 8 desempenhem papéis fisiológicos importantes, estando presentes em todos os estádios de desenvolvimento da planta e sempre servindo como fase inicial no mecanismo de defesa desta (SARAVITZ e SIEDOW, 1996).

KLAUER et al. (1991) investigaram o envolvimento das LOXs durante a fase de crescimento vegetativo e verificaram o acúmulo de um polipeptídeo de aproximadamente 94 kDa no vacúolo de células do tecido do mesófilo paraveinal de folhas de plantas de soja. Esse polipeptídeo faz parte das proteínas de reserva vegetativa, que se acumulam durante o crescimento vegetativo normal e, com o desenvolvimento da vagem, são rapidamente degradadas, aumentando o “pool” de aminoácidos disponíveis para os estádios iniciais do enchimento do grão. Logo, sugere-se que LOXs de plantas sejam proteínas bifuncionais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos e também de auxiliar no armazenamento temporário de nitrogênio durante o crescimento vegetativo.

2.4. Funções fisiológicas das lipoxigenases de folhas

Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de esclarecer o papel das LOXs na fisiologia da planta. As LOXs têm sido estudadas em plantas de soja (AXELROD et al., 1981; PETERMAN e SIEDOW, 1985; PARK e POLACCO, 1989; GRAYBURN et al., 1991; SARAVITZ e SIEDOW, 1995 e 1996), trigo (MAUCH et al., 1997; BOHLAND et al., 1997), cevada (REINBOTHE et al., 1997), tabaco (RICKAUEAR et al., 1997), tomate

(FARMER e RYAN, 1992), batata (GEERTS et al., 1994), chá preto (MAHANTA et al., 1995), dentre outras.

HILDEBRAND (1989) e SIEDOW (1991), citando vários autores, descreveram o envolvimento das lipoxigenases vegetais em quatro áreas principais da fisiologia da planta : crescimento e desenvolvimento; senescência; resposta a ferimentos e proteção contra danos causados por insetos-praga e patógenos; e biossíntese de moléculas regulatórias, além de elas fazerem parte das proteínas de reserva vegetativa da soja (TRANBARGER et al., 1991).

O nível de expressão de LOX pode ser regulado por vários compostos, como: ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico e seus metil jasmonatos, os quais induzem a expressão de genes de LOX em soja (BELL e MULLET, 1991; ANDERSON et al., 1989; GRIMES et al., 1992), *Arabidopsis thaliana* (MELAN et al., 1993), batata (FIDANTSET et al., 1993; GEERTS et al., 1994), cevada (FEUSSNER et al., 1995) e arroz (SCHWEIZER et al., 1997). Além disso, outros fatores, como ferimento (HILDEBRAND et al., 1989) e patógenos (YAMAMOTO e TANI, 1986; OCAMPO et al., 1986; OHTA et al., 1991; ROJAS et al., 1993), também aumentaram o nível de expressão de LOX.

STEPHENSON et al. (1998) estudaram a relação entre os genes de LOXs e a localização subcelular de proteínas de reserva vegetativa em folhas de plantas de soja e sugeriram a existência de uma função diferencial específica para os genes que codificam LOX. Os genes designados **vlxa** e **vlxb** codificariam as LOXs ativas durante os estádios vegetativos e reprodutivos da planta; os genes **vlxc** e **vlxd** codificariam as LOXs inativas que atuam como proteína de reserva vegetativa; e o gene **vlxe** codificaria as LOXs que são expressas e aumentam a atividade em resposta ao ferimento.

LOXs têm sido detectadas em grande número de plantas (SIEDOW, 1991). Embora as isoformas ocorram em várias células da planta, o tecido específico expressando alto nível de LOX na planta pode variar bastante, dependendo do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais. Normalmente, em tecidos mais novos e em crescimento, como raízes, cotilédones, hipocótilos, folhas, flores e sementes, a sua atividade enzimática pode variar amplamente (PINSKY et al., 1971).

Estudos para determinar a localização subcelular de LOXs revelaram a presença de isoformas predominantemente no citosol (SIEDOW, 1991;

STEPHENSON et al., 1998), mas também em cloroplastos de células de plantas de soja (DOUILLIARD e BERGEROM, 1981; FEUSSNER et al., 1995), núcleo (FEUSSNER et al., 1995), corpos lipídicos (FEUSSNER e KINDL, 1992) e associadas à membrana microssomal e plasmática (DROILLARD et al., 1993; MACRÍ et al., 1994; NELLEN et al., 1995) e a vacúolos de células de tecidos do mesófilo paraveinal (TRANBARGER et al., 1991; STEPHENSON et al., 1998). LOX também foi encontrada em mitocôndrias e citoplasma de células de plantas de alfafa (GROSSMAN et al., 1972). VERNOOY-GERRITSEN et al.(1984) estudaram a atividade de LOX em soja, durante a germinação e o desenvolvimento da planta, e verificaram a presença de LOX em citoplasma e vacúolos de células jovens do parênquima e de células epidermais dos cotilédones. Em raízes, LOX tem sido encontrada associada a vacúolos (WARDALE e GALLIARD, 1977).

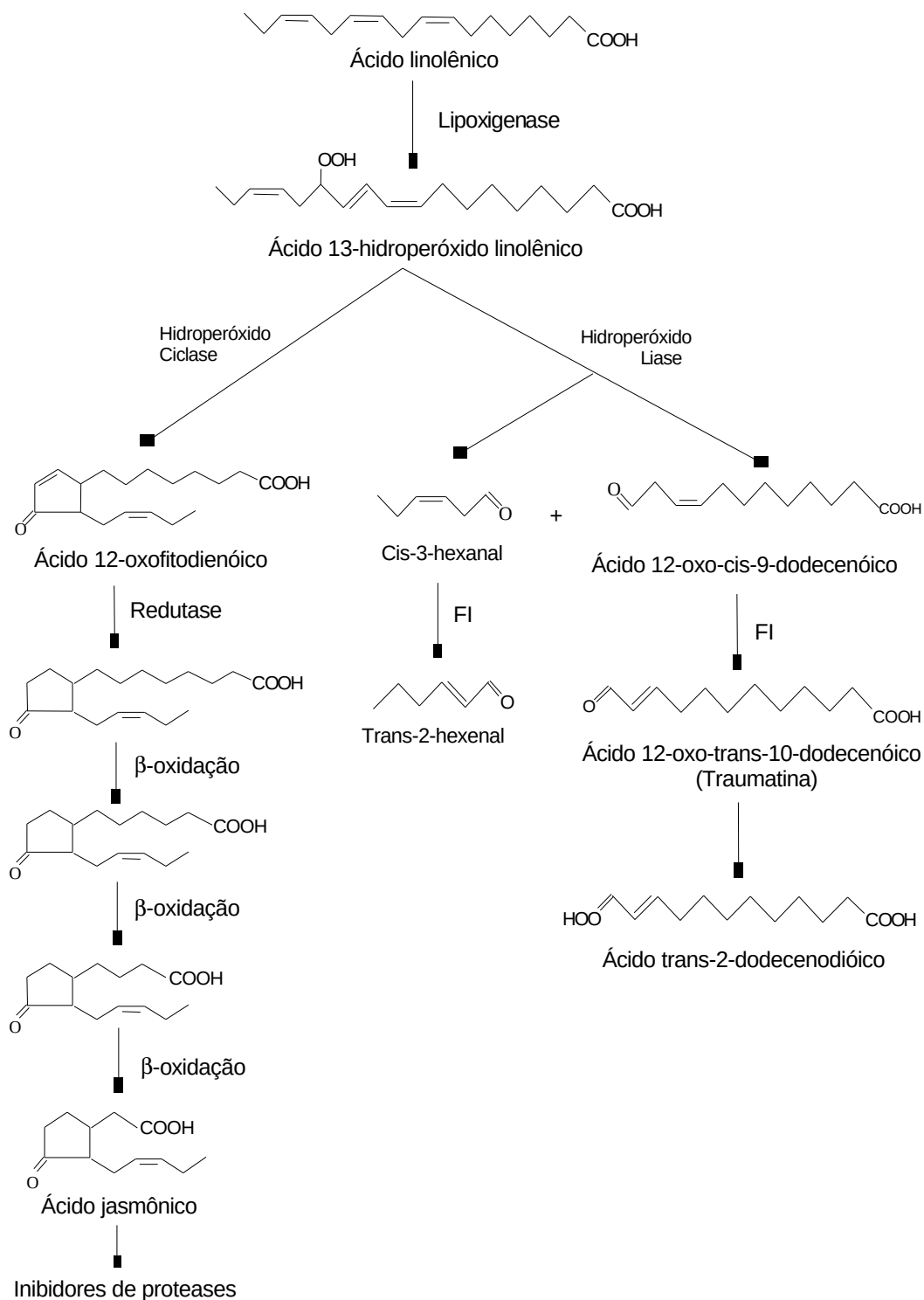
A expressão de LOXs pode ser estimulada em tecidos de plantas que sofreram infecção por patógeno ou que são expostas a pragas. Lipídeos de células danificadas podem ser oxidados pelas LOXs para formar hidroperóxidos de ácidos graxos, os quais são rapidamente degradados para formar vários produtos, incluindo aldeídos. Compostos como o 2-hexanal, 3-hexanal e 2-nonenal exercem efeito inibitório sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos (VAUGHN e GARDNER, 1993). Assim, estes aldeídos podem ter um papel importante na resistência de plantas a doenças. Na Figura 2 está apresentada parte das reações em cascata da via das LOXs, em que é formado o cis-3-hexenal.

Altas atividades de LOXs são observadas quando ocorrem danos físicos às células, levando à produção de hidroperóxidos de ácidos graxos e de radicais livres, que ajudam a estimular a ruptura de membranas celulares, levando a célula à morte. Quando tecidos de plantas são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos, o que resulta na formação de aldeídos voláteis de seis e nove carbonos. A degradação inicia-se quando os ácidos graxos insaturados, ácidos linoléico e linolênico, são dioxigenados pelas LOXs em hidroperóxidos, que são então clivados pela hidroperóxido liase, formando aldeídos (GARDNER, 1991; ZHUANG et al., 1992). Os aldeídos de seis carbonos, hexanal, cis-3-hexenal e trans-2-hexenal, são importantes componentes do aroma de folhas verdes, e

os aldeídos de nove carbonos, cis-3-nonenal, cis-6-nonadienal e outros, são encontrados em frutos (HATANAKA et al., 1982).

Os produtos da ação das LOXs podem também atuar como agentes tóxicos à invasão de patógenos (HILDEBRAND et al., 1988). Diversos aldeídos insaturados e voláteis, produzidos via LOX a partir de ácidos graxos polinsaturados, foram testados por VAUGHN e GARDNER (1993), com o objetivo de verificar o seu efeito no crescimento de isolados dos fungos *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Dentre os aldeídos testados estavam o 2-hexenal, 2-nonenal, 3-nonenal e 4-hidroxi-2-nonenal, os quais podem sair dos locais onde foram produzidos, alcançando alvos extracelulares (ESTERBAUER et al., 1991). VAUGHN e GARDNER (1993) observaram que os aldeídos foram capazes de inibir o crescimento de fungos quando presentes no meio de cultura. Os fungos *R. solani* e *S. rolfsii* mostraram-se menos resistentes a estes aldeídos do que o *C. truncatum*. O aldeído trans-2-hexenal foi avaliado em vários experimentos e foi capaz de inibir o crescimento de fungos, insetos e protozoários. O mecanismo de atividade antimicrobiana desse composto não é conhecido. CROFT et al. (1993) relataram que bactérias tratadas com este aldeído apresentam precipitação do DNA e lise de algumas células. A Figura 2 mostra uma parte das reações em cascata da via das lipoxigenases, em que é formado o trans-2-hexenal (CROFT et al., 1993).

As plantas respondem ao ferimento por meio de um variado mecanismo de defesa, incluindo fortificação da parede celular, aumento da expressão de genes de defesa, síntese de moléculas antimicrobianas, bem como a iniciação de processos que levam à cicatrização (ROSAHL, 1996). Quando o inseto se alimenta de planta, ele provoca danos e, em resposta a esse dano, a planta produz níveis elevados de compostos voláteis, os quais podem servir como sinais químicos que atraem os inimigos naturais do inseto. São produzidos terpenos acíclicos, bem como chiquimatos, butiratos e compostos voláteis como o 3-hexenal, produzidos pela via das LOXs, quando folhas são danificadas (PARÉ e TUMLINSON, 1997).



Fontes: CROFT et al. (1993) e CREELMAN e MULLET. (1997). LOX, lipoxigenase; FI, fator de isomerização.

Figura 2 - Via das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolêico.

2.5. Síntese de moléculas regulatórias

As LOXs estão envolvidas na síntese de moléculas regulatórias. Os hidroperóxidos de ácidos graxos, produtos primários da reação enzimática, são moléculas reativas capazes de afetar a integridade de sistemas biológicos. Estes hidroperóxidos podem ser metabolizados em plantas superiores por meio de um complexo mecanismo e dá origem a dois compostos: ácido traumático e ácido jasmônico, de acordo com a Figura 2.

Esses dois compostos estão envolvidos na resposta da planta a ferimentos. O ácido traumático é conhecido como hormônio do ferimento e o ácido jasmônico é um potente indutor de inibidores de proteases quando plantas são injuriadas (MUELLER, 1997), além de ser indutor da expressão gênica de LOXs em folhas primárias, hipocótilos e cotilédones (GRIMES et al., 1992).

Os níveis e as funções do ácido jasmônico variam nas plantas não somente nas células dos diferentes tipos tecidos, mas também nos diferentes estádios de desenvolvimento e em resposta a diferentes estímulos ambientais (CREELMAN e MULLET, 1997). Os níveis de ácido jasmônico em semente de soja é baixo, mas ele é encontrado em altos níveis em folhas, células de tecidos jovens de raízes, flores e frutos em crescimento (CREELMAN e MULLET, 1995). RICKAUEAR et al. (1997) investigaram a função do ácido jasmônico no sistema de defesa de plantas de tabaco, utilizando culturas de células de tabaco tratadas com o patógeno *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, e constataram que este induziu atividade de LOXs e um rápido aumento nos níveis de ácido jasmônico.

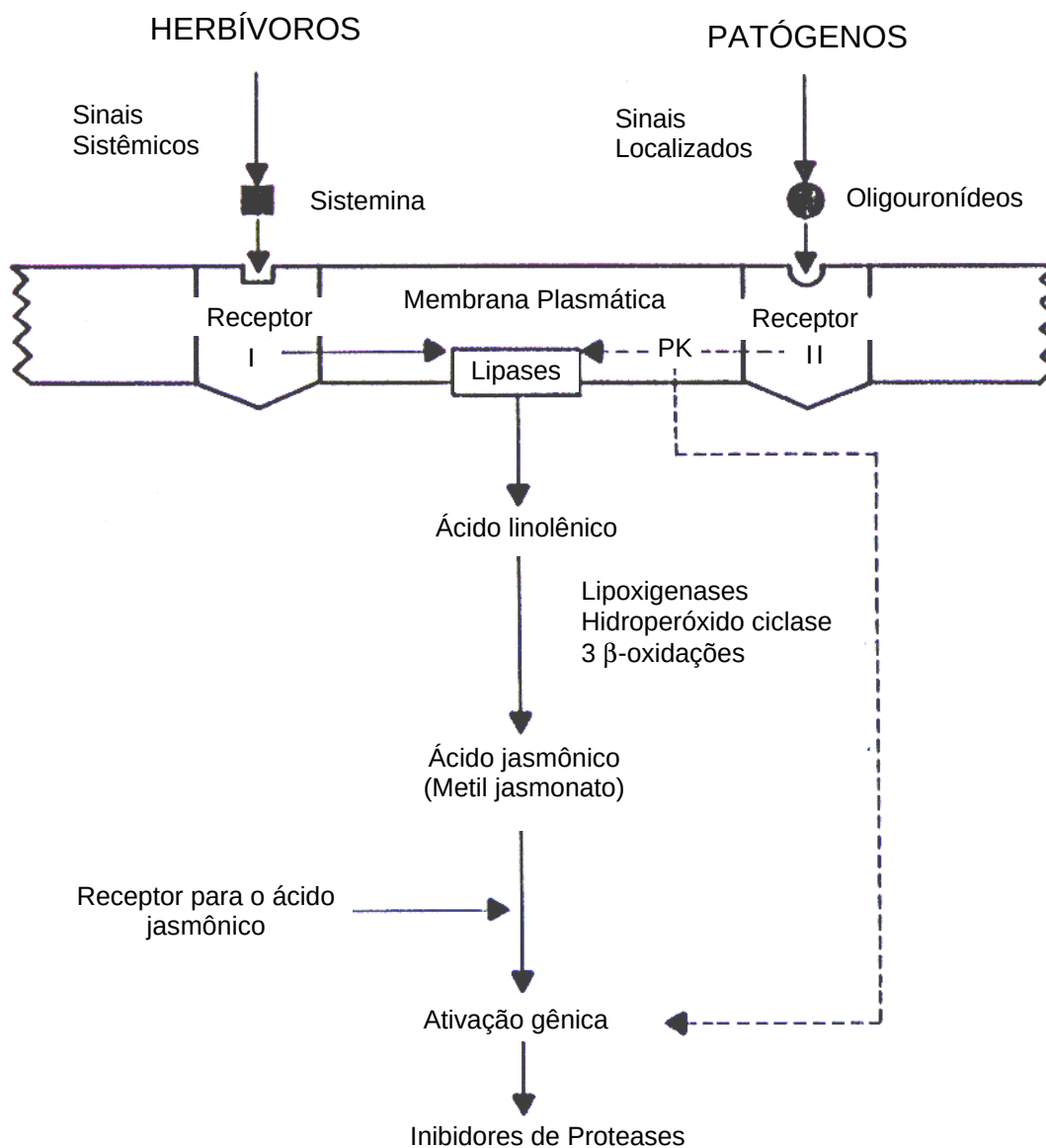
FARMER e RYAN (1992) postularam que o ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa (inibidores de proteases). Segundo FARMER e RYAN (1992), quando a planta é ferida por insetos, é produzido um sinal sistêmico: sistemina (um peptídeo constituído de oito resíduos de aminoácidos); ou quando a planta é ferida por um patógeno, é produzida uma molécula-sinal: oligouronídeo (polissacarídeo presente na parede celular de plantas, liberado pela ação de patógenos). Entretanto, RICKAUEAR et al. (1992) verificaram que oligogalacturonídeos e quitosan (polissacarídeos liberados da parede celular de

fungos) também atuam como moléculas-sinais. Tanto a sistemina quanto o oligouronídeo possuem um receptor específico, localizado na membrana plasmática. Quando a sistemina se liga ao receptor I ou quando o oligouronídeo se liga ao receptor II, ocorre a ativação de uma lipase localizada na membrana plasmática; esta libera ácido linolênico da membrana para o citosol e então ocorre ação enzimática das LOXs, sendo o ácido linolênico convertido em ácido 13-hidroperóxido linolênico. O ácido 13-hidroperóxido linolênico formado é convertido em ácido jasmônico por ação enzimática de uma desidratase, uma redutase e três ciclos de β -oxidações. Em seguida, o ácido jasmônico e uma proteína cinase (requerida para a ativação) ligam-se a um receptor, ativando a expressão de genes de inibidores de proteases. O mecanismo de ligação do ácido jasmônico ao receptor para a ativação gênica não é conhecido (FARMER e RYAN, 1992). A Figura 3 mostra a representação do modelo de sinalização proposto por FARMER e RYAN (1992).

2.6. Resposta a ferimentos

O aumento na expressão de genes de LOXs 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; PAUTOT et al., 1991), baixos níveis de água (BELL e MULLET, 1991) e ferimentos mecânicos (HILDEBRAND et al., 1989; GEERTS et al., 1994; SARAVITZ e SIEDOW, 1996). Embora haja aumento da expressão de genes de LOXs associado ao estresse, a sua função fisiológica não está bem estabelecida. Várias propostas têm sido feitas, incluindo a degradação da membrana durante a resposta de hipersensibilidade (CROFT et al., 1993), a produção de derivados de ácidos graxos e moléculas antimicrobianas (CROFT et al., 1993) e a síntese de substâncias que regulam o crescimento e que estão associadas ao estresse, como ABA (CREELMAN et al., 1992) e ácido jasmônico (FARMER e RYAN, 1992).

SARAVITZ e SIEDOW (1996) sugeriram ainda a existência de no mínimo dois genes de LOX que codificam LOX 7 e LOX 8, presentes em folhas não-feridas, e que têm a sua transcrição aumentada oito horas após o



Fonte: FARMER e RYAN (1992).

Figura 3 - Modelo proposto por FARMER e RYAN (1992) para sinalização, que regula a expressão de genes de inibidores de proteases em folhas de tomate. PK = proteína cinase.

ferimento. O gene que codifica LOX 8 apresenta resposta local, enquanto o gene que codifica LOX 7 apresenta resposta sistêmica. Segundo SARAVITZ e SIEDOW (1996), ainda é não é claro o papel das LOXs no sistema de defesa das plantas, devido à existência de uma complexa via de transdução de sinais, da qual as lipoxigenases fazem parte.

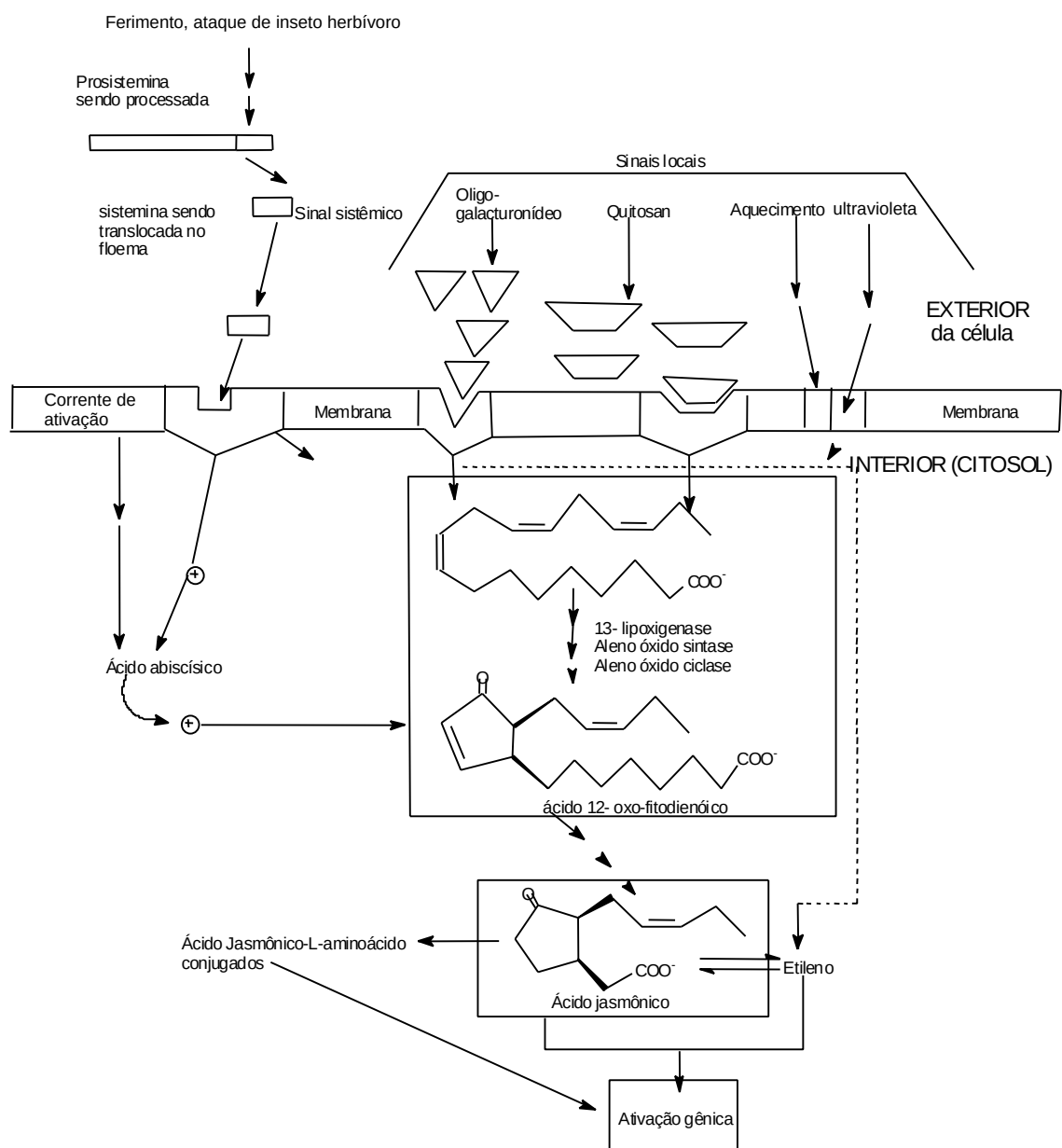
Vários experimentos têm sido realizados para verificar o aumento da expressão de genes de inibidores de proteases, como a aplicação de ácido jasmônico (REINBOTHE et al., 1997) após ferimento e inoculação com patógenos em plantas de tomate e batata (PEÑA-CORTÉS et al., 1989), folhas de trigo (BOHLAND et al., 1997) e suspensões de células de tabaco (RICKAUEAR et al., 1997). Têm sido estudados intensivamente os efeitos dos ácidos jasmônico e abscísico, os quais são componentes importantes da resposta da planta a ferimentos. Estes são fito-hormônios que provocam o aumento da expressão de genes induzidos por ferimento, quando são aplicados nas partes externas da planta ou quando esta é ferida (HILDEBRAND et al., 1992; REINBOTHE et al., 1997; DAMMANN et al., 1997). DAMMANN et al. (1997) estudaram a expressão diferencial de genes de inibidores de proteases, catepsina D, leucina aminopeptidase e de treonina deaminase em raízes e folhas de batata tratadas com ácidos abscísico e jasmônico e submetidas a ferimento. Verificaram que após o ferimento mecânico, nas raízes e nos tecidos de folhas de batata, ocorre aumento de ácido jasmônico endógeno e subsequente ativação e aumento da expressão destes genes em diferentes partes da planta. Esses autores sugeriram ainda a existência de uma complexa via de transdução de sinais específica, presente em cada órgão da planta que regula os efeitos desses fito-hormônios. Segundo DAMMANN et al. (1997), é preciso esclarecer a função bioquímica e fisiológica das isoenzimas de lipoxigenases, uma vez que o ácido abscísico e o jasmônico são produzidos pela via das LOXs, quando a planta é submetida a estresses como ferimento, ataque de insetos e pragas, excesso de sais e baixos níveis de água; logo, as isoenzimas de LOXs estão relacionadas com o aumento da expressão diferencial de genes induzidos por ferimento que atuam no sistema de defesa da planta.

GIRI et al. (1998) identificaram sete isoformas de inibidores de proteases em grão-de-bico e descreveram o acúmulo diferencial destes

inibidores durante o desenvolvimento de sementes, bem como a indução e o aumento da atividade destas isoformas em sementes imaturas após o ataque de larvas de *Helicoverpa armigera*, uma praga que destrói plantações dessa leguminosa. No entanto, estas isoformas de inibidores foram inativadas por proteases do intestino das larvas. Alguns inibidores de proteases são constitutivamente expressos em altos níveis em sementes e órgãos de reserva, ao passo que outros são induzidos nas folhas, em resposta ao ferimento (GIRI et al., 1998).

Em recentes pesquisas, vários outros compostos e proteínas foram identificados, evidenciando a via de sinalização (WASTERACK e PARTHEIR, 1997). 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). O modelo mais recente para descrever a via do mecanismo de sinalização foi proposto por WASTERACK e PARTHEIR (1997). Neste mecanismo, uma LOX localizada dentro dos cloroplastos, denominada LOX 13, uma aleno oxido-sintetase, uma aleno oxido-ciclase e três ciclos de β -oxidações são necessários para formar o ácido jasmônico, que atua na ativação de genes inibidores de proteases. A ativação desta via é iniciada pelo ácido linolênico, sendo necessário um ácido abscísico endógeno. Sugere-se também a necessidade de etileno juntamente com ácido jasmônico e atuação de oligogalacturonídeos, quitosan e outros sinais locais externos, como luz ultra-violeta, que podem também acionar a via de sinalização em cascata. A Figura 4 mostra essa via de sinalização. Pouco se conhece a respeito da função dos demais componentes intracelulares produzidos que também atuam na ativação da via de sinalização de expressão de genes induzidos por ferimento e outros tipos de estresse (WASTERACK e PARTHEIR, 1997).

A via de transdução de sinais do ácido jasmônico ainda não está bem esclarecida. Presume-se que ele interaja com receptores de sinais de membranas, os quais ativam a via de sinalização, resultando assim na ativação de genes de inibidores de proteases em resposta a ferimento, bem como na ativação de outros genes que influenciam o crescimento, o desenvolvimento, a resposta a patógenos e o amadurecimento de frutos (CREELMAN e MULLET, 1997).



Fonte: WASTERACK e PARTHIÉ (1997).

Figura 4 - Via de sinalização dos octadecanóides, atuando na expressão de genes de defesa em tomates.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Reagentes

Todos as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água deionizada.

Os reagentes utilizados nos experimentos tiveram as seguintes procedências: ácido acético, bicarbonato de sódio, borato de sódio, carbonato de sódio, citrato de sódio, fosfato monossódico, fosfato dissódico, acetato de sódio, ácido linoléico, ácido bicinconínico, albumina sérico bovina, tripsina pancreática bovina (tipo III), N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilina (D,L-BApNA), cloreto de cálcio diidratado -SIGMA CHEMICAL CO, ácido bórico, tris (hidroximetilaminometano)-HCl, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), etanol, acetona, cloreto de ferro III, sulfato de cobre -MERCK.

3.1.2. Equipamentos

Balança analítica modelo AT 200 – METTLER

Banho-maria – modelo 100 – FANEM LTDA.

Centrífuga – modelo 5415C

Centrífuga – modelo J2-MI - BECKMAN

Cromatógrafo Shimadzu, modelo 14B, equipado com detector de ionização de chama, coluna carbowax (25 m x 0,52 mm), “head-space” modelo 2B e integrador CR-7A para as análises de hexanal.

Cronômetro modelo Mondaine

Espectrofotômetro - modelo DU 650 – BECKMAN

Espectrofotômetro - modelo DU 70 – BECKMAN

Potenciômetro - modelo B374- MICRONAL

3.1.3. Materiais genéticos

Utilizaram-se como fontes de enzima folhas de soja da variedade IAC100 e da linhagem IAC100-TN no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977). A variedade IAC-100 possui as três isoenzimas de lipoxigenases na semente e é resistente a insetos. A linhagem triplo Nulo (IAC-100 TN), desprovida das isoenzimas de lipoxigenases na semente, faz parte do programa de melhoramento da soja da UFV. Esta linhagem apresenta herança genética mendeliana simples, na qual os genes de LOXs 1 e 2 estão ligados e LOX 3 é independente, e foi obtida inicialmente a partir de dois retrocruzamentos, utilizando como progenitor recorrente a variedade IAC-100. Na geração F2 do segundo retrocruzamento, foram selecionadas sementes com ausência de LOXs 1, 2 e 3. Foram selecionadas plantas com características fenotípicas semelhantes às da variedade IAC-100, as quais foram autofecundadas até a geração F6, a fim de multiplicar sementes e proceder a mais seleções de plantas que se assemelhassem com a variedade IAC-100. As plantas da geração F6 foram novamente selecionadas e submetidas ao tratamento. As plantas de soja da variedade e da linhagem IAC-100 foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com capacidade para 4,0 kg de solo, sendo cultivadas quatro plantas por vaso. Os três folíolos da primeira folha trifoliolar danificados e os três folíolos da segunda folha trifoliolar foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para posterior análise.

3.2. Métodos

3.2.1. Ferimento das plantas

Foram feitos sete ferimentos nos três folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas de soja no estágio V3, com o auxílio de uma pinça, construída de modo que seus dentes não danificassem a folha totalmente e os ferimentos fossem bem uniformes, conforme mostram as Figuras 5 e 6. Após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas de ferimento, os três folíolos da primeira e segunda folhas trifoliales completamente expandidas foram coletados, para posterior obtenção de extratos foliares. A resposta local aos ferimentos foi determinada na primeira folha trifoliolar, submetida aos ferimentos. A resposta sistêmica foi determinada na segunda folha trifoliolar, não-ferida. Os resultados e as análises bioquímicas foram comparados com aqueles determinados em plantas-controles.

3.2.2. Obtenção de extratos foliares

O preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C, de acordo com o método de OHTA et al. (1986), acrescido das seguintes modificações: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5 em substituição ao fosfato 0,1 M, além de não ter sido utilizado Triton x-100.

Três folíolos 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, transferido para tubos de centrifuga e centrifugado a 17.200 g por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à dosagem de proteínas e à determinação da atividade de lipoxigenase.

3.2.3. Determinação de proteínas totais no extrato bruto

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985), tendo a albumina sérica bovina como padrão, na concentração de 2,0 mg/mL. Para o preparo do reagente A,



Figura 5 - Folha ferida nas nervuras centrais e secundárias



Figura 6 - Planta ferida na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento.

dissolveram-se 1,0 g de bicinconinato de sódio, 160,0 mg de tartarato de sódio, 1,8 g de carbonato de sódio, 400,0 mg de hidróxido de sódio e 950,0 mg de bicarbonato de sódio em 100 mL de água deionizada, e o pH foi ajustado para 11,3. Para o preparo do reagente B, dissolveram-se 4,0 g de sulfato de cobre em 100 mL de água deionizada. Para as dosagens, em triplicatas, a 50 µL da amostra adicionou-se 1,0 mL do reagente de trabalho (50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B). A solução foi agitada e colocada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância foi lida a 562 nm.

3.2.4. Métodos analíticos cinéticos

3.2.4.1. Medida da atividade de lipoxigenases

A atividade foi determinada segundo o método descrito por AXELROD et al. (1981). Neste método é medido o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado após a ação enzimática das LOXs.

Preparou-se uma solução-estoque de ácido linoléico 10 mM, como se segue: a um frasco 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. Em seguida, homogeneizou-se a solução succionando com uma pipeta automática, evitando-se a formação de bolhas. Para o clareamento da solução foram adicionadas gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume completado para 25 mL com água. A solução-estoque do ácido linoléico foi dividida em alíquotas de 1 mL, em microtubos envolvidos em papel-alumínio, e armazenadas a -20 °C. Para a análise da atividade de lipoxigenases, misturaram-se 1 µL do extrato bruto foliar e 4 µL da solução-estoque de ácido linoléico em 1 mL de tampão acetato 0,05 M, pH 4,5, ou em 1 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por um

período de 2,5 minutos. Sob as mesmas condições, procedeu-se com o branco, que consistiu apenas de substrato e tampão. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. A partir dos valores de absorvância obtidos em 234 nm, foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, utilizando-se a seguinte equação:

$$V = \frac{A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

em que

A_{234} = absorvância a 234 nm;

ϵ = coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico em 234 nm ($\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

t = 120 segundos (tempo de incubação); e

l = caminho ótico (1,0 cm).

3.2.4.2. Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico

Nestes experimentos foram utilizados os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 M:

TAMPÃO	Faixa de pH
ácido cítrico/fosfato dissódico	2,0-2,5
ácido cítrico/citrato de sódio	3,0-3,5
ácido acético/acetato de sódio	4,0-4,5
ácido cítrico/citrato de sódio	5,0-5,5
fosfato monos sódico/fosfato dissódio	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
ácido bórico/borato de sódio	9,0-10,0

Para obter o perfil de atividade de LOX em função do pH, foi determinada a atividade de LOX, conforme o item anterior, em cada um dos valores de pH descritos anteriormente. Após a determinação das velocidades, construiu-se um gráfico, alocando na ordenada as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico e na abscissa os valores de pH testados.

3.2.4.3. Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico

O efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação do ácido linoléico catalisada pela ação das lipoxigenases foi determinado a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Foi utilizado banho-maria para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas, como também espectrofotômetro com aquecimento, para que as mesmas se mantivessem nos mesmos valores de temperaturas. Os experimentos foram feitos a pH 4,5 e 6,0, utilizando-se os respectivos sistemas tamponantes já mencionados.

3.2.4.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases em plantas de soja submetidas a ferimentos foliares

A atividade de lipoxigenases foi determinada conforme anteriormente descrito, em tampão fosfato pH 6,0, utilizando-se ácido linoléico com substrato, nas concentrações de 1×10^{-5} ; 2×10^{-5} ; 4×10^{-5} ; 8×10^{-5} ; 16×10^{-5} ; 32×10^{-5} ; 64×10^{-5} e 128×10^{-5} M.

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

3.3. Determinação de inibidores de proteases

3.3.1. Preparo do extrato

As folhas de soja pesadas foram transferidas para um almofariz. Em seguida, adicionou-se nitrogênio líquido, para que fossem maceradas, e ao pó obtido adicionou-se tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, na proporção 1:3 (1 grama de folha para 3 mL de solução-tampão). O extrato bruto foi levado para centrífuga durante 30 minutos a 4 °C, a 17.200 g. A seguir, transferiu-se o sobrenadante para um tubo eppendorf, submetendo-o a uma nova centrifugação. O extrato obtido foi mantido em banho de gelo.

3.3.2. Determinação de inibidores de proteases

A determinação de inibidores de proteases foi realizada por meio da atividade da tripsina na presença ou na ausência de inibidores e consistiu no seguinte procedimento analítico: análise do teste: 100 µL do extrato e 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 ($3,58 \times 10^{-5}$ M), foram adicionados em um tubo de ensaio. Para análise do 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 ($3,58 \times 10^{-5}$ M). Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após esse tempo, 500 µL dessa solução (teste e controle da enzima) foram retirados e adicionados a outro tubo contendo 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, com 20 mM de cloreto de cálcio e com 500 µL da solução de D,L-BApNA (1,2 mM). A mistura foi agitada rapidamente, e a absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro a 410 nm, durante dois minutos. As análises foram feitas em triplicatas. A porcentagem de inibição foi calculada a partir das leituras de absorvância do controle da enzima e do teste. Os resultados foram convertidos em miligrama (mg) de tripsina pura inibida por grama (g) de proteína, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1000 \times P}$$

em que

A (410 nm) = absorvância do padrão - absorvância 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).

3.4. Determinação de aldeídos totais

Nas determinações de aldeídos totais, nos extratos foliares, foi utilizado o método colorimétrico que tem o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)

como reagente de cor. Os folíolos foram liofilizados e moídos; em seguida pesaram-se 50 mg do pó obtido e adicionaram-se 4 mL de etanol 2%. Após duas horas à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 31.000 g por 15 minutos, a 15 °C. Tomou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e adicionaram-se 0,5 mL de solução de MBTH 0,1% e 1,25 mL de FeCl₃ 0,23%. Exatamente seis minutos após o tratamento com FeCl₃, adicionaram-se 3 mL de acetona. As leituras da absorvância foram feitas a 635 nm, sendo os resultados expressos como a diferença entre a absorvância observada ao final da reação e a absorvância da reação-controle, na qual a acetona foi adicionada antes da adição do MBTH. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.4.1. Determinação de hexanal

A determinação de hexanal foi realizada por cromatografia gasosa, pelo método do “head-space”, adaptado por Rezende et al. (1986). O método é baseado na análise do conteúdo do espaço livre de frascos hermeticamente fechados, contendo 50 mg da amostra liofilizada e moída e 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, aquecidos a 40 °C por 20 min; então, o conteúdo é injetado automaticamente na coluna carbowax (25 m x 0,52 mm) do HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), equipado com detector de ionização de chama “head-space”, modelo 2B, e integrador CR-7A. As análises foram realizadas em triplicatas, sob as seguintes condições: temperatura inicial de coluna de 45 °C programada para elevar a 7 °C por minuto, até 70 °C, que foi mantida por cinco minutos, elevando posteriormente a 15 °C por minuto, até 200 °C; a temperatura do injetor foi de 200 °C, e a do detector, de 250 °C. Utilizou-se nitrogênio como gás de arraste.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico

As Figuras 7, 8, 9 e 10 apresentam os perfis pH-atividade de lipoxigenase sobre a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico nas respostas local e sistêmica de plantas da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, coletadas 168 horas após ferimento, com seus respectivos controles. Os perfis para os tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas após o ferimento, dos dois genótipos analisados, apresentaram-se semelhantes aos de 168 horas (dados não mostrados).

Os resultados mostram dois picos mais acentuados de atividade de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0 para os dois genótipos, nos testes e nos respectivos controles, tanto na resposta local quanto na resposta sistêmica. Os dados mostram que houve tendência de aumento da atividade de LOX nas respostas local e sistêmica ao ferimento mecânico.

Observa-se ainda que na resposta local o pico em pH 4,5 apresenta-se mais acentuado do que o pico em pH 6,0, para os dois genótipos com os seus respectivos controles. Já para a resposta sistêmica observa-se que o pico em pH 6,0 apresenta-se mais acentuado do que em pH 4,5.

Os valores de pH ótimo das LOXs de folhas da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, submetidas a ferimento mecânico, estão dentro da faixa

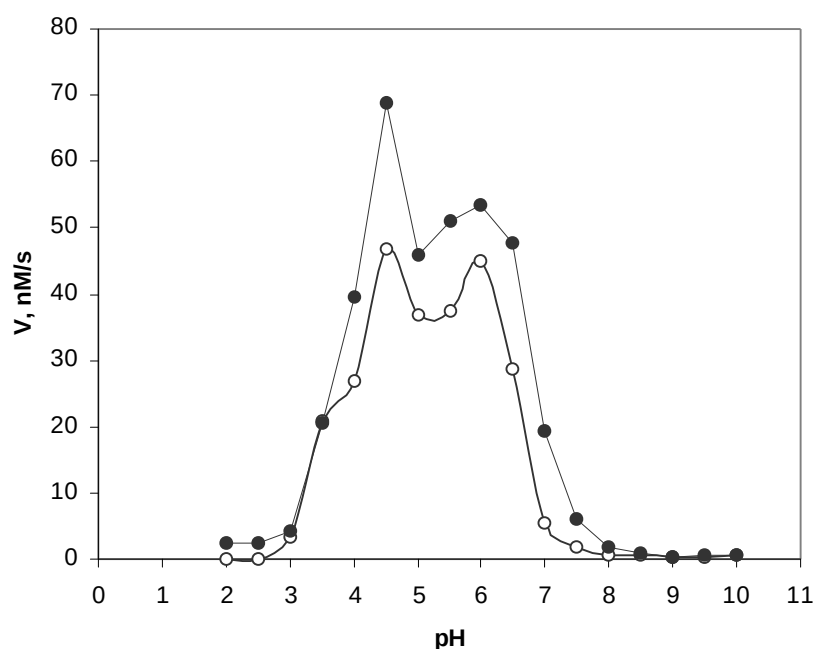


Figura 7 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidropéroxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas feridas e -○- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/ dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta local): 1,58 mg/mL; folhas de plantas-controle: 1,82 mg/mL.

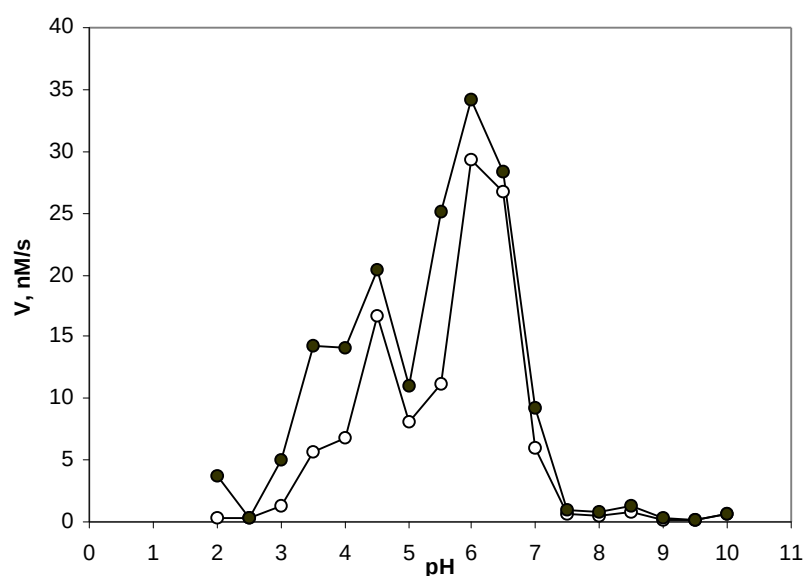


Figura 8 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidropéroxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas feridas e -○- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total (resposta sistêmica) - 1,58 mg/mL; controles: 1,82 mg/mL.

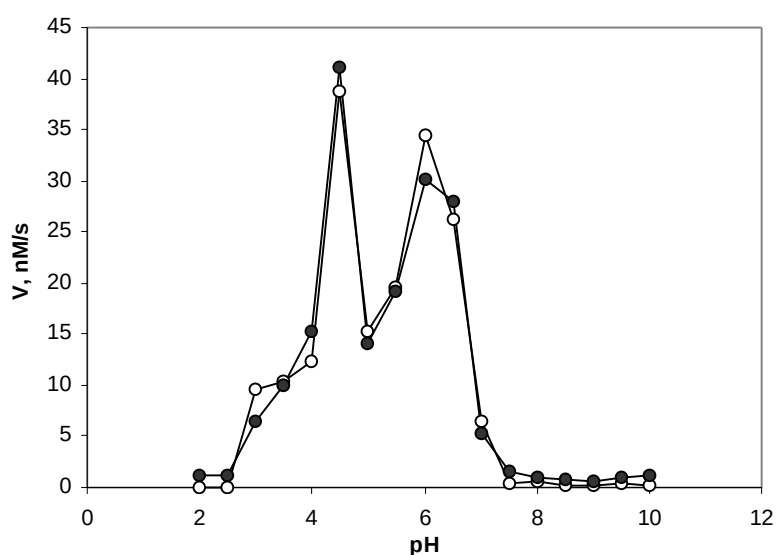


Figura 9 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) de plantas feridas e -○- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódico pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1,0 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta local): 1,72 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,70 mg/mL.

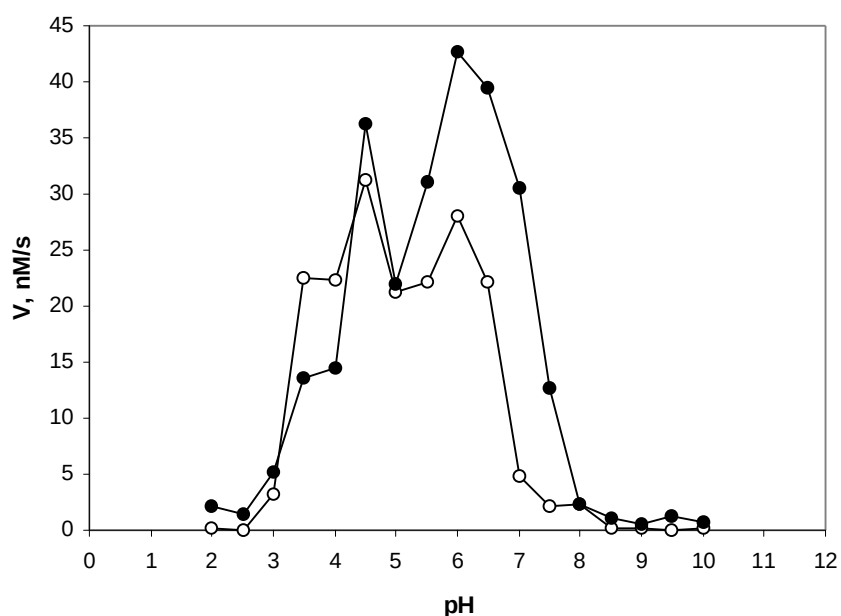


Figura 10 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidropéroxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas do genótipo IAC 100 TN. -●- resposta sistêmica (fólios da segunda folha trifoliolar) de plantas feridas e -○- controles coletados 168 horas após ferimento mecânico. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 0,05 M: ácido cítrico/fosfato dissódico pH 2,0 e 2,5; ácido cítrico/citrato de sódio pH 3,0 e 3,5; ácido acético/acetato de sódio pH 4,0 e 4,5; ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato monossódico/dissódio pH 6,0, 6,5 e 7,0; Tris-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5; ácido bórico/borato de sódio pH 9,0, 9,5 e 10. Concentração do ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total (resposta sistêmica) - 1,71 mg/mL; controles: 1,81 mg/mL.

de pH ótimo verificada para as LOX de outras fontes, como por exemplo: as LOXs das variedades IAC-100 e cristalina, pH ótimo 6,0, linhagem “Triplo Nulo”, pH ótimo 7,0 (LANNA et al., 1996); LOXs de tubérculos de batata, pH 5,5–6,0 (GALLIARD e PHILLIPS, 1971); LOXs de semente de girassol, pH ótimo 6,2 (LEONI et al., 1985); e LOXs de pimentão, pH ótimo 6,5 (MINGUEZ-MOSQUEIRA et al., 1993).

Os resultados sugerem que as LOXs que atuam em pH 4,5 e pH 6,0 respondem tanto no local do ferimento quanto sistemicamente.

SARAVITZ e SIEDOW (1996) e HILDEBRAND et al. (1989) trabalharam com plantas de soja submetidas a ferimento mecânico e observaram o aumento da expressão de genes que codificam LOXs, após o ferimento. O mesmo foi observado por GEERTS et al. (1994), que trabalharam com batata, e MAUCH et al. (1997), com trigo. Portanto, os resultados sugerem que o aumento da atividade de lipoxigenase tanto na resposta local quanto na sistêmica, nos dois genótipos, talvez seja devido ao aumento da expressão e transcrição de genes de lipoxigenases que respondem ao ferimento.

4.2. Efeito da temperatura sobre a taxa de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico

O efeito da temperatura na atividade de LOXs diante do ácido linoléico a pH 4,5 para os genótipos IAC-100 e IAC 100-TN, coletados 168 horas após ferimento, com seus respectivos controles, está apresentados nas Figuras 11 e 12. Os perfis para os tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas colhidos pós-ferimento, dos genótipos, apresentaram-se semelhantes aos de 168 horas (dados não mostrados). Além disso, observa-se atividade mais acentuada a 25 °C, na resposta local, para os dois genótipos e seus respectivos controles. No caso da resposta sistêmica, observa-se aumento da atividade de LOX, com aumento da temperatura nos dois genótipos analisados e em seus respectivos controles. Observa-se que não foi possível determinar a temperatura ótima de atuação das isoenzimas de lipoxigenases na resposta sistêmica, devido ao aumento da atividade de lipoxigenase, com aumento da temperatura nos dois genótipos analisados e em seus respectivos controles, na faixa de temperatura testada. Assim, foi escolhida a temperatura de 25 °C para determinar a atividade de LOXs.

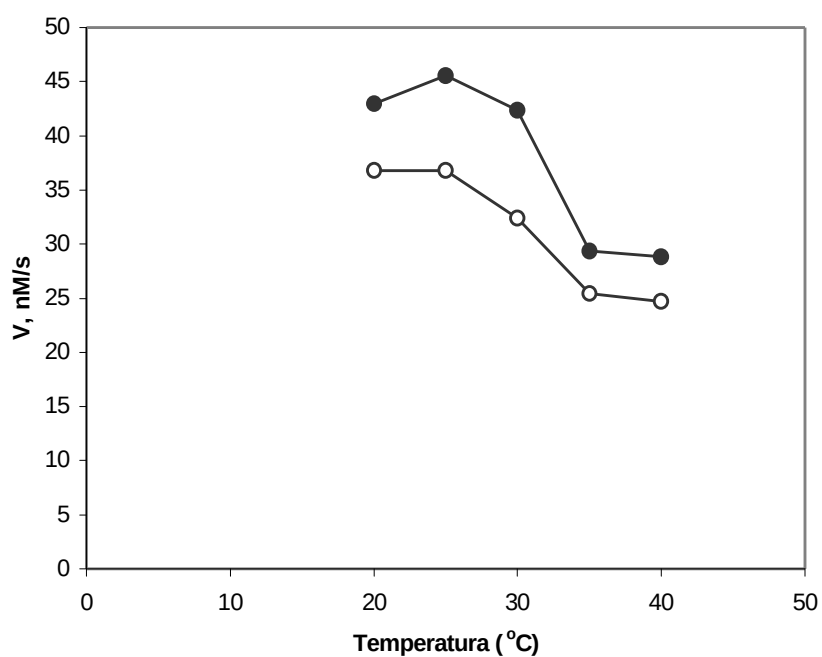


Figura 11 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 4,5. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 0,63 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,09 mg/mL.

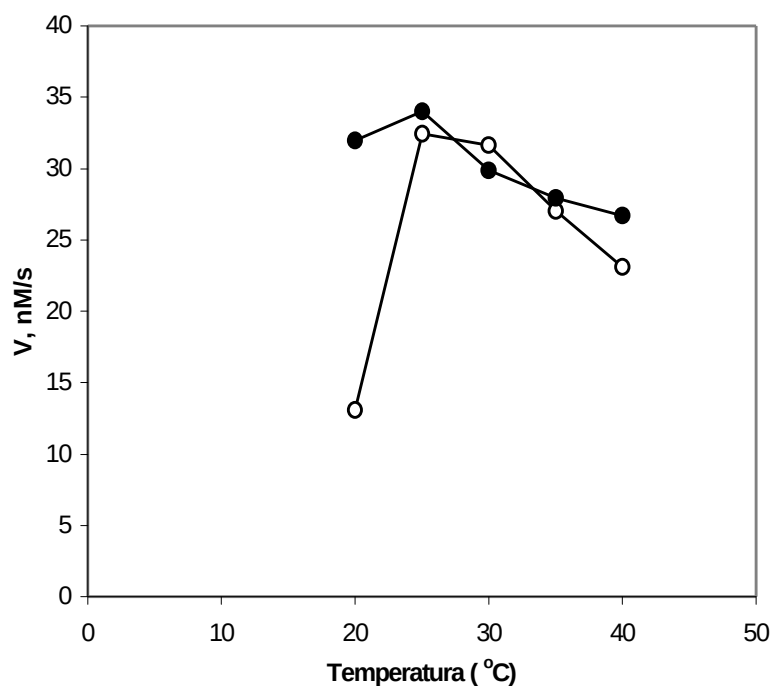


Figura 12 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 4,5. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 µL. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,32 mg/mL.

O efeito da temperatura na atividade de LOXs diante do ácido linoléico a pH 6,0, para os genótipos IAC-100 e IAC 100 TN, coletados 168 horas após ferimento mecânico, com seus respectivos controles, encontra-se representado nas Figuras 13, 14, 15 e 16. Os perfis para os tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas colhidos pós-ferimento, dos dois genótipos, apresentaram-se semelhantes aos de 168 horas (dados não mostrados). Observa-se atividade mais acentuada a 25 °C para os dois genótipos e seus respectivos controles, tanto na resposta local quanto na sistêmica. Em pH 6,0, a atividade dos testes apresentou-se marcadamente mais elevada do que os respectivos controles na faixa de valores de temperatura estudados.

Os dados obtidos sugerem que os dois genótipos apresentam dois picos mais acentuados de pH, sendo um em pH 4,5 e outro em 6,0, em respostas local e sistêmica com seus respectivos controles, para todos os tempos de resposta ao ferimento.

LANNA et al. (1996) analisaram as lipoxigenases foliares dos genótipos da variedade IAC-100, Cristalina e do genótipo 'Triplo Nulo' e verificaram que a temperatura ótima de atuação foi de 25 °C, sendo, portanto, a mesma temperatura obtida. Os dados obtidos sugerem ainda que os dois genótipos responderam ao ferimento e que as isoenzimas de LOXs que atuam em resposta ao ferimento, em pH 4,5 e 6,0, aumentam sua velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico. SARAVITZ e SIEDOW (1996), trabalhando com plantas de soja submetidas a ferimento mecânico, isolaram dois cDNA que codificam LOXs, designados LOX 7 e LOX 8. As mensagens correspondentes a esses cDNAs têm a sua expressão após o ferimento. LOX 7 aumentou sistemicamente 8 horas após o ferimento, e LOX 8, a partir de 8 até 72 horas após o ferimento. Em analogia, talvez nos resultados esteja ocorrendo aumento de expressão de genes que codificam para LOX-7 e LOX-8, como sugerido por SARAVITZ e SIEDOW (1996) em seus experimentos.

4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{máx. app}}$

As Figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam, respectivamente, os gráficos de Michaelis-Menten da atividade de LOX sobre o ácido linoléico, a pH 6,0, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, respostas local e sistêmica, 168 horas após ferimento, com seus respectivos controles. Nestas figuras estão inseridos os gráficos de duplo recíproco (Lineweaver-Burk).

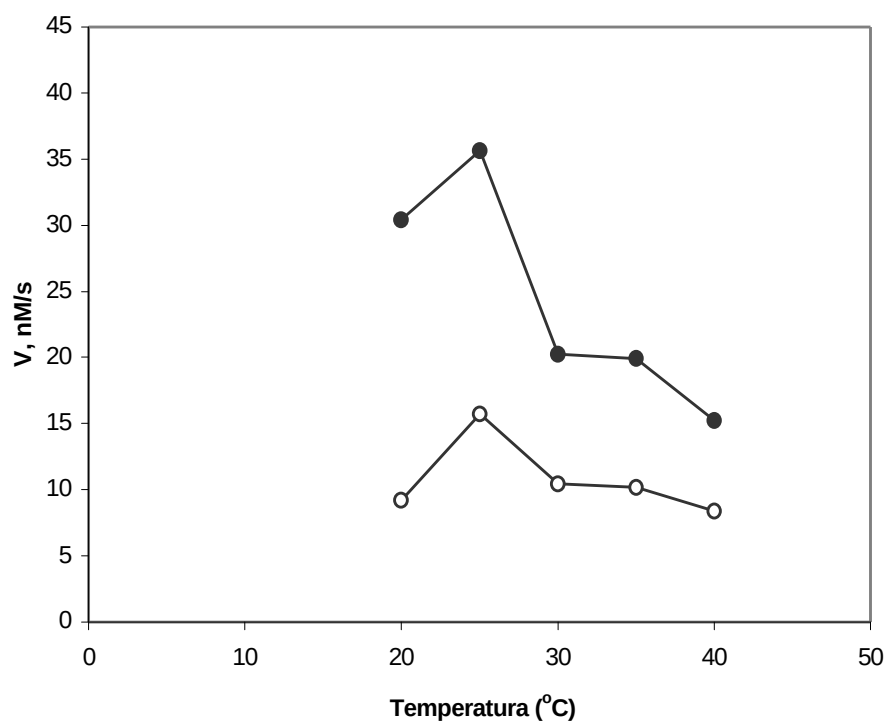


Figura 13 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 6,0. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,13 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,09 mg/mL.

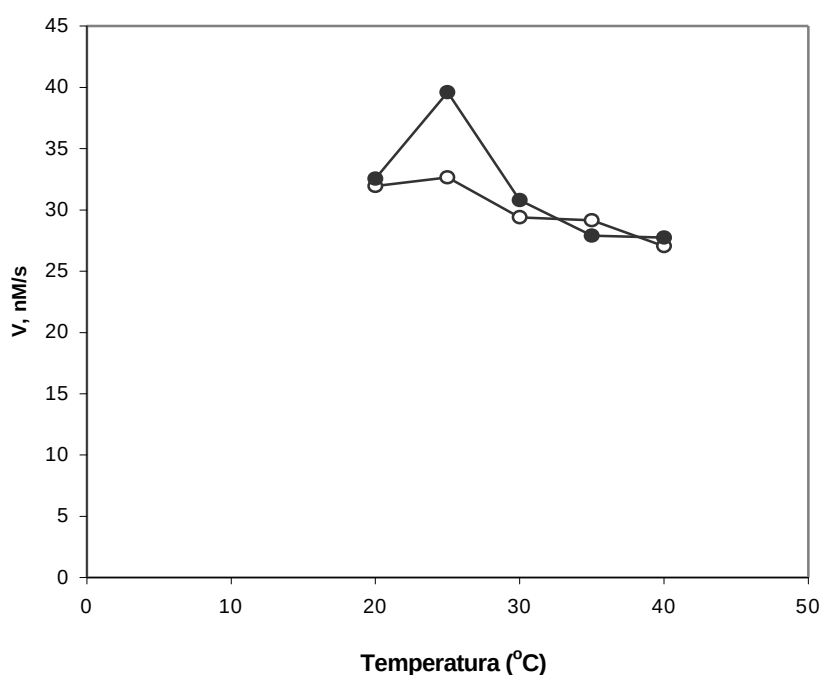


Figura 14 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 a pH 6,0. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta sistêmica) - 0,85 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,16 mg/mL.

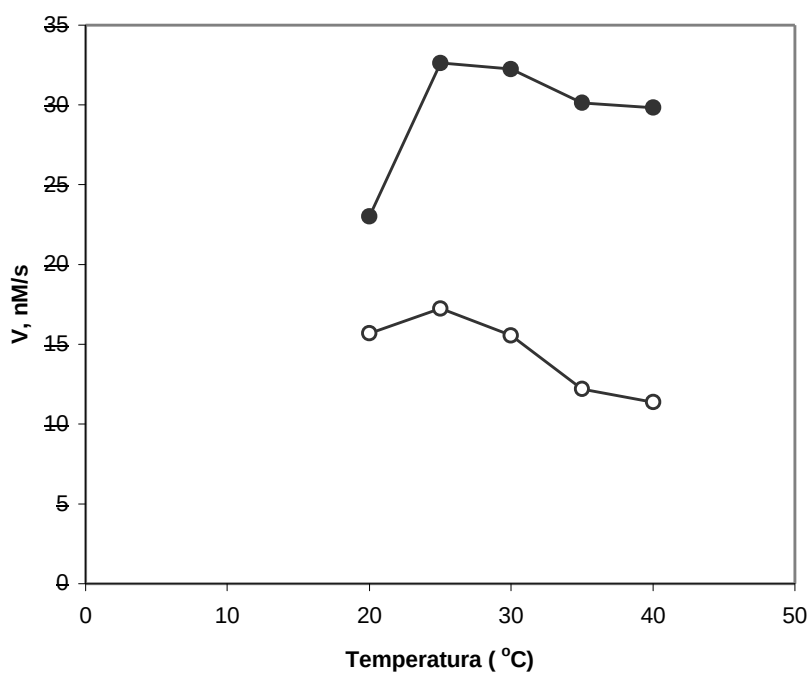


Figura 15 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 6,0. -●- resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,32 mg/mL.

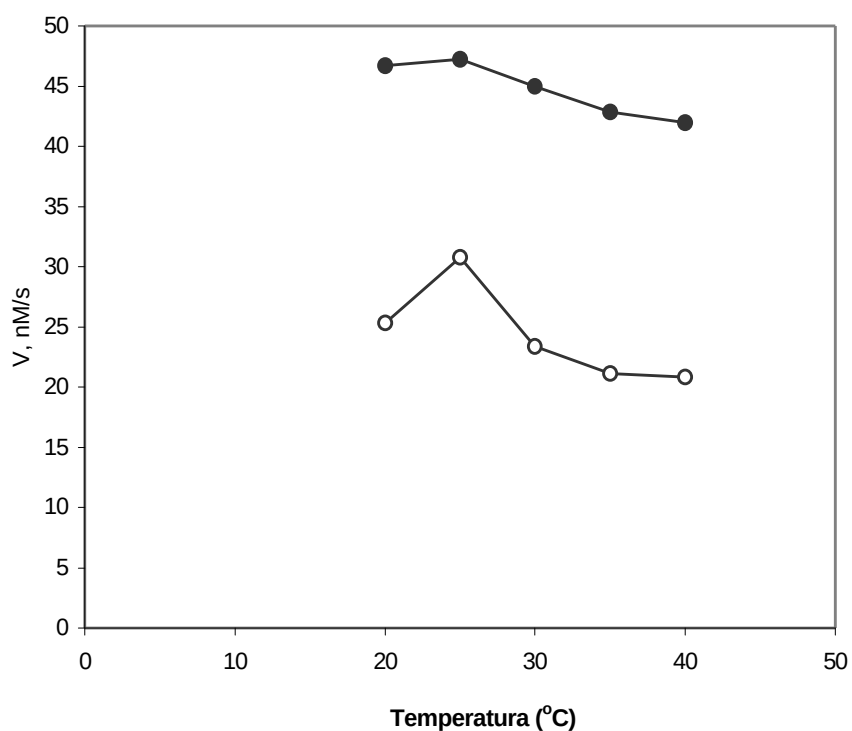


Figura 16 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da linhagem IAC-100 TN a pH 4,5. -●- resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) e -○- controles coletados 168 horas após o ferimento. Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Concentração do ácido linoléico: $4,0 \times 10^{-5}$ M. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total: folhas de plantas feridas (resposta sistêmica) - 1,23 mg/mL; folhas de plantas-controles - 1,33 mg/mL.

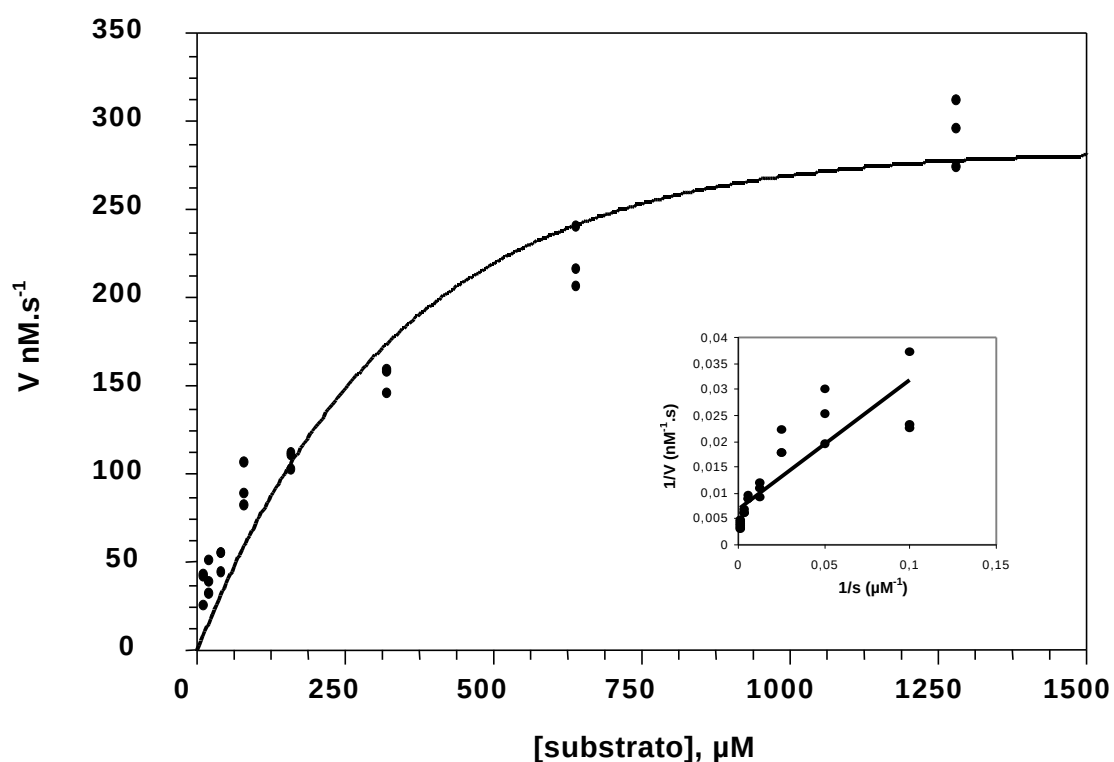


Figura 17 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Resposta local (fólios da primeira folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,14 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de $K_M \text{ app}$ e $V_{\text{máx app}}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk. ($r = 0,9623$).

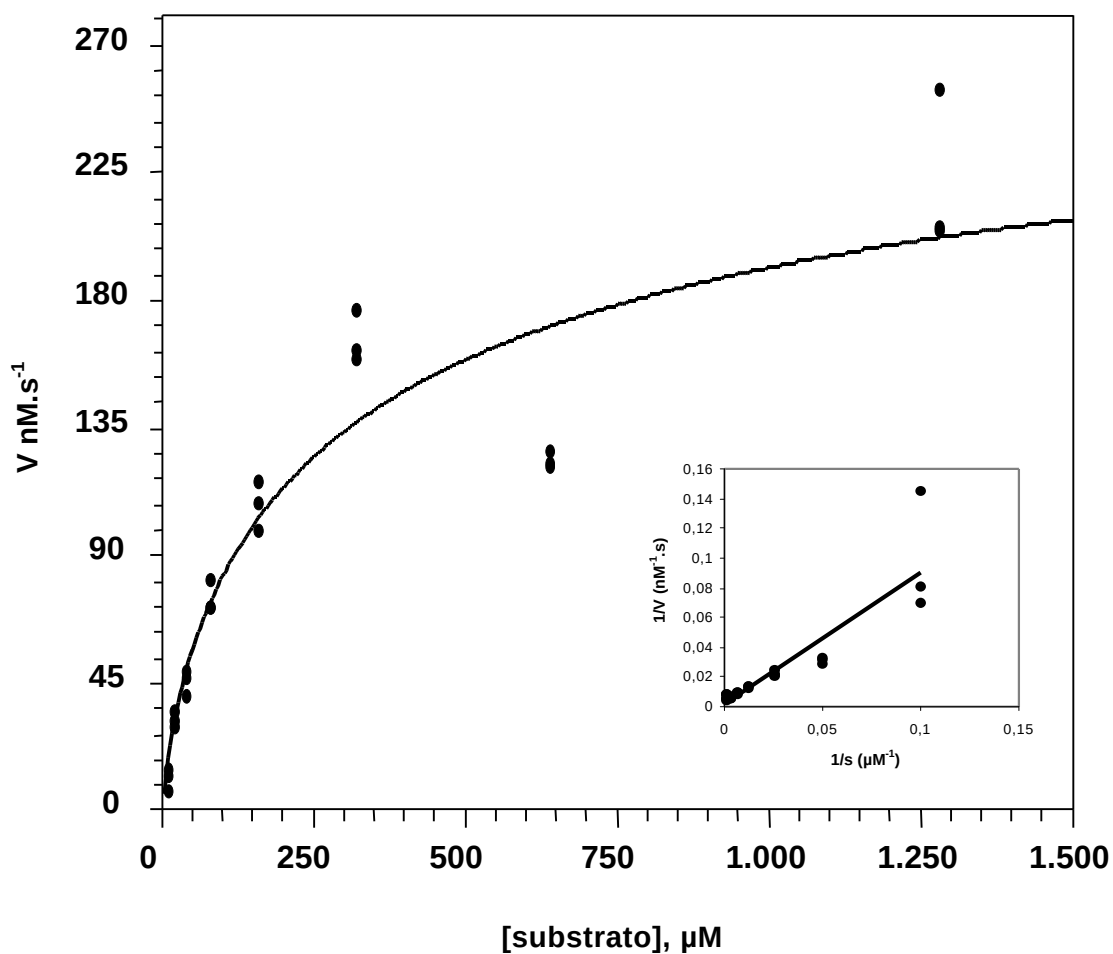


Figura 18 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,09 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de k_m app e $V_{máx}$ app. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9480$).

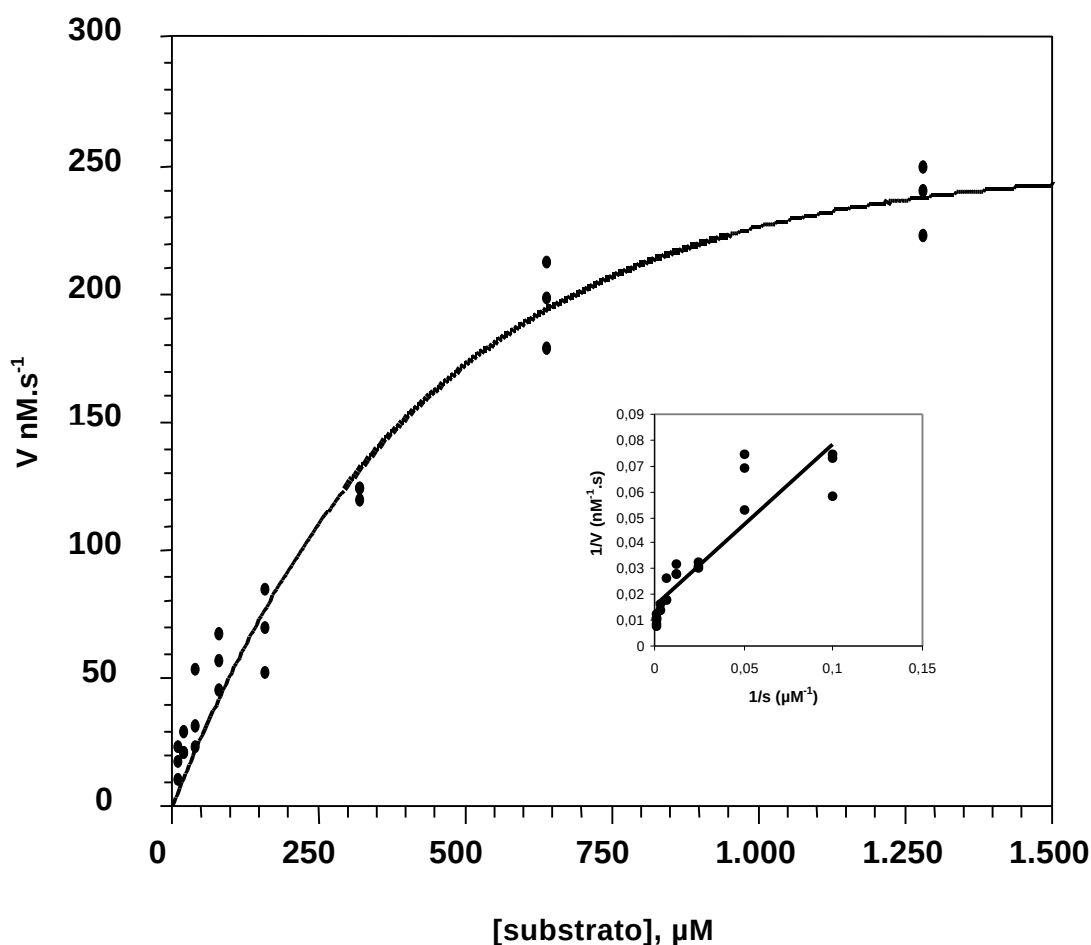


Figura 19 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja controles da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Controle (folíolos da primeira folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1,0 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,14 mg/mL. A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_{Mapp} , V_{app} e $V_{máx app}$. Os pontos são experimentais. inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9841$).

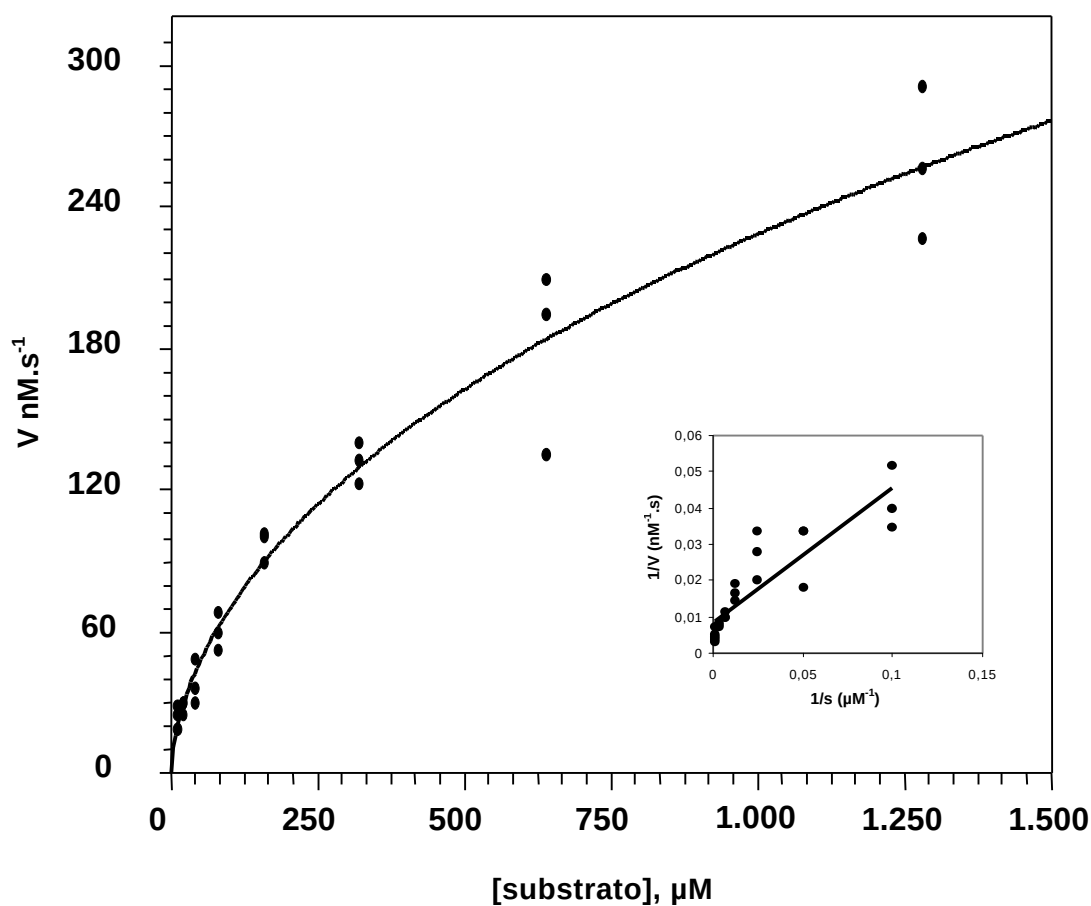


Figura 20 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas de soja da variedade IAC-100, coletadas 168 horas após o tratamento. Controle (folíolos da segunda folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 mM a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,07 mg/mL. 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. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk ($r = 0,9810$).

As LOXs foliares dos dois genótipos seguem cinética de Michaelis-Menten, demonstrando curva hiperbólica de velocidade versus concentração de substrato nas concentrações de substrato definidas nos experimentos, para todos os tempos estudados, nas respostas local e sistêmica.

Os valores de K_M app e $V_{máx}$ app das isoenzimas de LOXs foliares, em pH 6,0, presentes nas respostas local e sistêmica, com os seus respectivos controles, de plantas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN submetidas a ferimento mecânico e coletadas após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas, estão apresentados nos Quadros 2 e 3. Observa-se que os valores de K_M aparente das isoenzimas de lipoxigenases foliares dos dois genótipos, comparados aos valores de K_M aparente dos controles, aumentam consideravelmente no tempo de 6 horas após o ferimento e diminuem a partir de 12 horas, tendo em 168 horas o menor valor tanto na resposta local quanto na sistêmica, mostrando que houve respostas local e sistêmica nos dois genótipos.

O menor valor de K_M aparente em 168 horas após o ferimento, nos dois genótipos, sugere uma alteração do “pool” de LOXs em resposta a ferimento, otimizando assim a cinética dessas isoenzimas. Como os resultados obtidos de cinética enzimática são semelhantes para os dois genótipos estudados, os dados sugerem que a remoção genética de LOXs de semente de soja não afeta a expressão de LOXs de folhas do genótipo IAC 100 TN, em virtude do ferimento mecânico.

Com relação à velocidade máxima aparente ($V_{máx}$ app), um parâmetro cinético das lipoxigenases que atuam em pH 6,0, observa-se que na variedade IAC-100, em geral, $V_{máx}$ app aumentou na resposta local após o ferimento, enquanto na resposta sistêmica ele diminuiu. Por outro lado, no genótipo IAC-TN, $V_{máx}$ app diminuiu tanto na resposta local quanto na sistêmica. No entanto, os dados não são conclusivos, uma vez que $V_{máx}$ depende da concentração da enzima pura e os trabalhos não foram efetuados com ela.

Como o valor da constante de Michaelis-Menten é característico para um substrato e uma enzima, pode-se dizer que, provavelmente, o “pool” de lipoxigenases que atuam na resposta a ferimento da linhagem IAC-100 TN é semelhante ao “pool” de LOXs da variedade IAC-100. Esses resultados indicam que a remoção genética das LOXs de semente não está interferindo na expressão dos genes que codificam para as LOXs que atuam no mecanismo de defesa da planta de soja em resposta a ferimento mecânico.

Quadro 2 - Parâmetro cinético, K_M aparente ($K_{M\text{ app}}$) e velocidade máxima aparente ($V_{M\text{áx.app}}$) das lipoxigenases que atuam em pH 6,0, obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando o programa de computação Enzfitter. Valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{M\text{áx.app}}$ determinados nas respostas locais (folíolos da segunda folha trifoliolar) e sistêmicas (folíolos da primeira folha trifoliolar) da variedade IAC-100 submetida a ferimento mecânico, coletada após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas

Tempo (horas)	Resposta local		Resposta sistêmica	
	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{M\text{áx.app}}$ (nM/Seg)	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{M\text{áx.app}}$ (nM/Seg)
	288,00(c)	241,98(c)	375,10(c)	340,02(c)
0	354,16	159,09	155,85	143,85
6	635,04	382,85	302,04	227,46
12	275,94	303,68	197,67	109,37
24	234,68	148,31	219,19	200,65
48	275,28	286,30	198,82	360,00
168	186,24	272,20	102,05	195,05

Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0. Concentração do ácido linoléico: $1,0 \times 10^{-5}$ a 128×10^{-5} . Quantidade de extrato bruto: 1 μl . Concentração de proteína total no extrato bruto de folhas de plantas coletadas após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas. Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) : 1,29; 1,59; 1,82; 0,66; 0,74; 1,14 mg/ml. Controles: 1,37; 0,92; 1,54; 1,45; 1,42; 1,14 mg/mL. Resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar): 1,22; 2,82; 1,49; 1,26; 0,99; 1,09 mg/mL. Controle: 1,37; 1,60; 1,54; 1,16; 1,52; 1,07 mg/mL

Quadro 3 - Parâmetro cinético, K_M aparente ($K_{M\text{ app}}$) e velocidade máxima aparente ($V_{M\text{áx.app}}$) das lipoxigenases que atuam em pH 6,0, obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando o programa de computação Enzfitter. Valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{M\text{áx.app}}$ determinados nas respostas locais (folíolos da primeira folha trifoliolar) e sistêmicas (folíolos da segunda folha trifoliolar) do genótipo IAC-100 TN submetido a ferimento mecânico, coletado após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas

Tempo (horas)	Resposta local		Resposta sistêmica	
	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{M\text{áx.app}}$ (nM/ Seg)	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{M\text{áx.app}}$ (nM/Seg)
	234,70(c)	370,02(c)	140,62(c)	480,62 (c)
0	231,20	190,65	292,76	262,50
6	379,99	190,65	288,48	255,48
12	234,72	339,34	276,12	125,25
24	282,08	173,05	388,60	368,75
48	241,66	297,61	291,66	239,92
168	173,05	220,00	142,28	186,56

Condições experimentais: tampão fosfato de sódio 0,05 mM, pH 6,0. Concentração do ácido linoléico: $1,0 \times 10^{-5}$ a $128,0 \times 10^{-5}$. Quantidade de extrato bruto: 1 μl . Concentração de proteína total no extrato bruto de folhas de plantas coletadas após 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas, Resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar): 1,05; 1,40; 0,96; 1,73; 1,07; 1,32 mg/ml. Controle: 0,91; 1,25; 0,75; 0,83; 1,48; 1,23 mg/mL. Resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar):: 1,30; 1,13; 1,34; 1,48; 1,40; 1,08 mg/mL. Controle: 1,22; 1,42; 0,79; 0,98; 1,27; 1,17 mg/mL.

4.4. Níveis de inibidores de proteases

A determinação dos inibidores de proteases em folhas de plantas de soja tem seus respectivos resultados apresentados no Quadro 4, para a variedade IAC-100, e no Quadro 5, para o genótipo IAC-100 TN. Em todos os tempos, ocorreu aumento de inibição trípica após fermento, ou seja, tanto na resposta local quanto na sistêmica. Os valores em mg de tripsina inibida por g de proteína foram maiores nos testes do que nos respectivos controles em 6, 12, 24, 48 e 168 horas após fermento mecânico. Novamente aqui pode-se notar que ocorreu resposta da planta de soja a fermento, por meio do aumento de inibidores de proteases, tanto na variedade quanto na linhagem IAC-100 TN. Portanto, os dados sugerem que plantas de soja submetidas a fermento mecânico apresentaram respostas local e sistêmica nos dois genótipos analisados, por meio do aumento de inibidores de proteases. Esses resultados sugerem ainda um possível mecanismo de defesa da planta de soja a fermento, passando pela via das LOXs através do caminho no qual ocorrem modificações químicas no ácido linolênico, causadas pela ação enzimática de LOX, hidroperóxido ciclase, redutase e três ciclos de β -oxidações com a produção de ácido jasmônico e subsequente indução da produção de inibidores de proteases (Figura 2).

Os resultados estão de acordo com o modelo proposto por FARMER e RYAN (1992), DAMMANN et al. (1997), WASTERACK e PARTHIER (1997) e CREELMAN e MULLET (1997), em que o ácido jasmônico é parte integrante de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula a transcrição de genes de inibidores de proteases. O modelo proposto por esses autores mostra que, quando a planta é ferida por insetos, é produzido um sinal sistêmico: sistemina. Quando a sistemina liga-se ao receptor I, localizado na membrana plasmática, ocorre a ativação de uma lipase, a qual libera ácido linolênico da membrana para o citosol, e então ocorre ação enzimática das LOXs e o ácido linolênico é convertido em ácido 13-hidroperóxido linolênico. O ácido 13-hidroperóxido linolênico formado é convertido em ácido jasmônico por ação enzimática de uma desidratase, uma redutase e três ciclos de β -oxidações. O ácido jasmônico produzido junto com uma proteína cinase (requerida para a ativação) liga-se ao receptor e ativa a expressão de genes de inibidores de proteases (Figuras 2 e 3).

Quadro 4 - Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja do genótipo IAC-100 submetidas a fermento mecânico

Tempo (horas)	mg de tripsina inibida ^{3/} /grama de proteína ^{1/} no extrato bruto			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	1,835 ± 0,072 ^{2/}	1,830 ± 0,406	2,786 ± 0,111	2,621 ± 0,131
6	1,795 ± 0,050	3,152 ± 0,354	1,914 ± 0,513	3,829 ± 0,580
12	1,883 ± 0,879	6,825 ± 0,630	2,756 ± 0,315	7,223 ± 0,558
24	1,929 ± 0,940	6,240 ± 0,594	3,821 ± 0,576	7,171 ± 0,158
48	1,539 ± 0,913	5,924 ± 0,857	3,773 ± 0,602	7,322 ± 0,670
168	1,199 ± 0,070	5,530 ± 0,218	4,622 ± 0,005	6,470 ± 0,225

^{1/} As concentrações de proteína nos extratos foram determinadas pelo método do ácido bicinconínico (Material e Métodos).

^{2/} Valores são a média das análises em triplicata ± desvio-padrão.

Extrações com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo cloreto de cálcio a 20 mM e a concentração de tripsina na reação $9,16 \times 10^{-7}$ M e de D,L-BapNA $4,0 \times 10^{-4}$ na reação.

^{3/} A inibição de tripsina, expressa em mg de tripsina inibida por grama de proteína, foi calculada através da equação 2 (Material e Métodos).

Quadro 5 - Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a fermento mecânico

Tempo (horas)	mg de tripsina inibida ^{3/} /grama de proteína ^{1/} no extrato bruto			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	1,794 ± 0,262 ^{2/}	1,561 ± 0,189	4,240 ± 0,189	4,030 ± 0,223
6	1,528 ± 0,871	3,332 ± 0,182	1,603 ± 0,125	5,462 ± 0,456
12	1,158 ± 0,100	4,276 ± 0,276	2,365 ± 0,085	3,621 ± 0,039
24	2,184 ± 0,236	3,355 ± 0,171	2,150 ± 0,146	4,155 ± 0,346
48	2,870 ± 0,151	4,079 ± 0,354	2,223 ± 0,115	5,005 ± 0,258
168	1,777 ± 0,332	4,094 ± 0,387	2,369 ± 0,203	4,539 ± 0,337

^{1/} As concentrações de proteína nos extratos foram determinadas pelo método do ácido bicinconínico (Material e Métodos).

^{2/} Valores são a média das análises em triplicata ± desvio-padrão.

Extrações com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo cloreto de cálcio a 20 mM e a concentração de tripsina na reação $9,16 \times 10^{-7}$ M e de D,L-BapNA $4,0 \times 10^{-4}$ na reação.

^{3/} A inibição de tripsina, expressa em mg de tripsina inibida por grama de proteína, foi calculada através da equação 2 (Material e Métodos).

RICKAUEAR et al. (1992), estudando a produção de inibidores de proteases em células de tabaco tratadas com extrato do fungo *Phytophthora parasitica* e com metil jasmonato, verificaram que após 40 horas as células apresentaram aumento na atividade de inibidores de proteases. GIRI et al. (1998) identificaram sete isoformas de inibidores de proteases em planta grão-de-bico após o ataque de larvas de uma praga, *Helicoverpa armigera*.

Os resultados reforçam a hipótese de que as isoenzimas de LOXs são enzimas-chave no sistema de defesa da planta, por iniciarem a via de produção de inibidores de proteases.

4.5. Níveis de aldeídos totais e hexanal

Os Quadros 6 e 7 apresentam os níveis de hexanal determinados em plantas de soja submetidas a ferimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, com seus respectivos controles, coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas após submetidas a ferimento mecânico. Ocorreu ligeiro aumento dos níveis de hexanal 48 e 168 horas após o tratamento, nos dois genótipos estudados. Os Quadros 8 e 9 apresentam os níveis de aldeídos totais em plantas de soja submetidas a ferimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, respostas local e sistêmica, com seus respectivos controles, coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas após submetidas a ferimento mecânico. Ocorreu ligeiro aumento dos níveis de aldeídos totais 168 horas após o tratamento, nos dois genótipos estudados.

Observa-se que, nos dois genótipos, a produção de hexanal e de aldeídos totais foi pequena em resposta a ferimento. Parece que a via das LOXs está sendo ativada, mas não segue a via de produção de aldeídos proposta por GARDNER (1991) e CROFT et al. (1993). É possível que a planta, em resposta ao ferimento mecânico, ative a via das LOXs e, após a formação de hidroperóxidos, ocorra a ação enzimática de uma hidroperóxido ciclase, seguindo a via de produção de ácido jasmônico e subsequente ativação e expressão de genes de inibidores de proteases, uma vez que o ferimento mecânico é uma simulação de uma injúria na planta provocada por insetos herbívoros.

Quadro 6 - Níveis de hexanal em folhas de soja da variedade IAC-100 submetidas a ferimento mecânico, com seus respectivos controles

Tempo (horas)	Níveis de hexanal - Área do pico em mvolts			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	2.363,00 ^{1/} ± 41,00	2.295,50 ± 19,50	2.841,50 ± 89,50	2.982,00 ± 11,00
6	1.238,50 ± 88,50	1.524,00 ± 87,00	2.086,50 ± 44,50	1.986,00 ± 99,00
12	1.552,00 ± 102,30	1.528,33 ± 91,87	2.326,00 ± 118,90	1.552,00 ± 110,22
24	1.024,00 ± 73,44	1.528,66 ± 128,85	1.353,00 ± 4,00	1.327,66 ± 69,06
48	2.206,00 ± 129,00	2.995,50 ± 82,50	2.188,70 ± 112,68	2.990,00 ± 25,00
168	1.375,70 ± 279,00	1.997,50 ± 20,50	1.693,00 ± 74,00	2.241,00 ± 55,00

^{1/} Valores são a média das análises de três repetições ± desvio-padrão.

Quantidade de folhas liofilizadas: 50,0 mg. Tampão de extração: fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. As determinações de hexanal foram realizadas por cromatografia gasosa, pelo método do "head-space", adaptado por Rezende (Material e Métodos).

Quadro 7 - Níveis de hexanal de folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a ferimento mecânico, com seus respectivos controles

Tempo (horas)	Níveis de hexanal - Área do pico em mvolts			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	1.638,30 ^{1/} ± 73,50	1.433,50 ± 92,50	2.186,00 ± 18,00	2.479,66 ± 106,49
6	1.475,50 ± 99,94	1.478,00 ± 37,55	2.143,00 ± 20,41	2.186,00 ± 107,42
12	1.611,00 ± 93,50	2.067,00 ± 32,50	2.466,30 ± 95,00	2.363,66 ± 69,18
24	1.520,50 ± 90,00	1.794,66 ± 36,32	1.799,00 ± 2,50	1.617,70 ± 108,32
48	1.659,73 ± 91,00	2.050,50 ± 93,50	1.854,00 ± 6,00	1.906,00 ± 86,07
168	1.430,70 ± 93,37	1.439,00 ± 47,00	1.655,00 ± 2,00	1.937,50 ± 51,50

^{1/} Valores são a média das análises de três repetições ± desvio-padrão.

Quantidade de folhas liofilizadas: 50,0 mg. Tampão de extração: fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. As determinações de hexanal foram realizadas por cromatografia gasosa, pelo método do "head-space", adaptado por Rezende (Material e Métodos).

Quadro 8 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja da variedade IAC-100 submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles

Tempo (horas)	Níveis de aldeídos totais - Absorvância em 635 nm			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	0,9751 ^{1/} ± 0,0845	0,8944 ± 0,010	0,949 ± 0,030	0,9294 ± 0,011
6	0,7166 ± 0,0190	0,7233 ± 0,022	0,7733 ± 0,034	0,7073 ± 0,014
12	0,7061 ± 0,0230	0,7056 ± 0,034	0,7656 ± 0,011	0,7495 ± 0,021
24	0,7124 ± 0,0130	0,7181 ± 0,011	0,7652 ± 0,011	0,7831 ± 0,009
48	0,8661 ± 0,0210	0,9005 ± 0,006	0,8391 ± 0,0106	0,9037 ± 0,009
168	0,8585 ± 0,0090	1,0724 ± 0,028	1,0201 ± 0,001	1,1476 ± 0,012

^{1/} Valores são a média das análises de três repetições ± desvio-padrão.

Quantidade de folhas liofilizadas: 50,0 mg. Tampão de extração: fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. As determinações de hexanal foram realizadas por cromatografia gasosa, pelo método do "head-space", adaptado por Rezende (Material e Métodos).

Quadro 9 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja do genótipo IAC-100 TN submetidas a fermento mecânico, com seus respectivos controles

Tempo (horas)	Níveis de aldeídos totais - Absorvância em 635 nm			
	Controle da resposta local	Resposta local	Controle da resposta sistêmica	Resposta sistêmica
0	0,9249 ^{1/} ± 0,005	0,8726 ± 0,012	1,037 ± 0,040	1,0545 ± 0,004
6	0,6755 ± 0,0276	0,7177 ± 0,019	0,7344 ± 0,017	0,7636 ± 0,030
12	0,6746 ± 0,0100	0,6640 ± 0,021	0,7659 ± 0,015	0,7476 ± 0,015
24	0,7020 ± 0,0120	0,7523 ± 0,011	0,7560 ± 0,012	0,7401 ± 0,029
48	0,6953 ± 0,0220	0,7275 ± 0,021	0,7480 ± 0,024	0,7192 ± 0,009
168	0,8944 ± 0,0080	0,9795 ± 0,067	1,0156 ± 0,005	0,9765 ± 0,067

^{1/} Valores são a média das análises de três repetições ± desvio-padrão.

Quantidade de folhas liofilizadas: 50,0 mg. Tampão de extração: fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. As determinações de hexanal foram realizadas por cromatografia gasosa, pelo método do "head-space", adaptado por Rezende (Material e Métodos).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi avaliada a capacidade da planta de soja de responder ao ferimento mecânico através da via das lipoxigenases. Para isso, foram analisados o efeito do ferimento mecânico em folhas de soja sobre a atividade do “pool” de lipoxigenases e os possíveis produtos finais da via das lipoxigenases. Foram utilizados dois genótipos: um normal (variedade IAC-100) e outro com ausência completa de lipoxigenases em suas sementes (linhagem IAC-100 TN). As plantas dos dois genótipos foram submetidas a ferimento mecânico e coletadas 0, 6, 12, 24, 48 e 168 horas após o ferimento. Foram analisadas a resposta local (folíolos da primeira folha trifoliolar) e a resposta sistêmica (folíolos da segunda folha trifoliolar) de plantas dos dois genótipos.

Os resultados do estudo bioquímico e cinético das lipoxigenases de folhas para os dois genótipos analisados, utilizando ácido linoléico como substrato, revelaram:

- Dois picos mais acentuados de atividade de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0 nos testes e nos respectivos controles, tanto na resposta local quanto na sistêmica. Nos testes, houve aumento de atividade em resposta ao ferimento mecânico.
- Aumento da atividade de lipoxigenase tanto na resposta local quanto na sistêmica, nos dois genótipos estudados, a pH 4,5 e 6,0.
- O valor da temperatura ótima das isoenzimas de lipoxigenases a pH 6,0, em respostas local e sistêmica, foi de 25 °C.

- Os valores de K_M aparente das isoenzimas de lipoxigenases foliares, em relação aos controles, aumentaram consideravelmente seis horas após o ferimento e diminuiu a partir de 12 horas, tendo em 168 horas o menor valor tanto na resposta local quanto na sistêmica, mostrando, assim, respostas local e sistêmica nos dois genótipos estudados.

- O menor valor de K_{Mapp} em 168 horas após ferimento nas respostas local e sistêmica de ambos os genótipos sugerem uma alteração do “pool” de lipoxigenases em resposta a ferimento.

- Os resultados dos dados de cinética enzimática são semelhantes para os dois genótipos estudados, indicando, possivelmente, que a remoção genética das lipoxigenases de semente não está interferindo na expressão dos genes que codificam para as lipoxigenases que atuam no mecanismo de defesa da planta de soja contra danos causados por ferimento.

- Nos dois genótipos analisados, ocorreu aumento de inibição trípica após ferimento, tanto na resposta local quanto na sistêmica. Os valores em mg de tripsina inibida/grama de proteína foram maiores nos testes do que nos controles em 6, 12, 24, 48 e 168 horas após ferimento mecânico.

- Ocorreu resposta da planta de soja a ferimento, através do aumento de inibidores de proteases, tanto na variedade quanto no genótipo IAC-100 TN. Assim, pode-se também verificar que a remoção de lipoxigenases de semente de soja não alterou a produção de inibidores de proteases nas folhas.

- Os resultados apresentados sugerem ainda um possível mecanismo de defesa da planta de soja contra ferimento, que passa pela via das lipoxigenases e tem como produto final inibidores de proteases.

- Ocorreu ligeiro aumento dos níveis de hexanal e de aldeídos totais 48 e 168 horas após tratamento, nos dois genótipos estudados. Esses resultados sugerem que o mecanismo de defesa de plantas de soja contra ferimento, através da via das lipoxigenases, não passa pelo caminho que tem como produto final aldeídos (Figura 2).

- É possível que a planta, em resposta ao ferimento mecânico, ative a “via das lipoxigenases” e, após a formação de hidroperóxidos, ocorra a ação enzimática de uma hidroperóxido ciclase, seguindo a via de produção de ácido jasmônico e subsequente ativação e expressão de genes que expressam inibidores de proteases, uma vez que ferimento mecânico é uma simulação da injúria, provocada por insetos herbívoros, na planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A., FARKAS T., SOMLYAI G., KIRÁLY Z. Consequence of O₂ – generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** n.34, p.13-26, 1989.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M LAASKO, S. Lipoxygenase from soybean. **Meth. Enzymol.**, n.71, p.441-451,1981.
- BELL, E., MULLET, J. E. Characterization of an Arabidopsis Lipoxygenase gene responsive to methyl jasmoate and wounding. **Plant Physiol.** n.103, p.1133-1137, 1993.
- BELL, E., MULLET, J. E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Mol. Gen. Genet.** n.230, p.456-62, 1991.
- BOHLAND, C., BALKENHOHL, T., LOERS G., FEUSSNER I., GRAMBOW, H. J. Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, n.114, p.679-685, 1997.
- BUNKER T.W., KOETJE D.S., STEPHENSON, L.C., CREELMAN R.A., MULLET, J.E., GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, n.7, p.1319-1331, 1995.
- CHRISTOPHER, J.P., PISTORIOUS, E.K. AXELROD, B. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. **Biochem. Biophys. Acta**, n.284, p.54-62, 1972.

- CREELMAN, R.A. , BELL, E., MULLET, J.E. Involvement of lipoxygenase like enzyme in abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiolog.**, n.99, p.1258-1260, 1992.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.** n.48, p.355-381, 1997.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proc. Natl. Acad. Sci.** n.92, p.4114-4119, 1995.
- CROFT, K.P.C., JÜNTTER, F., SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. **Plant Physiolog.**, n.101, p.13-24, 1993.
- DAMMANN, C, ROJO E., SÁNCHEZ-SERANO,J.J., Absciscic acid and Jasmonic activate woung-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant Journal.**,v.11, n.4, p.773-782, 1997.
- DOULLIARD R., BERGEROM E. Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in young leaves. **Plant Sci. Lett.** n.22, p.263-268, 1981.
- DROILLARD, M.J., ROUET-MAYER, M.A., BUREAU, J.M., LAURIÈRE, C. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. **Plant Physiol.** n.103, p.1211-1219, 1993.
- ESKIN, N., GROSSMAN, S., PINSKY, A. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. **Rev. Food Sci. Nutr.** p.91-41, 1977.
- ESTERBAUER, H., SCHAUAR, J.R., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehyde. **Free Radical Biol. Med.** n.11, p.81-128, 1991.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the syntesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, n.4, p.129-34, 1992.
- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. Special Report 80. **Cooperative Extension Service**, Iowa State University, Ames, Iowa, 1977, 11p.
- FERRASSON, E., QUILLIEN, L., GUEGUEM, J., Proteinase inhibitors from pea seeds: purification and characterizaction. **Jornal. Agric. Food Chem**, 1997, n.45, p.127-131.

- FEUSSNER, I., HAUSE B., VOROS K., PARTHIER B., WASTERNAK, C. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*) . **Plant jornal.** n.7, p.947-957, 1995.
- FEUSSNER, I., KINDL, H. A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. **FEBS Lett.** n.298, p.223-225, 1992.
- FEUSSNER, I., KUHN, H. The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reacion specificity. **FEBS Lett.** n.367, p.12-14, 1995.
- FIDANTSEF A., BOSTOCK, R.M., CHOI, D. Temporal expression of HMG-CoA reductase genes and lipoxygenase in potato leaves in response to fungal infection, methyl jasmonate, or the elicitor arachidonic acid. **Plant Physiol. Suppl.** n.101, p.102-113, 1993.
- GAFFNEY, B. J. Lipoxygenases: Structural Principles and Spectroscopy. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** n.25, p.431-59, 1996.
- GALLIARD, T., CHAN, H.W.S. Lipoxygenases. In: Stumpf, P.K. (Ed). The biochemistry of plants a comprehensive treatise. New York, **Academic Press**, p.131-157, 1980.
- GALLIARD, T., PHILLIPS, D.R. Lipoxygenases from potato tubers. Partial purification and properties of na enzyme that specifically oxigenates the 9-positon of linoleic acid. **Journal Biochemistry**, n.124, p.431-438, 1971.
- GARDNER, H. W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochem. Phys. Acta**, n.1084, p.221-239,1991.
- GEERTS, A., FELTKAMP, D., ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosun*. **Plant Physiol.**, n.105, p.267-277, 1994.
- GIRI, P.A. , HARSULKAR, M.A., DESHPANDE, V.V., SAHINI, N.S., GUPTA, S.V., RANJEKAR, K.P., Chickepea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiol.**, n.116, p.393-401, 1998.
- GRAYBURN, WS., SCHNEIDER, G.R., HAMILTON - KEMP, T.R., BOOKJANS,G., ALI K., HILDEBRAND, D.F. Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. **Plant Physiol.**, n.95, p.1214 -1218, 1991.
- GRIMES, H.D., KOTJE, FRANCESCHI, V.H. Expression, activity and cellular acumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. **Plant physiol.**, n.100, p.433-436, 1992.

- GRIMES, H.D., TRANBARGER, T.J., FRANCESCHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. **Plant physiol.**, n.103, p.457-466, 1993.
- GROSSMAN, S., BEM-AZIZ, A., ASCARELLI I., BUDOWSKI, P. Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves. **Phytochem.** n.11, p.509-514, 1972.
- HATANAKA, A., KAJIWARA, T., SEKIYA, J., IMOTO, M., INOUE, S. Participation and properties of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. **Plant, Cell Physiol.**, n.23, p.91-99, 1982.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases . **Physiologia Plantarum**, n.76, p.249-253, 1989.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plants Biochemistry and Physiology**, n.7, p.201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D.F., RODRIGUES, J.G., LEGG, C.S., BROWN, G.C., BOOKJANS, G. The effects of wounding and mite infestation on soybean leaf lipoxygenase levels. **Z. Naturforsch.** n.44c, p.655-659, 1989.
- KATO, T., OTHA, H., TANAKA, K., SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. **Plant Physiol.**, n.98, p.324-330, 1990.
- KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissues: expression and accumulation in leaves induced by bud removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiol.**, n.37, p.1063-1072, 1993.
- KLAUER, S.F., FRANCESCHI, V.R., KU, M.S.B. Protein compositions of mesophyll and paraveinal mesophyll of soybean leaves at various developmental stages. **Plant Physiol.**, n.97, p.1306-1316, 1991.
- LAGOKI, J.W., EMKEN, E.A., LAW, J.H., KÉZDY, F.J. Kinetic analysis of the action of soybean lipoxygenase on linoleic acid. **Journal. of Biol. Science**, n.251, p. 6001-6006, 1976.
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.2, p.87-92, 1996.
- LEATHERBARROW, R. J. Enziffiter manual. **Biosoft. London**, p.13-42, 1987.

- LEONI, O., IORI, R., PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxygenase in germinating sunflower seeds. **Journal. of Food Science**, n.50, p.88-92, 1985.
- MACK, A.J. PETERMAN. T. K., SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics Biological and Medical Research**, n.13, p.127-154,1987.
- MACRÍ, F., BRAIDOT, E., PETRUSSA, E., VIANELLO, A. Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. **Biochem. Biophys. Acta**, n.1215, p.109-114, 1994.
- MAHANTA, P.K., PRADIP, T., BHUYAN, L.P., TAMULI, P. Comparison of lipoxygenase activity and composition in various harvests northeastern indian tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.43, n.1, 208-214, 1995.
- MAUCH, F., KMACL, A., SCHAFFRATH,U., VOLRATH, S., GORLACH, J., WARD, E., RYALS,J., DUDLER, R. Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. **Plant Physiol.** n.114, p.1561-1566, 1997.
- MELAN, M. A., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS K. R.,PETERMAN, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, n.101, p.441-450, 1993.
- MINGUEZ-MOSQUEIRA, M.I., JAREN-GALAN, M., GARRIDO-FERNANDEZ, J. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. **Phytochemistry**, n.32, p.1103-1108, 1993.
- MUELLER, J.M. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, n.100, p.653-663, 1997.
- NELLEN, A., ROJAHN B., KINDL, H. Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. **Z. Naturforsch**, n.50, p.29-36, 1995.
- OCAMPO, C.A., MOERSCHBACHER B., GRAMBOW, H.J., Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. **Z. Naturforsch**, n.41c, p.559-563, 1986.
- OHTA, H., IDA, S., MIKAMI, B., MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant Cell Physiol.**, v.22, n.5, p.911-918, 1986.
- OHTA, H.,SHIDA, K., PENG, Y.L., FURUSAWA, I., SHISHIYAMA, J., AIBAR, S., MORITA, Y.A. Lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnapor grisea*. **Plant Physiol.**, n.97, p.94-98, 1991.

- PARÉ, W.P., TUMLINSON, H.J. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiol.**, n.114, p.1161-1167, 1997.
- PARK, T.K., POLLACO, J.C. Distinct lipoxygenase species appear in leaves hypocotiles/radicles of germinating soybean. **Plant Physiol.**, n.90, p.285-290, 1989.
- PAUTOT, V., HOLZER, F.M., WALLING, L.L. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I e II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, n.3, p.284-292, 1991.
- PEÑA-CORTÉS, H., MERTENS, R., WILLMITZER, L. Absciscic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitors II gene potato and tomato. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n.86, p.9851-9855, 1989.
- PEÑA-CORTÉS, H., SANCHES-SERRANO, J.J., MERTENS, R., WILLMITZER, L. Absciscic-deficient plants do not accumulate inhibitors II following systemin treatment. **Planta**, 198, 447-451, 1996.
- PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. Behavior of lipoxygenase during establishment, senescence, and rejuvenation of soybean cotyledons. **Plant Physiol.**, n.31, p.313-340, 1985.
- PINSKY, A., GROSSMAN S., TROP M. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, 36: 571-572, 1971.
- REINBOTHE, C., PARTHIER, B., REINBOTHE, S. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. **Planta**, n.201, p.281-287, 1997.
- REZENDE, S.T., FONTES, E.P.B., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G., SEDIYAMA, T. n-Hexanal production in soybean meals from genotypes lacking lipoxygenase L₁ and L₃ as compared to the normal variety. **Arq. de Biol. e Tec.**, n.29, p.571-579, 1986.
- RICKAUEAR, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., VÉRONÉSI, C., GRIMAL, H., ESQUERRÉ-TUGYÉ, M.T. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. **Planta**, n.202, p.155-162, 1997.
- RICKAUEAR, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., ESQUERRÉ-TUGYÉ, M.T. Regulation of proteinase production in tobacco cells by fungal elicitors and methyl jasmonate. **Plant Physiol. Biochem.**, v.30, n.5, p.579-584, 1992.
- ROJAS, M.L., MONTES, G., OCAMPO, C.A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, n.43, p.209-219, 1993.

- ROSAHL, S. Lipoxygenase in plants – Their role in development and stress response. **Z. Naturforsch.**, n.51, p.123-138, 1996.
- SANZ, L.C., PÉREZ, A G., OLÍAS, J.M. La lipoxigenasa en el reino vegetal I. Propiedades. Instituto de la grasa y sus derivados. **Informacion**, n.43, p.231-290, 1992.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The differential expression of wound - inducible lipoxygenase genes in soybean leaves - **Plant Physiol.**, n.110, p.287-299, 1996.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The lipoxygenase isozymes in soybean [*glycine max* (L.) Merr.] changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiol.**, n.107, p.535-543, 1995.
- SCHILSTRA, M.J., VELDINK, G.A., Vliegenthart, F.G. Kinetic analysis of the induction period in lipoxygenase catalysis. **Biochemistry**, n.32, p.7686-7691, 1993.
- SCHWEIZER, P, BUCHALA, P.S., SESKAR, M., RASKIN, I., MÉTRAUX, J.P. Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack a concomitant increase in endogenous acid levels. **Plant physiol.**, n.114, p.79-88, 1997.
- SHIBATA, D., STECZKO, J., DIXON, J.E., HERMODSON, M.J., YAZDANPARAS, R., AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. **J. Biol. Chem.**, n.262, p.10080-10085, 1987.
- SIEDOW, J.N. Plant Lipoxigenase: structure and function. Annu. Revision Plant Physiol. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n.42, p.145-188, 1991.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, n.15, p.76-85, 1985.
- SMITH, W.L., LANDS, W.E.M. Oxigenation of unsaturated fatty acids by soybean. **J. Biol. Chem.**, n.247, p.1038-1047, 1972.
- STEPHENSON, L.C., THOMAS, B.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol.**, n.116, p.923-933, 1998.
- TAPPEL, A .L. Lipoxydase. **Methods Enzymol.**, n.5, p.539-542, 1962.

- TRANBARGER et al., The soybean 94 - kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **The Plant Cell**, v.3, p.973-987, 1991.
- VAUGHN, S.F., GARDNER, H.W. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. **J. Chem. Ecol.**, v.19, n.10, p.2337-2345, 1993.
- VERNOOY-GERRITSEN, M., LEUSSEN, J.L.M., VELDINK, G.A.Y., VLIEGENTHART, J. F.G. Intracellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein a-colloidal gold complexes. **Plant Physiol.**, n.76, p.1070-1079, 1984.
- VICK, B., ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. (Eds.). **The Biochemistry of Plants**. v.9, p.53-97, 1987.
- WARDALE, D.A., GALLIARD, T. Further studies on the subcellular localization of lipid-degrading enzymes. *Phytochemistry*, n.16, p.333-338, 1977.
- WARDALE, D.A., LAMBERT, E.A. Lipoxygenase from cucumber fruit: localization and properties. **Phytochem.**, v.19, p.1013-1016, 1980.
- WASTERNAK, C., PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. Reviews, **Trends in plants science**. v.2, n.8, p.302-307, 1997.
- YAMAMOTO, H., TANI, T. Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to *Puccinia Coronata pv avenae*. **Journal Phytopathol.**, n.116, p.329-337, 1986.
- ZHUANG H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A, HILDEBRAND, D.F. Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. **Plant Physiol.**, n.100, p.80-87, 1992.
- ZIMMERMAN, D.C., CODRON, C.D. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-trans-10-dodecenoic acid. **Plant Physiol.**, n.63, p.2857-2541, 1979.