

ALESSANDRA DE PAULA CARLI

**EFEITO DO ÁCIDO JASMÔNICO NA SÍNTESE DE LIPOXIGENASE E DE
INIBIDORES DE PROTEASES EM SEMENTES DE EXPLANTES DE SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
OUTUBRO - 1999

A Deus, esperança e graça em todos os momentos.
Ao Roberto, pelo apoio, pelo companherismo e pela compreensão.
À Gabriela, razão da minha vida.
Aos meus pais, Geraldo e Inês, por colocar-me à luta.
Aos meus sogros Nilzon e Tereza, pelo incentivo e pelo exemplo de vida.
Àqueles que acreditaram, confiaram e principalmente me ajudaram a chegar
até aqui.
A todos estes, dedico.

AGRADECIMENTO

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

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

À Fundação Educacional de Caratinga, pelo incentivo e pelo apoio ao longo do curso.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pelas ótimas condições de trabalho proporcionadas e pelo exemplo de dedicação.

Aos colegas Willian, Francis, Pedro, Vilmar, Angélica, Aloísio, Jander, Wilson, Ricardo, Jorge, César, Ailton, Raquel e Ronan, pelo agradável convívio e pela ajuda no desenvolvimento da tese.

BIOGRAFIA

ALESSANDRA DE PAULA CARLI, filha de Geraldo Ventura dos Santos e Inês Maria de Paula dos Santos, nasceu em 9 de maio de 1973, em Ubá, Estado de Minas Gerais.

Em dezembro de 1995, obteve o título de Bacharelado e Licenciatura Plena em Química, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 1996, fez aperfeiçoamento em Bioquímica Molecular na Embrapa/CNPMS de Sete Lagoas - MG.

Em março de 1997, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica, na área de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese no dia 7 de maio de 1999.

CONTEÚDO

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Características gerais do ácido jasmônico	3
2.2. Lipoxigenase como uma enzima envolvida na síntese de ácido jasmônico	5
2.3. Ácido jasmônico envolvido na síntese de inibidores de proteases .	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material vegetal e condições de cultivo	13
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> em condições semi-assépticas	14
3.3. Determinação de matéria seca	16
3.4. Obtenção de extrato da semente	16
3.5. Análise eletroforética de KTI e LOX	16
3.6. Testes colorimétricos para detecção de lipoxigenases	18
3.7. Determinação de atividade de lipoxigenases	18
3.8. Determinação de proteínas nos extratos de grãos de soja	19

3.9. Determinação de inibidores de proteases	20
3.10. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. RESUMO E CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

EXTRATO

CARLI, Alessandra de Paula, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 1999. **Efeito do ácido jasmônico na síntese de lipoxigenase e de inibidores de proteases em sementes de explantes de soja.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Maria Goretti de Almeida Oliveira e Everaldo Gonçalves de Barros.

Este trabalho consistiu em utilizar o sistema de cultivo de explantes de soja para estudar o efeito do ácido jasmônico, no sistema “in vitro”, em sementes de linhagens normais e com ausência de lipoxigenases, derivados das variedades CAC-1, Itamarati e Cristalina na síntese de lipoxigenases (LOX) e do inibidor de protease Kunitz (KTI). Ácido jasmônico foi adicionado aos meios de cultivo em que os explantes foram cultivados. As avaliações basearam-se nos efeitos do ácido jasmônico sobre o conteúdo do inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e da atividade específica de LOX1 e LOX 2 e 3. Os explantes foram cultivados em meios de cultura líquidos, sob condições semi-assépticas, os quais continham nutrientes minerais, glutamina e sacarose. O pH da solução nutritiva foi mantido em torno de 5,0. Cada explante constou de uma vagem completamente expandida, com duas sementes de, aproximadamente, 100 mg, conectada a um segmento de caule de 45 mm de comprimento. Os explantes foram excisados a partir do quinto nó, da base para o ápice. Os tratamentos testados foram: A = 0, B = 200 e C = 400 μ M de ácido

jasmônico. O experimento foi conduzido sob irradiância de 80 μmol de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 25°C, por 8 dias. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados obtidos evidenciaram que nos tratamentos que receberam ácido jasmônico notou-se um aumento significativo da atividade específica de LOX e no conteúdo de KTI em sementes de variedades normais. No entanto, em explantes de linhagens triplo-nulas (desprovidas de LOX), o ácido jasmônico não aumentou o conteúdo de KTI. Estes resultados sugerem, fortemente, que a síntese de inibidores de proteases em sementes de soja é induzida por ácido jasmônico via indução da síntese de lipoxigenases e que, em sementes triplo nulas esse efeito não é observado devido à ausência completa de lipoxigenases.

ABSTRACT

CARLI, Alessandra de Paula, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October 1999. **Effect of jasmonic acid in the synthesis of lipoxygenases and inhibitors of proteases in soybean seeds explants.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Everaldo Gonçalves de Barros.

This work consisted in utilizing a soybean explant culture system to study the effect of jasmonic acid, *in vitro* system, in normal lineages and in absence of lipoxygenases, derived from varieties, CAC-1 Itamarati and Cristlina in the lipoxygenases synthesis and of proteases inhibitors. The explants were cultured in liquid medium, under semi-aseptic conditions containing mineral nutrients, glutamine and sucrose. The pH of the nutritive solution was maintained about 5.0. Each explant includes a completely expanded bean, with two seeds of approximately 100 mg each one, connected to a stem segment of 45 mm length. The explants were excized off from the fifth node to the base to apex. The evaluations were based on the effects of Jasmonic Acid, added to the culture medium on the level of trypsin inhibitor and in the specific activity of Lipoxygenase 1,2 and 3. Tested treatments were 0, 200 and 400 μM of jasmonic acid. The experiment was conducted under irradiance of 80 mmol of fotons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C , during 8 days. The entirely randomized experimental design was used with four repetitions. The results that were obtained showed

that jasmonic acid caused a significant increase of the specific activity of lipoxygenases and in the level of protease inhibitors in seeds of normal genotypes. However, in explants of triple-null lineages (without lipoxygenases), the jasmonic acid did not provoke an increase in the level of protease inhibitors. These results suggest that the synthesis of protease inhibitors in soybean seeds is induced by jasmonic acid through the synthesis induction of lipoxygenases.

1. INTRODUÇÃO

Os inibidores de proteases são considerados os principais fatores antinutricionais da soja, ocorrendo em quantidades relativamente elevadas em suas sementes, onde representam cerca de 6% das proteínas totais. A redução da inibição de atividade trípica e quimiotrípica por extratos de sementes de soja de linhagens com ausência de lipoxigenases comparadas com variedades normais forneceu evidências de que a eliminação genética de lipoxigenases acarreta diminuição acentuada na síntese dos inibidores de proteases (CARVALHO,1997).

Em tecidos foliares, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de jasmonatos, que, por sua vez podem induzir a síntese de inibidores de proteases em resposta à ferimentos. Esta via metabólica foi evidenciada em folhas de tomate por FARMER e RYAN (1992).

O ácido jasmônico e seus metil ésteres, produzidos pela ação das lipoxigenases, são mensageiros químicos potenciais (ANDERSON et al.,1989). Eles são considerados moléculas sinais por sua capacidade de promover senescência (CREELMAN, et al. 1995). A senescência induzida por ácido jasmônico em tecido foliar de várias espécies vegetais tem sido demonstrada pela promoção no decréscimo do conteúdo de clorofila, pelo aumento na respiração e proteólise, pela redução na taxa de fotossíntese e da atividade de enzimas do cloroplasto (WEIDHASE et al., 1987).

Outra possível função atribuída ao metil jasmonato é a de regulador do crescimento e desenvolvimento de plantas (CREELMAN e MULLET, 1997). Na realidade, o jasmonato pode exercer efeitos antagônicos, ou seja, inibir ou promover o crescimento e o desenvolvimento, em plantas ou de órgãos de plantas (FRANCESCHI e GRIMES, 1991). Ácido jasmônico na concentração de 10^{-7} a 10^{-6} M estimula o crescimento e exerce efeito inibitório acima de 10^{-5} M (BELL e MULLET, 1991).

Um importante papel de jasmonato parece estar relacionado com a defesa de plantas, no qual induz a síntese de inibidores de proteases em folhas, submetidas ao ataque de insetos e atuam como intermediários na resposta induzida pelo peptídeo sistemina (KODA e KIHUTA, 1994) .

Ácido jasmônico pode complementar o grupo de fitohormônios clássicos, pois influencia uma multiplicidade de processos fisiológicos de plantas (PARTHIER, 1993). O nível de ácido jasmônico em plantas varia em função do tipo de células, tecido e estágio de desenvolvimento e em resposta a vários estímulos ambientais (WASTERACK e PARTHIER, 1997).

A origem biossintética do ácido jasmônico e sua estrutura similar aos eicosanóides em mamíferos são consistentes com seu papel de molécula regulatória, derivada de lipídeo, na expressão de genes em plantas (GARDNER, 1995).

Tem sido observado que em plântulas de soja, metil jasmonato tem várias funções, que podem incluir: assimilação e partição de nitrogênio, regulação da expressão de genes das proteínas de reserva vegetativa, sinal de transdução de estresses, modulação do fotocontrole na biossíntese de antocianina e indução dos genes que expressam inibidores de proteases (FRANCESCHI e GRIMES, 1991).

Os experimentos realizados neste trabalho visaram otimizar um sistema *in vitro* de cultivo de explantes que permitisse, com base no modo de ação do ácido jasmônico, estudar o efeito deste composto, na síntese de inibidores de proteases e atividade de lipoxigenases em sementes de soja com e sem lipoxigenases, em face da inexistência de estudos na literatura sobre a avaliação dos efeitos do ácido jasmônico em sementes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais do ácido jasmônico

Diversos compostos químicos derivados de plantas foram identificados e podem regular a expressão dos genes que codificam os inibidores de proteases. Dentre eles, estão os oligouronídeos, ácido abscísico, metil jasmonatos, ácido jasmônico e sistemina (polipeptídeo com 18 resíduos de aminoácidos) (KODA et al., 1994).

Metil jasmonatos foram primeiramente isolados e identificados quimicamente como um constituinte essencial do óleo de *Jasminum grandiflorum* (DEMOLE et al., 1962). Metil jasmonatos são compostos lipofílicos, voláteis à temperatura ambiente. Esta volatilidade pode ser um fator importante na sua atividade fisiológica, pois ele pode agir como um hormônio gasoso em plantas, análogo ao etileno (FARMER e RYAN, 1990).

A base da estrutura química que caracteriza o grupo jasmonatos é um anel de ciclopentanona. A molécula de ácido jasmônico apresenta dois centros quirais localizados no C₃ e C₇, que geram quatro possíveis estereoisômeros na configuração absoluta R ou S (WASTERACK e PARTHIER, 1997). A estrutura orgânica fisiologicamente ativa dos jasmonatos é: anel pentanona planar, uma cadeia pentenil inserida no C₇; um acetil no C₃ e um grupo carbonila no C₆. A redução do grupo carbonila para um grupo hidroxila leva a

formação do ácido cucúrbico e seus derivados (WASTERNACK e PARTHIER., 1997).

Ácido jasmônico é estruturalmente similar aos eicosanóides como as prostaglandinas em espécies animais. Estas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (GARDNER, 1995) e o ácido jasmônico é sintetizado a partir do ácido linolênico. MULLER (1997) mostrou que a aplicação de ácido linolênico em plantas de soja resulta no acúmulo de ácido jasmônico, indicando que o nível de ácido linolênico pode determinar a taxa de síntese do ácido jasmônico.

PENÃ-CORTÉS et al. (1995) propôs um modelo de produção e de ação de ácido jasmônico (AJ) e ácido abiscísico (ABA) em tomateiro. De acordo com este modelo o polipeptídeo sistemina estimularia um aumento de ABA em folhas tratadas com ácido jasmônico. O aumento nos níveis de ABA endógeno ativaria a biossíntese de ácido jasmônico pela via dos octadecanóides. Esses hormônios apresentam similaridades em suas estruturas, podem inibir crescimento, promover senescência e atuarem como moléculas sinais que ativam genes de inibidores de proteases e de catepsina D, genes de proteínas de reserva vegetativa, genes que codificam para sistemina, leucina aminopeptidase e treonina deaminase, os quais acumulam sistemicamente após ferimento da planta. PRETROVIC et al. (1997) mostraram o papel do ácido jasmônico na interação vírus-planta demonstrando que a infecção viral sistêmica induz a síntese de jasmonatos endógenos.

Jasmonatos estão envolvidos em vários processos fisiológicos. Em quase todos, os sintomas induzidos por metil jasmonatos coincide com o aparecimento de uma proteína denominada JIP (proteína induzida por jasmonatos). Os genes JIPs em cevada são transcritos quatro horas depois do tratamento com metil jasmonatos, causando sintomas como senescência e degradação da Rubisco(Ribulosebifosfatocarboxilase) e outros constituintes do cloroplasto, levando a morte celular (REINBOTHE e PARTHIER,1997).

Estresse osmótico ou tratamento com ácido abiscísico aumentam o nível de jasmonatos levando a síntese de uma proteína idêntica a JIP em folhas de ervilhas (LEHMANN et al., 1995).

Ácido jasmônico induz ambos, VSP- α e VSP- β , em folhas de soja (ANDERSON et al., 1989). Estudos imunológicos mostram que as VSP (proteína de reserva vegetativa) são encontradas em flores, folhas e

cotilédones nas formas diméricas α_2 , $\alpha\beta$ e β_2 . Trabalhos desenvolvidos por MULLET e MASON (1990) mostraram que a aplicação de 30 μM de ácido jasmônico ou metil jasmonato em folhas de soja intactas induziu aumento no nível de mRNA de VSP em folhas maduras, após 12 horas da aplicação.

A expressão de genes VSP é complexa e varia de acordo com o órgão, tecido, estágio de desenvolvimento e em resposta a ferimentos (MASON et al., 1991). Ácido jasmônico e metil jasmonatos são potentes indutores da expressão de genes VSP em folhas de soja (SIMPSOM e GARDNER, 1995). KATO et al. (1994) mostraram que a VSP 94, uma das três proteínas de reserva vegetativa que acumula em altos níveis em folhas de soja, é uma lipoxigenase (denominada LOX 4) e que metil jasmonatos induz a síntese de LOX 4 em folhas.

Estudos recentes mostraram que ácido jasmônico exógeno pode promover senescência, fechamento dos estômatos e induzir resistência sistêmica de plantas (CREELMAN e MULLET, 1997).

Evidências bioquímicas e genéticas têm demonstrado que ácido jasmônico é uma molécula sinal indispensável na via de transdução em resposta a ferimentos. SEO et al. (1997) mostraram que sistemina, ABA, etileno e sinais elétricos transmitem sinais de ferimentos provocando a síntese de ácido jasmônico. Este por sua vez provoca acumulação de inibidores de proteases.

2.2. Lipoxigenase como uma enzima envolvida na síntese de ácido jasmônico

Os produtos da ação de lipoxigenases, tais como traumatina, ácido jasmônico, olefinas e aldeídos voláteis têm papel no sinal transducional em resposta a ferimentos (ROSAHL, 1995).

Ácido jasmônico e metil jasmonato são derivados do ácido linolênico pela via das lipoxigenases (MULLER, 1997). O produto da ação da lipoxigenase sobre o ácido linolênico, o ácido 13-hidroperóxido linolênico, é transformado pela enzima hidroperóxido ciclase em ácido 12-oxo-fitodienóico, que é o precursor para a formação do ácido jasmônico (SIEDOW, 1991). Além da ação inicial da lipoxigenase, a biossíntese de jasmonato depende de

hidroperóxidos desidratases e de uma série de outros eventos, conforme pode ser observado na Figura 1, como ciclização, saturação de cadeias e oxidação, até estabelecer-se um equilíbrio de aproximadamente 9:1 entre (-) ácido jasmônico e (+) 7 – iso jasmonato (GRIMES et al., 1992).

Em tecidos foliares, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de jasmonatos, que, por sua vez, atuam na indução da síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimentos e, portanto, como uma reação à infestação por pragas e patógenos (FARMER e RYAN, 1992). Tratamentos de plantas com inibidores de lipoxigenases reduz a síntese de ácido jasmônico (BELL et al., 1995).

Lipoxigenases são dioxigenases que catalisam a oxigenação estereoespecífica do ácido linolênico em hidroperóxidos. Estudos recentes indicam que ferimentos e elicitores são sinais extracelulares na via da lipoxigenase. Estes sinais provocam ativação de lipases que contribuem na degradação da membrana iniciando a via octadecanóide para síntese de ácido jasmônico (GARDNER, 1995).

Em folhas de plântulas de soja, GRIMES et al. (1992) mostraram que metil jasmonatos induz a expressão e acúmulo de lipoxigenases em vários tipos de células.

AXELROD et al. (1981) isolaram as lipoxigenases de semente de soja em quatro isoenzimas distintas, que foram designadas LOX-1, LOX-2, LOX-3a e LOX-3b. Contudo, existem marcadas similaridades tanto no comportamento quanto na composição das isoenzimas LOX-3a e LOX-3b e, portanto, os autores consideram, para efeito analítico, a existência de somente uma isoenzima, a LOX-3. As três isoenzimas são globulares, solúveis em soluções salinas diluídas, sendo cada uma formada por uma única cadeia polipeptídica (SIEDOW, 1991). As lipoxigenases de sementes de soja têm sido bastante estudadas, devido a sua importância na determinação da qualidade dos produtos de soja (HILDEBRAND, 1988).

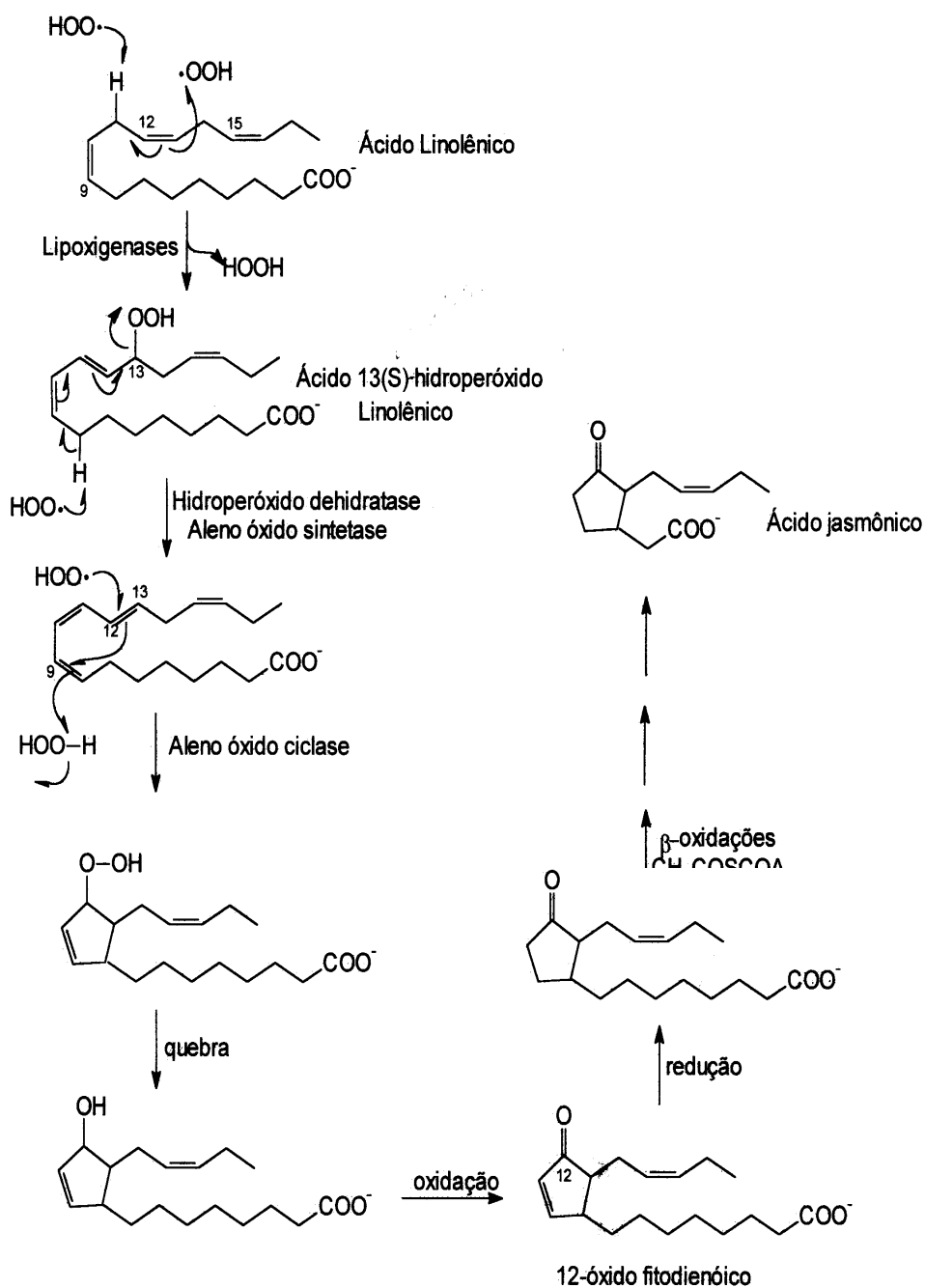


Figura 1 - Modelo proposto por VICK e ZIMERMANN (1984) para a biossíntese do ácido jasmônico.

A lipoxigenase LOX 1 de soja é a melhor caracterizada, sendo a mais efetiva na hidroperoxidação de ácidos graxos livres, enquanto que a LOX 2 e a LOX 3 são mais efetivas na hidroperoxidação de ácidos graxos neutros, como metil ésteres de ácidos graxos (BILD et al., 1977). Dentre as três lipoxigenases, a LOX 1 é a que apresenta maior atividade “in vitro” e maior estabilidade

térmica. As três lipoxigenases de sementes são proteínas monoméricas similares, com massas moleculares entre 94 e 97 kD, apresentando pontos isoelétricos distintos (HILDEBRAND, 1988).

As lipoxigenases de soja apresentam homologia estrutural com lipoxigenases de animais (GARDNER, 1995). No entanto, em plantas as lipoxigenases metabolizam o ácido linoléico e linolênico, enquanto que as lipoxigenases de animais metabolizam o ácido araquidônico produzindo prostaglandinas e leucotrienos.

Os produtos primários da ação das lipoxigenases, os hidroperóxidos de ácidos graxos, são moléculas altamente reativas, capazes de danificar sistemas biológicos (SCHEWE et al., 1986).

Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza. Atividade de lipoxigenases em soja não variam somente entre os diferentes órgãos e tecidos, mas também entre os diferentes estádios de desenvolvimento da planta (MULLER, 1997).

Uma das funções fisiológicas das lipoxigenases em plantas está relacionada com a síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimentos causados por pragas e patógenos nos mecanismos bioquímicos de defesa da planta. Em particular, a atividade de lipoxigenases aumenta durante interações incompatíveis em vários sistemas planta-patógeno (ROSAHL, 1995).

As lipoxigenases têm sua expressão aumentada em folhas, quando da ocorrência de ferimentos (BOHLAND et al., 1997). Plantas respondem a ferimentos por uma variedade de mecanismos de defesa, incluindo fortificação da parede celular, indução de genes de defesa, síntese de compostos antimicrobianos. O ácido jasmônico é um produto do caminho da LOX envolvido em resposta a ferimentos (PARTHIER, 1993).

O envolvimento dessas enzimas no crescimento e desenvolvimento tem sido proposto, uma vez que foi observado aumento na atividade de lipoxigenase em tecidos em fase de crescimento (MACK et al., 1987). A atuação de lipoxigenases no processo de senescência de plantas tem sido sugerido pela participação dessas enzimas na síntese de ácido jasmônico, que é, sabidamente, um promotor de senescência em células vegetais (VICK e ZIMMERMAN, 1984).

Metil jasmonato é um importante indutor de genes em resposta a ferimentos e regula a expressão de genes de lipoxigenases em várias espécies de plantas. As características deste composto indicam que ele é um forte candidato como um dos componente da via dos octadecanóides na defesa das plantas (HEITZ et al., 1997). O nível de lipoxigenase foliar é regulado por ácido jasmônico e metil jasmonato em soja (BELL E MULLET, 1991), em batata (GEERTS et al., 1994) e em ervilha (FEUSSNER et al., 1995).

2.3. Ácido jasmônico envolvido na síntese de inibidores de proteases

Os inibidores de proteases de grãos de soja são representados pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (BBI) (STAHLHUT e HYMOWITZ, 1983). O uso de produtos derivados de soja que contêm esses inibidores ativos, por tempo prolongado, em cobaias, promove o desenvolvimento de hiperplasia nodular pancreática e adenomas celulares (BRANDON e BATES, 1989). Cerca de 80% da inibição da atividade trípica em sementes de soja é causada pela ação do KTI (BRANDON et al., 1993). Por outro lado, tem sido mostrado que o BBI inibe forte e preferencialmente quimotripsina (BRANDON et al., 1987). O KTI foi o primeiro inibidor de proteases vegetais a ser amplamente estudado, tendo sido caracterizados sua estrutura, seu mecanismo de ação e sua significância para a saúde e nutrição humana e animal (BRANDON et al., 1987).

A estrutura primária do KTI é constituída por 181 resíduos de aminoácidos, com duas pontes bissulfídricas, que, uma vez rompidas, acarretam perda da atividade biológica desse inibidor. O BBI é constituído de uma única cadeia polipeptídica, com 71 resíduos de aminoácidos. Cada sítio inibitório da molécula está localizado numa alça de peptídio, com nove resíduos de aminoácidos. A molécula de BBI apresenta estrutura rígida e alta estabilidade térmica, que são garantidas por sete pontes bissulfídricas. Estima-se que o grupo de inibidores chamados genericamente de BBI de grãos de soja seja responsável por cerca de 20% da inibição de tripsina (BRANDON et al., 1993).

Em folhas, ferimentos resultantes de ataque de insetos levam ao aparecimento de sinais que ativam a síntese de inibidores de proteases no local do ferimento, como também em folhas mais distantes. Vários compostos para sinal sistêmico tem sido sugerido, incluindo ácido jasmônico, oligogalacturonídeos, ácido abscísico, sistemina e sinais elétricos (FARMER et al., 1994).

FARMER e RYAN (1992) pesquisaram vários intermediários octadecanóides da via das lipoxigenases. Como ácido jasmônico, estes intermediários podem ser aplicados nas plantas em baixas concentrações de maneira não destrutiva. Ácido linolênico, hidroperoxilinolênico e ácido fitodienóico foram todos indutores da síntese de inibidores do tipo I e II. A especificidade da ativação de genes de inibidores pelos intermediários do ácido jasmônico pode ser absoluta. Assim, octadecanóides bem como jasmonatos podem estar envolvidos no complexo sinal que regula a expressão de genes de defesa em plantas.

FARMER e RYAN (1992) demonstraram que em folhas de tomateiro a expressão gênica dos inibidores de proteases é regulada por jasmonatos.

No modelo proposto na Figura 2, o passo chave envolve a interação dos sinais extracelulares com os receptores da membrana plasmática levando a ativação de lipases e com liberação do ácido linolênico dentro do citoplasma. O ácido linolênico é convertido pela via das lipoxigenases à ácido jasmônico, o qual interage com um receptor e ativa a expressão de genes de inibidores de proteases.

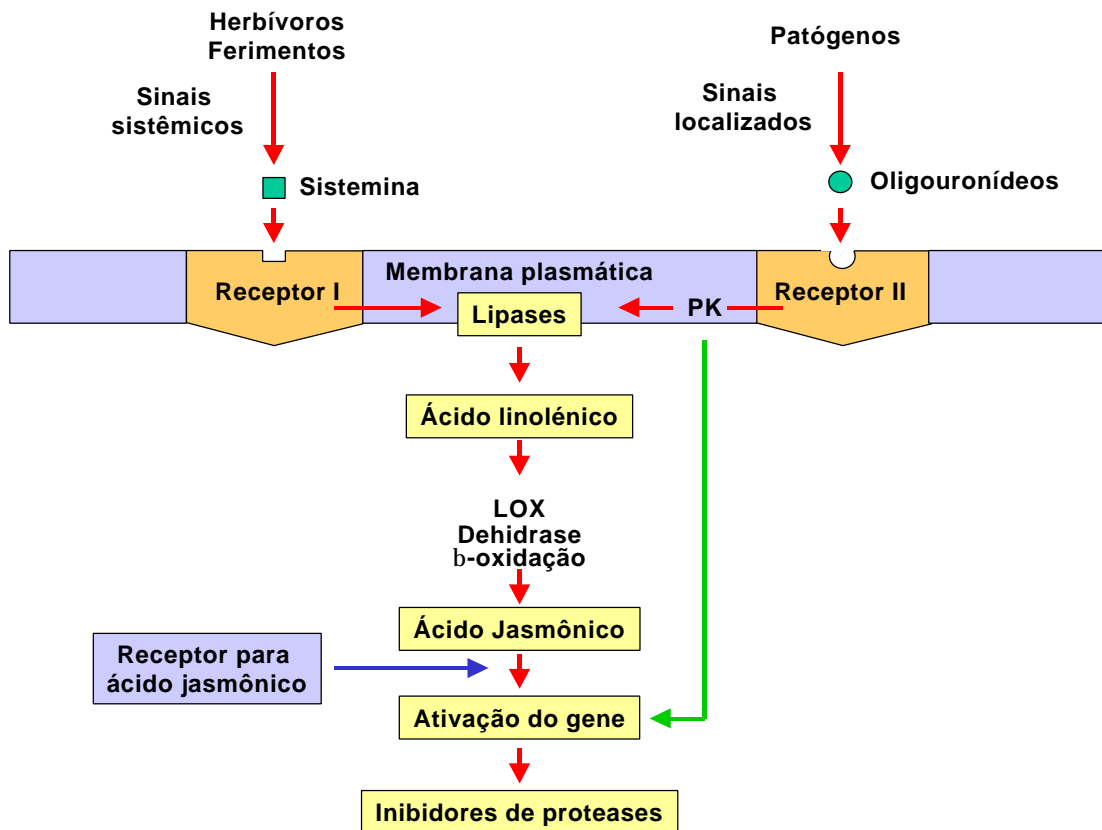


Figura 2 - Modelo da via de sinalização para expressão gênica de inibidores de proteases, proposto por FARMER e RYAN (1992).

FARMER et al. (1994) verificaram que a indução de inibidor de protease I em folhas de tomateiro em resposta a ferimentos foi fortemente inibida por DIECA (ácido dietilcarbâmico) que inibe a atividade de LOX. Isto demonstra que o intermediário hidroperóxido está envolvido no sinal para a ativação de genes de inibidores de proteases, da via octadecanóide.

RICKAUER et al. (1997) demonstraram que a indução da síntese de inibidores de proteases em células de folha de tabaco por ácido jasmônico era precedida por um aumento na atividade de lipoxigenases. Tem-se questionado se os inibidores de proteases e outras proteínas tem importante papel na proteção contra ataque por fungos. Estudos demonstraram que ferimentos e elicitores induzem a atividade de lipoxigenases (MELAN et al., 1993), indicando que a enzima pode estar envolvida na resposta contra a infecção.

O trabalho desenvolvido por SCHWEIZER et al. (1997) mostrou que plantas de arroz oriundas de sementes tratadas com ácido jasmônico ou de

sementes inoculadas com o fungo *Magnaporthe grisea* acumulam em suas folhas as proteínas PR1 (anti-fúngica), PR2 (β , 1,3 glucanase), PR3 (quitinase), PR5 (traumatina), PR9 (peroxidase), sugerindo um papel para o ácido jasmônico como molécula sinal no mecanismo de defesa à doença.

O ácido salicílico inibe a síntese de inibidores de proteases induzida por ferimentos, oligouronídeos, ácido jasmônico e sistemina, pois ele inibe a conversão do ácido 13-S-hidroperóxido linolênico para 12-oxo-fitodienólico, bloqueando a síntese de ácido jasmônico (DOARES et al., 1995).

DAMMANN et al. (1997) submetem raízes de batata a ferimento mecânico e a tratamentos com ABA, ácido jasmônico e água (controle). Quando as raízes foram tratadas com ácido jasmônico, foram observados altos níveis de mRNA de inibidor de protease II, inibidor de catepsina D, leucina aminopeptidase e treonina deaminase nas folhas. Entretanto, nas raízes não tratadas não foi detectada quase nenhuma expressão destes mRNAs. Um novo gene homólogo de inibidor de protease (Pin II) específico da raiz se acumula nestes tecidos (reposta local), o qual não foi observado nas folhas (resposta sistêmica). Logo, estes dados sugerem a existência de uma complexa rede de transdução de sinais, que regulam os efeitos dos hormônios ABA e ácido jasmônico na expressão de genes induzidos por ferimentos nos diferentes órgãos da planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) das variedades comerciais Cristalina ,CAC-1 e Itamarati e de linhagens com ausência completa de lipoxigenases em suas sementes (TN), CR₄TN, U142TN e CAC-1TN), fornecidas pelo Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. As linhagens TN originaram-se de cruzamentos entre as variedades comerciais e o genótipo UFV TN do programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO.

As sementes foram semeadas em vasos de polietileno, contendo como substrato: solo misturado com esterco curtido, areia lavada, calcário dolomítico e superfosfato simples. O substrato foi desinfetado quimicamente com brometo de metila. Após germinação, as plântulas obtidas foram mantidas em casa-de-vegetação, sob condições naturais de luz, temperatura e umidade relativa. Após 10 dias, quando as plântulas apresentaram o primeiro trifolíolo completamente expandido, foi efetuado um desbaste, mantendo-se apenas duas plantas por vaso. As plantas foram irrigadas diariamente. As plantas permaneceram nestas condições até que o pericarpo formasse completamente e as sementes atingissem um peso fresco em torno de 100 mg cada.

As plantas foram, então, transferidas para uma casa de apoio para instalação do cultivo dos frutos de soja *in vitro*, em condições semi-assépticas, mantendo plantas *in situ*, como controle.

3.2. Cultivo *in vitro* em condições semi-assépticas

O cultivo de explantes em condições semi-assépticas seguiu a metodologia descrita por MOSQUIM e SODEK (1991). Cada explante foi constituído de uma vagem completamente expandida, contendo duas sementes de, aproximadamente 100 mg, conectada a um segmento de caule de 45 mm de comprimento (Figura 3a). Os explantes foram excisados a partir do quinto nó, da base para o ápice e cultivados em meios de cultivo líquidos, conservando-se o banho de gelo (Figura 3b).

Os volumes dos meios de cultivo foram de 6,5 mL por frasco, preparados segundo CHANDLER et al. (1983), para os macronutrientes e THOMPSON et al. (1977), para os micronutrientes. A solução de ferro, preparada a parte. A solução de FeEDTA foi preparada a partir da dissolução, a quente e em separado, de FeSO₄ (557 mg) e de Na₂EDTA (745 mg), procedendo-se à mistura posteriormente e complementando-se o volume final, para 100 ml, com água deionizada. Como fonte de nitrogênio foi utilizada glutamina. Como fonte de carboidratos, sacarose a 5% (p/v). O pH da solução nutritiva foi ajustado para 5,0. O experimento foi conduzido sob um nível de irradiância de 80 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C (Figura 3c). O ácido jasmônico foi obtido da SIGMA e adicionado nos meios de cultura líquidos no momento da instalação do experimento. O período de cultivo foi de 204 horas.

No experimento foram utilizadas as linhagens de soja descritas anteriormente, com ausência e presença de lipoxigenases. Estes genótipos foram analisados e selecionados, previamente, em laboratório.

Inicialmente, foram avaliados os efeitos de concentrações crescentes de ácido jasmônico na amplitude de 0 a 400 μM , em intervalos equidistantes de 50 μM , sobre o incremento de matéria fresca, atividade específica de

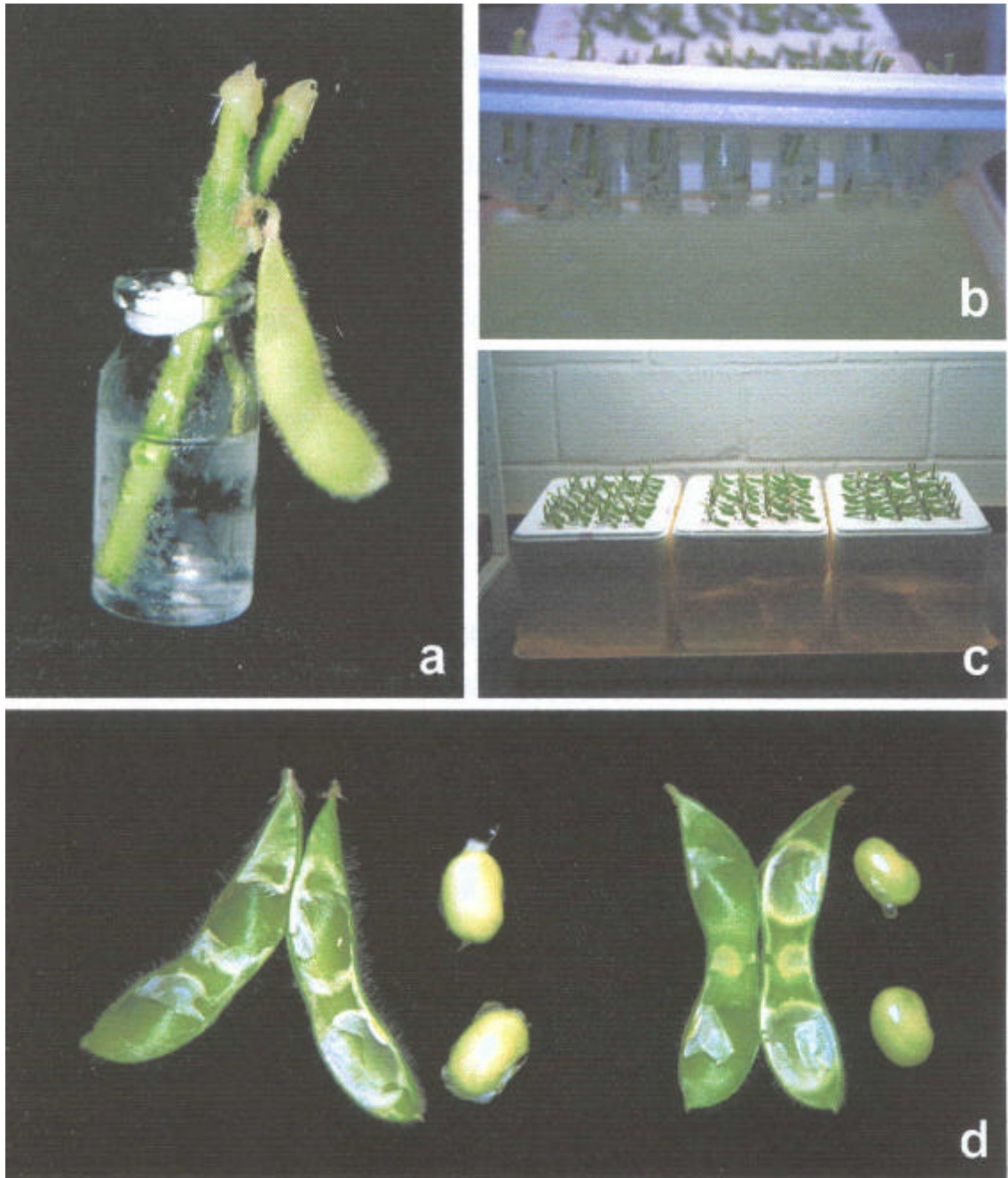


Figura 3 - Explante de soja constituído de uma vagem completamente expandida (a); cultivo em meio líquido com a manutenção de banho de gelo (b); condução do experimento (c); vagens separadas em pericarpo e sementes (d).

lipoxigenase e níveis de inibidores de proteases de sementes oriundas dos explantes cultivados *in vitro* da variedade Itamarati. Foram também testadas diferentes variedades (Cristalina, CAC-1 e Itamarati com e sem lipoxigenases nas sementes), com concentrações fixas de 200 μ M e 400 μ M de ácido jasmônico.

3.3. Determinação de matéria fresca

As vagens, uma vez colhidas, foram separadas em pericarpos e sementes (Figura 3d) e as massas frescas das sementes, correspondentes a cada repetição, foram determinadas em seguida. Logo após, as sementes foram congeladas em nitrogênio líquido, colocadas em papel-alumínio e armazenadas a -80⁰ C até a ocasião das análises bioquímicas.

3.4. Obtenção de extrato da semente

Amostras de 10 mg de sementes foram extraídas com tampão apropriado para cada análise. Para análise de KTI estas amostras foram maceradas em gral, com 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM. O extrato obtido foi centrifugado a 7.500 x g, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Para análise de LOX as amostras foram extraídas com 0,6 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 e o extrato centrifugado a 13.600 x g, por 20 minutos, a 4⁰C. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de atividade enzimática e nas análises eletroforéticas por SDS-PAGE.

3.5. Análise eletroforética de KTI e LOX

Foram utilizados géis de poliacrilamida contendo SDS, no sistema descontínuo descrito por LAEMMLI (1970):

a) Para análise de KTI o gel de concentração foi de 6% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl, 0,15 M, pH 6,8, contendo 0,4 % de SDS e o gel de separação foi de 14% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,9 M, pH 8,8, contendo 0,4 % de SDS. A corrida foi feita em cuba vertical com tampão de corrida contendo Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, glicina 0,192 M e 0,1 % de SDS.

b) Para análise de LOX o gel de separação foi de 9,0 % acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris 1,07 M, pH 8,8 contendo 0,4 % SDS e o gel de concentração 4,5% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo 0,4 % de SDS. A corrida foi feita em cuba vertical em tampão de corrida Tris-HCl, 0,075 M, pH 8,3, glicina 0,576 M, contendo SDS 0,1 %. Os géis foram corados com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. A imagem do gel foi fotodocumentada em equipamento Eagle Eye II (Stratagene) e analisada com “software” One Dscan (Scanlytics).

c) A partir do gel de lipoxigenase obtido do modo semelhante ao descrito acima fez-se a análise de “Western blotting”.

Após a separação, as proteínas foram transferidas a 100 V durante 1 hora, para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m, em aparelho BIO-RAD, usando tampão TGM. Este tampão é preparado usando 10% de tampão TG (3,03% Tris, 14,4% glicina) acrescido de 20% de metanol.

Após a transferência, a membrana foi lavada com TTBS (0,0015 M de NaCl, 0,01 M de Tris pH 7,6 e 500 μ L de Tween 20) por 30 minutos e depois em TBS + 3% de leite desnatado por 60 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo primário específico preparado pelo Laboratório de Proteína – BIOAGRO) diluído em TBS + 3% de leite desnatado (1:500) por uma noite, com agitação. Novamente foi lavada em TTBS por 3 vezes durante 5 minutos, incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina) diluído em TBS (1:30000 e 1:20000) por 2 horas, sob agitação. A membrana foi então lavada em TTBS por 5 minutos por 3 vezes e depois com água destilada por 30 segundos, corada com solução contendo 44 μ L de NBT (75 mg/mL) e 33 μ L de BCIP (50 mg/mL) em 10 mL de tampão para fosfatase alcalina (100 mM Tris, pH 9,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), agitando até formação de cor. Para paralisar a reação de coloração a

membrana foi lavada em água destilada, e depois secada em papel-filtro e fotodocumentada com Scanlytics.

3.6. Testes colorimétricos para detecção de lipoxigenases

Foram utilizados testes colorimétricos não-destrutivos para detecção de LOX1 e LOX 2 e 3 segundo metodologias propostas por OLIVEIRA et al. (1997), tomando-se uma pequena porção do cotilédone, do lado oposto ao eixo embrionário, das sementes, para seleção de indivíduos com ausência de lipoxigenases e, também, para confirmar os resultados obtidos por eletroforese e atividade enzimática.

3.7. Determinação de atividade de lipoxigenases

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi realizada segundo o método de AXELROD et al (1981). Nesse método, é medido o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Para tanto, preparou-se uma solução-estoque com 156 μL de ácido linoléico, 180 μL Tween – 20 e aproximadamente 40 mL de água deionizada, previamente fervida. A homogeneização, em um béquer coberto por papel alumínio, foi feita succionando a solução com uma pipeta automática, para evitar bolhas. Para o clareamento da solução, usou-se de hidróxido do sódio 0,5 M. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico, também coberto com papel-alumínio, e completou-se o volume para 50 mL com água deionizada fervida. A concentração final do ácido linoléico nesta solução foi de 10 mM.

Para a análise da atividade de lipoxigenase 1, misturaram-se 4 μL do extrato bruto da semente e 6 μL da solução estoque de ácido linoléico em 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 9,5, a 25°C. Para a análise da atividade de lipoxigenase 2 e 3, misturaram-se 4 μL do extrato bruto da

semente e 6 μL da solução de ácido linoléico em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8, a 25°C.

A absorvância a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos, por um período de 2 minutos. Sob as mesmas condições procedeu-se com o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão, e com o controle que consistiu da mesma quantidade de extrato e tampão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Os valores de absorvância a 234 nm foram determinados, e as velocidades de formação dos produtos foram calculadas.

3.8 Determinação de proteínas nos extratos de grãos de soja

As determinações de proteínas nos extratos foram realizadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA), descrito por SMITH et al. (1985). Utilizou-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão. O reagente de trabalho utilizado para as determinações consistiu da mistura do reagente A com o reagente B, na proporção da 100:2. Reagente A: ácido bicinconínico e reagente B: solução de sulfato de cobre.

O procedimento analítico consistiu em pipetar 50 μL de extrato em um tubo, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente. A mistura foi agitada e colocada em banho-maria a 37°C, por 30 minutos.

Após este tempo, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância, determinada a 562 nm. Os extratos das amostras foram analisados em triplicata.

O preparo das diluições seriadas da proteína-padrão consistiu na diluição do estoque de BSA 0,24% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, ressaltando-se que as concentrações de BSA variaram de 12 a 72 μg de proteína/mL de solução.

3.9. Determinação de inibidores de proteases

Foram efetuados ensaios de inibição de tripsina para determinação do nível de inibidor de tripsina nas sementes de soja.

Foram utilizadas tripsina pancreática bovina (tipo III) e o substrato sintético N benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (D,L-BApNA). Soluções estoque de tripsina foram preparadas em HCl 1,0 mM e armazenadas a -20 °C. Durante a determinação da atividade, a enzima foi mantida em banho de gelo.

A solução estoque de D,L-BapNA, 60 mM, foi preparada em dimetilsulfóxido e armazenada a -20°C. A concentração da solução utilizada nos ensaios foi de 1,2 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ mM. A solução foi preparada na hora do uso, mantendo-se estável por cerca de 2 horas.

A determinação da atividade de tripsina, dos extratos, foi feita pelo método descrito por ERLANGER et al. (1961). No processo de incubação, os testes foram realizados adicionando-se a 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, 50 µL da solução de tripsina 4,166 x 10⁻⁵ M e 50 µl do extrato. Os controles da atividade da enzima na ausência de inibidores foram preparados substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM. Esta mistura foi agitada lentamente e deixada à temperatura ambiente por 2 minutos. Após o período de incubação, procedeu-se à determinação da atividade enzimática adicionando-se a 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM e 0,5 ml da solução de D,L-BApNA (1,2 mM), 0,5 ml da solução de incubação. A reação ocorreu durante 3 minutos. A absorvância da solução foi determinada em 410 nm.

3.10. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Cada unidade experimental foi composta de 6 explantes contendo um total de 12 sementes. As análises de laboratório implicaram em três determinações por unidade experimental. As médias obtidas foram

submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para análise de variância e teste de médias, foi utilizado o Sistema para Análise Estatística e Genética, SAEG, Universidade Federal de Viçosa (1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se, no Quadro 1, que não houve efeito significativo das concentrações de ácido jasmônico, a 1% de probabilidade, sobre a massa de matéria fresca das sementes dos explantes de soja cultivados *in vitro*. No entanto, para todas as outras características avaliadas ocorreu efeito significativo.

Quadro 1 - Análises de variância dos dados de massa de matéria fresca, atividade específica de LOX 1 e LOX 2, 3, níveis de inibidores de proteases de sementes de explantes de soja cultivados *in vitro*, da variedade Itamarati em função de concentrações crescentes de ácido jasmônico

FV	GL	QUADRADO MÉDIO			
		Matéria fresca	Lox 1	Lox 2 e 3	Inibição triptica
Ác. Jasmônico	4	0,00057413 ^{ns}	3.267,875 ^{**}	1.337,561 ^{**}	69341,52 ^{**}
Resíduo	12	0,00018567	25,37589	1,25081	1613,482
CV (%)		5,482	11,585	3,882	6,695

ns: não-significativo.

** significativo a 1% de probabilidade.

A atividade específica de LOX1 das sementes dos explantes de soja aumentou, em função das concentrações de ácido jasmônico, até a concentração de 400 μM . No entanto, de 200 a 400 μM percebeu-se que houve um declínio maior no aumento da atividade (Figura 4). Entre a concentração 0 e 400 μM de ácido jasmônico ocorreu um aumento de 5,3 vezes na atividade específica de lipoxigenase 1.

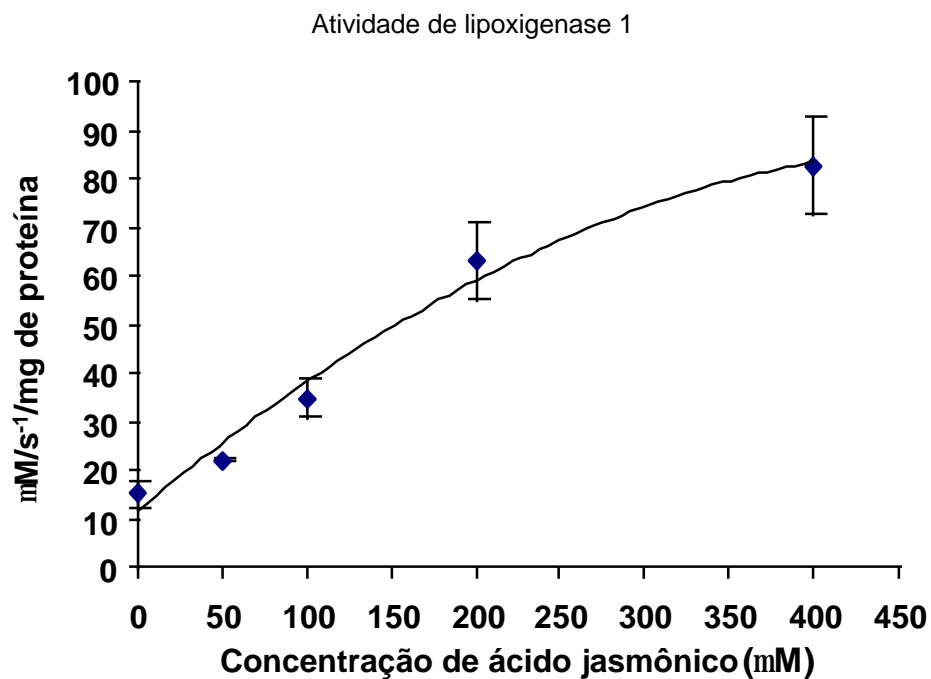


Figura 4 - Efeito de concentrações crescentes de ácido jasmônico sobre a atividade específica de LOX 1 de sementes do cultivar Itamarati oriundas de explantes de soja.

Foi observado um aumento expressivo da atividade específica de LOX 2 e 3 à medida que aumentou a concentração de ácido jasmônico na solução nutritiva (Figura 5). Entre a concentração 0 e 400 μM de ácido jasmônico ocorreu um aumento de 4,6 vezes na atividade específica de lipoxigenases 2 e 3.

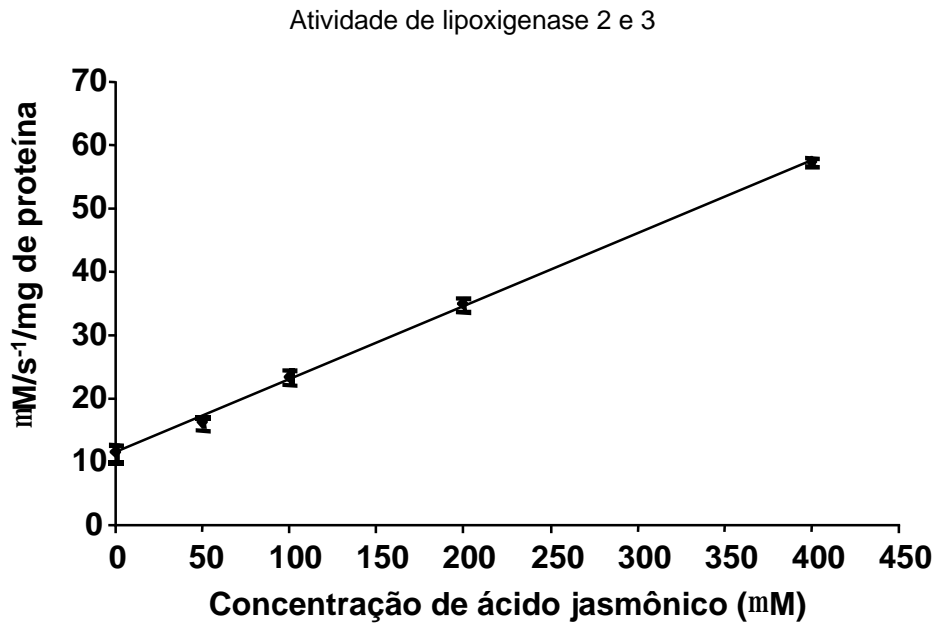


Figura 5 - Efeito de concentrações crescentes de ácido jasmônico sobre a atividade de LOX 2 e 3 de sementes do cultivar Itamarati oriundas de explantes de soja

GRIMES et al. (1992), trabalhando com plântulas de soja, observaram que a exposição das mesmas a baixos níveis de metil jasmonato atmosférico induziu a expressão e acúmulo de lipoxigenases nos folíolos.

Esses experimentos demonstraram que a atividade de lipoxigenase é aumentada de 2,5 vezes após exposição da plântula de soja a metil jasmonato.

Segundo esses autores existem duas possíveis explicações para o aumento da atividade de lipoxigenases após a exposição das plântulas de soja ao metil jasmonato. Primeiro, o metil jasmonato pode estabilizar a lipoxigenase durante o crescimento da plântula. Segundo, o metil jasmonato pode induzir a expressão de transcritos de lipoxigenases.

Na Figura 6, estão apresentados os resultados de inibição da atividade trípica por inibidores de proteases presentes em extratos de sementes da variedade Itamarati. Observa-se um aumento na inibição de tripsina expressa em (miligrama de tripsina inibida por grama de proteína) em extratos das sementes de explantes de soja cultivadas em meios contendo concentrações

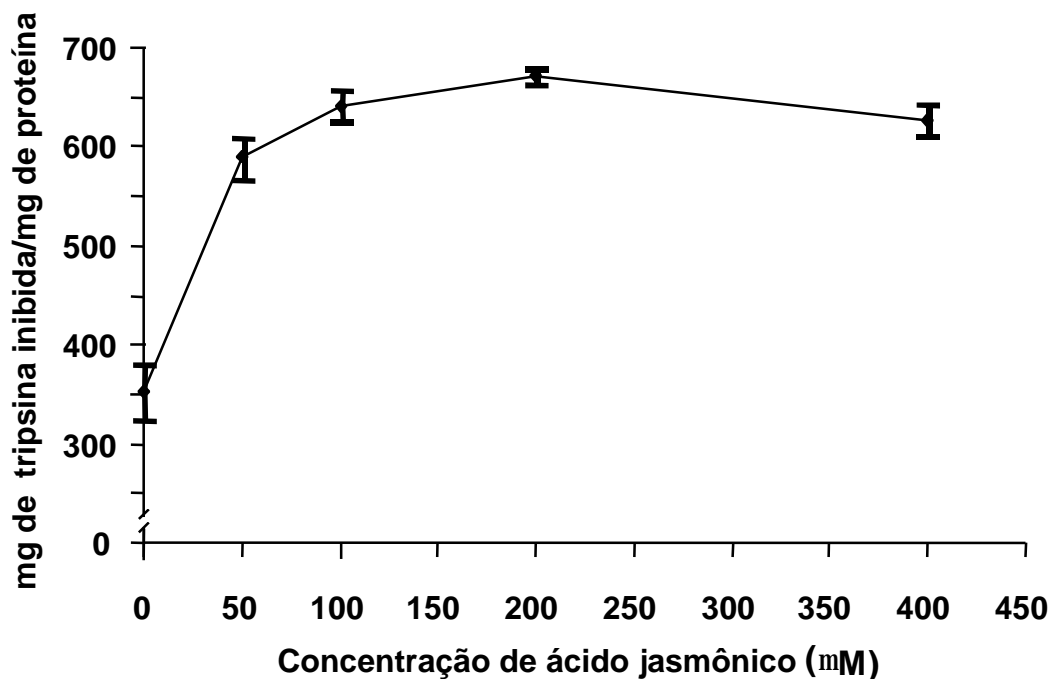


Figura 6 - Efeito de concentrações crescentes de ácido jasmônico sobre a síntese de inibidores de proteases de sementes do cultivar Itamarati oriundas de explantes de soja.

crescentes de ácido jasmônico até 100 mM, a partir do qual ocorre uma tendência à estabilização.

Estes resultados aliados aos das Figuras 4 e 5 sugerem que o ácido jasmônico está envolvido na expressão gênica dos inibidores de proteases em sementes de soja, pela via das lipoxigenases.

FARMER et al. (1994) demonstraram que o caminho de transdução de sinais para a síntese de inibidores de proteases, em folhas de tomate feridas e tratadas com sistemina, envolve a síntese de um intermediário hidroperóxido octadecanóide derivado do ácido linolênico pela ação das lipoxigenases, visto que a adição de DIECA (ácido dietilcarbâmico) inibidor de LOX promoveu a inibição da síntese de inibidor de protease.

Logo, sugere-se que a expressão de inibidores de proteases em sementes de soja é induzida pela via metabólica do ácido jasmônico, visto que, a presença de ácido jasmônico exógeno, no sistema *in vitro*, provocou aumento no nível de inibidor de tripsina em sementes de soja.

Assim, os resultados desta primeira etapa sugerem que a lipoxigenase é ativada por ácido jasmônico e este promove aumento na síntese de inibidores

de proteases em sementes de soja contendo lipoxigenase, e que a melhor concentração de ácido jasmônico está na faixa de 200 μ M para uso no cultivo de explantes em condições semi-assépticas.

O trabalho desenvolvido por CARVALHO (1997) forneceu evidências de que a eliminação genética de lipoxigenases acarreta diminuição acentuada na síntese de inibidores de proteases em sementes de soja. Em face destes resultados, tornou-se oportuno realizar experimentos objetivando determinar se ácido jasmônico exógeno estimularia a síntese de inibidores de proteases em sementes desprovidas de lipoxigenases.

Os resultados apresentados nas Figura 7 para a variedade Itamarati e Itamarati TN , Cristalina e Critalina TN, CAC-1 e CAC-1 TN demonstram que há maior crescimento das sementes *in vitro* do que *in situ*. Nota-se também, que o ácido jasmônico não promoveu aumento significativo no conteúdo de matéria fresca destas variedades, quando comparamos controle *in vitro* com amostras que receberam tratamento com ácido jasmônico.

Em sementes Itamarati, CAC-1 e Cristalina normal, a atividade específica de LOX1 (Figura 8) e LOX 2 e 3 (Figura 9) aumentou significativamente, quando comparados com o controle em casa de vegetação e o controle *in vitro*. Estes resultados indicam que ácido jasmônico induz a síntese de lipoxigenases em sementes de soja.

A não-interferência do ácido jasmônico sobre a atividade específica de lipoxigenase 1, 2 e 3 em sementes das linhagens Itamarati TN, CAC-1 TN, e Cristalina TN foi atribuída ao fato destas sementes não apresentarem os genes que codificam para LOX1 e LOX 2 e 3.

SARAVITZ e SIEDOW (1996) observaram um aumento da expressão de genes de lipoxigenase, quando submetidas a vários tipos de estresses em plantas de soja e batata. Mostraram também que transcritos de genes que codificam LOX 7 e 8 estão presentes em folhas não feridas e aumentam a transcrição após o ferimento. ROYO et al. (1996) mostraram que LOX 1, 2 e 3 de batata estão envolvidas na síntese de ácido jasmônico, e que estas isoformas apresentam diferentes papéis após ferimento.

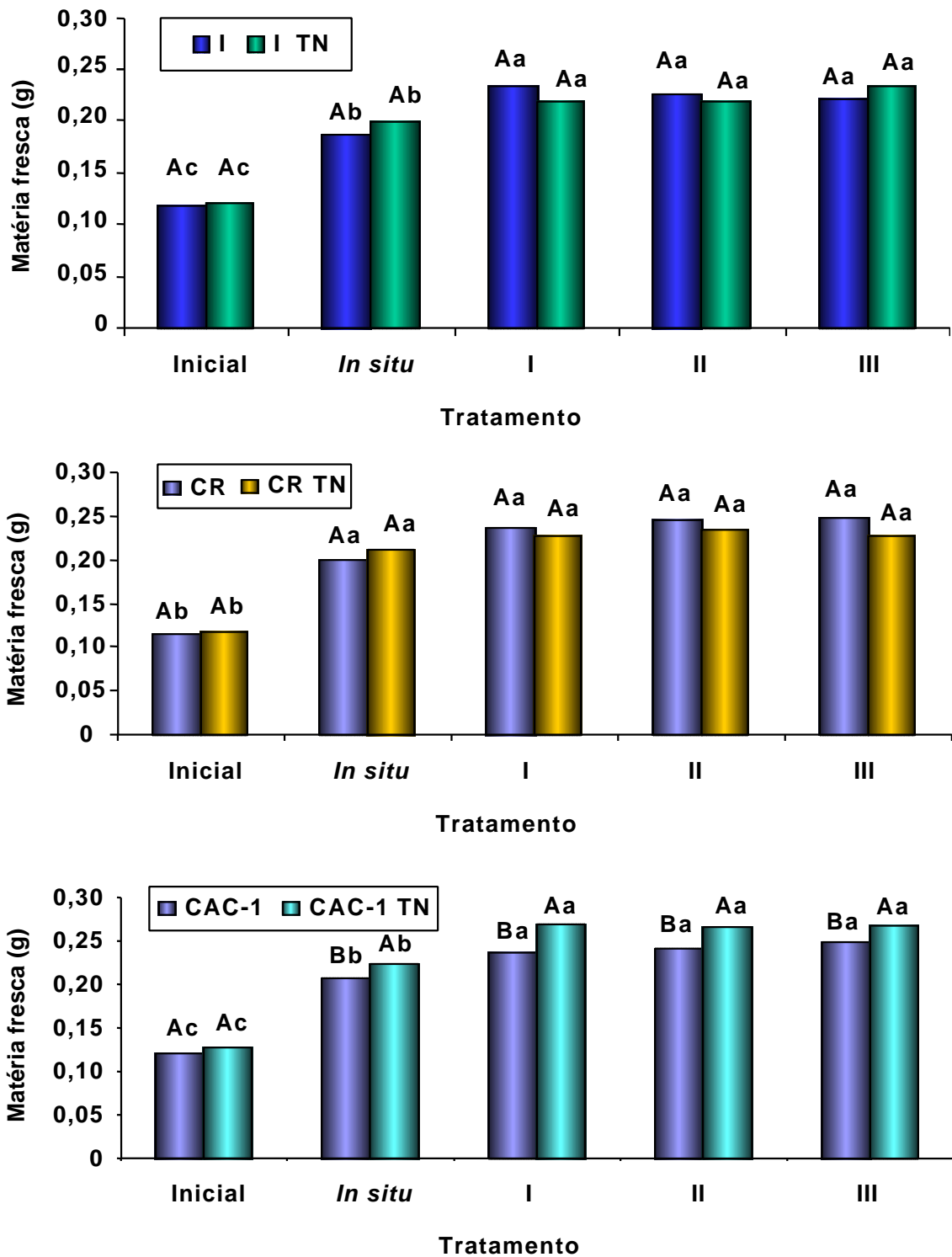


Figura 7 - Matéria fresca (g) de sementes de explantes de soja. Inicial = valores iniciais; *In situ* = controle de casa de vegetação; I = controle *in vitro*; II = 200 μ M de ácido jasmônico; e III = 400 μ M de ácido jasmônico. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos, dentro do mesmo genótipo. Letras maiúsculas comparam os dois genótipos, no mesmo tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

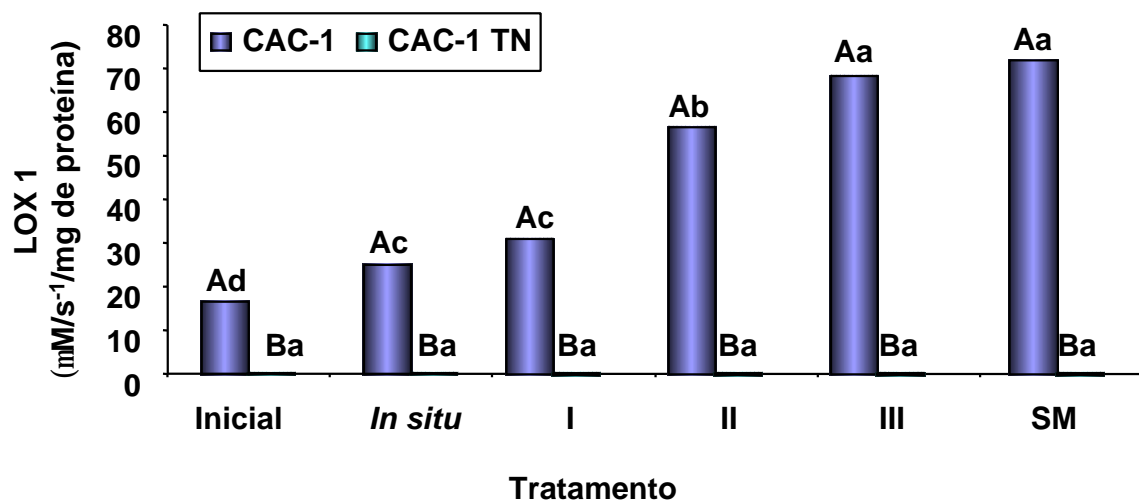
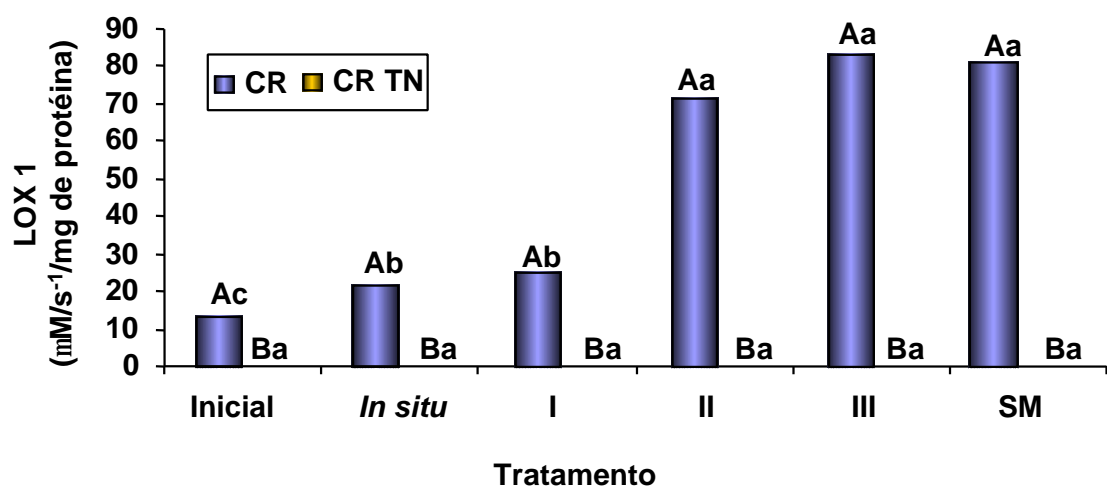
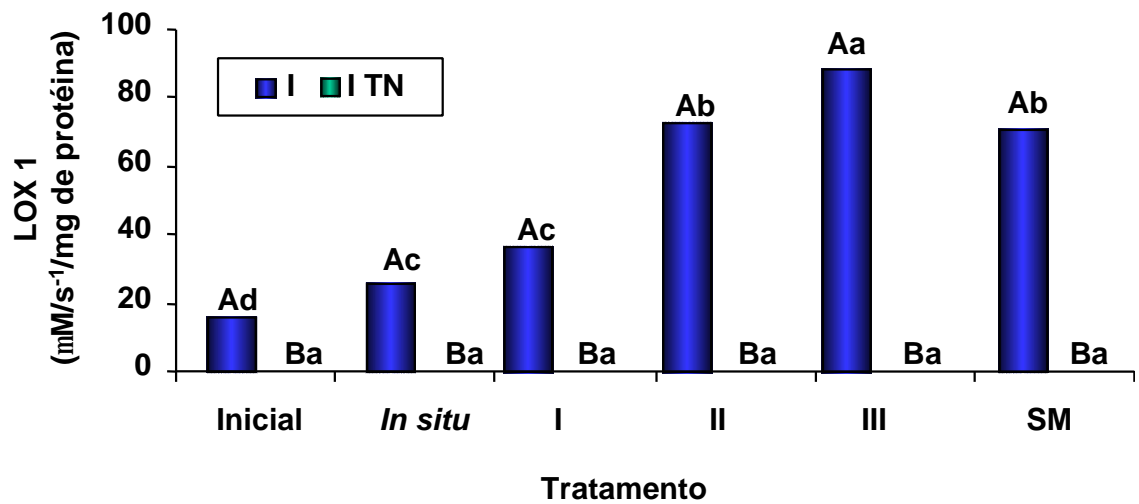


Figura 8 - Atividade específica de lipoxigenase 1 de sementes de explantes de soja. Inicial = valores iniciais; *In situ* = controle de casa de vegetação; SM = semente madura; I = controle *in vitro*; II = 200 μ M de ácido jasmônico e III = 400 μ M de ácido jasmônico. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos, dentro do mesmo genótipo. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

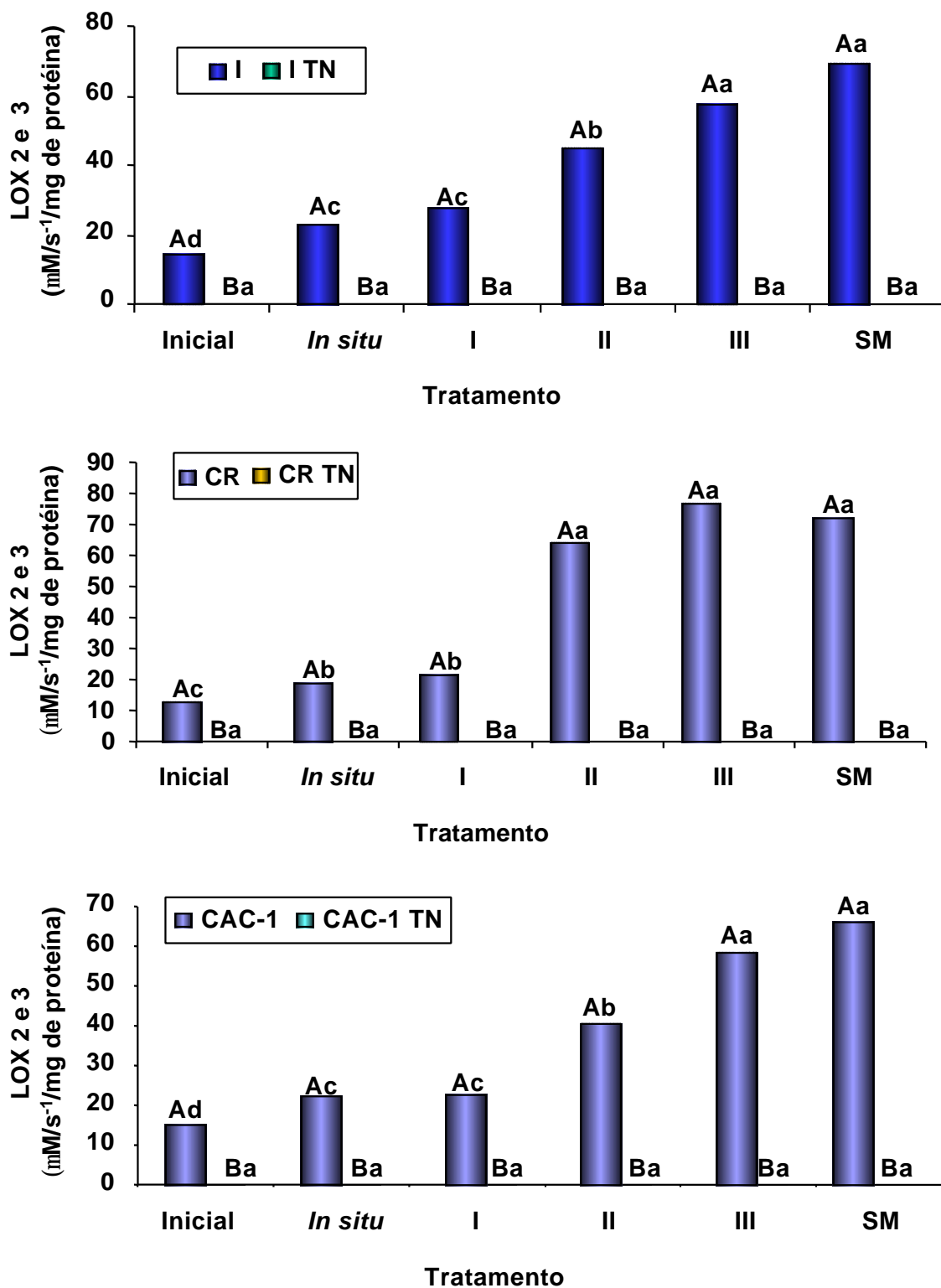


Figura 9 - Atividade específica de lipoxigenase 2 e 3 de sementes de explantes de soja. Inicial = valores iniciais; *In situ* = controle de casa de vegetação; SM = semente madura; I = controle *in vitro*; II = 200 μ M de ácido jasmônico e III = 400 μ M de ácido jasmônico. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos, dentro do mesmo genótipo, e letras maiúsculas comparam os dois genótipos, no mesmo tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O envolvimento das lipoxigenases no crescimento e desenvolvimento tem sido proposto uma vez que foi observado aumento da atividade de lipoxigenases em tecidos em fase de rápido crescimento (MACK et al.,1987). As lipoxigenases também tem sido associadas à resposta a ferimentos e senescência foliar. Dessa forma, verifica-se que a participação de lipoxigenases em processos fisiológicos em folhas de diversas espécies de vegetais tem sido relativamente bem estudada. Entretanto, a presença de lipoxigenases em sementes de espécies vegetais continua sem ter função fisiológica específica determinada. Assim, a expressão e o acúmulo de proteínas de reserva vegetativa em soja são regulados por ácido jasmônico (FRANCESCHI e GRIMES, 1991).

Para comprovar os resultados obtidos a partir de análises espectrofotométricas, fez-se a análise de lipoxigenases por SDS-PAGE (Figura 10). Observa-se claramente aumento de lipoxigenase em sementes que receberam tratamento com ácido jasmônico.

Na Figura 11 são apresentados os padrões de precipitação obtidos via técnica de “western blotting” onde as lipoxigenases após terem sido separadas eletroforeticamente e transferidas para uma matriz sólida (membrana de nitrocelulose) foram submetidas a reações contra o anticorpo. Pode-se perceber na Figura 11 que a única canaleta na qual a banda de lipoxigenase não aparece trata-se da linhagem com ausência de lipoxigenase. Observa-se ainda que houve uma maior intensidade na banda de LOX de sementes que foram cultivadas em meio contendo ácido jasmônico.

Nas Figuras 12 (a,b,c) estão apresentados os resultados de inibição da atividade trípica por extratos de semente das variedades comerciais e de suas linhagens derivadas com ausência de lipoxigenases. Para a variedade Critalina, CAC-1 e Itamarati observou-se um aumento no conteúdo de inibidores de proteases avaliados em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína, comparado com o controle *in vitro* e *in situ*. No entanto, para as linhagens TN, não se observou aumento de inibição da atividade de tripsina.

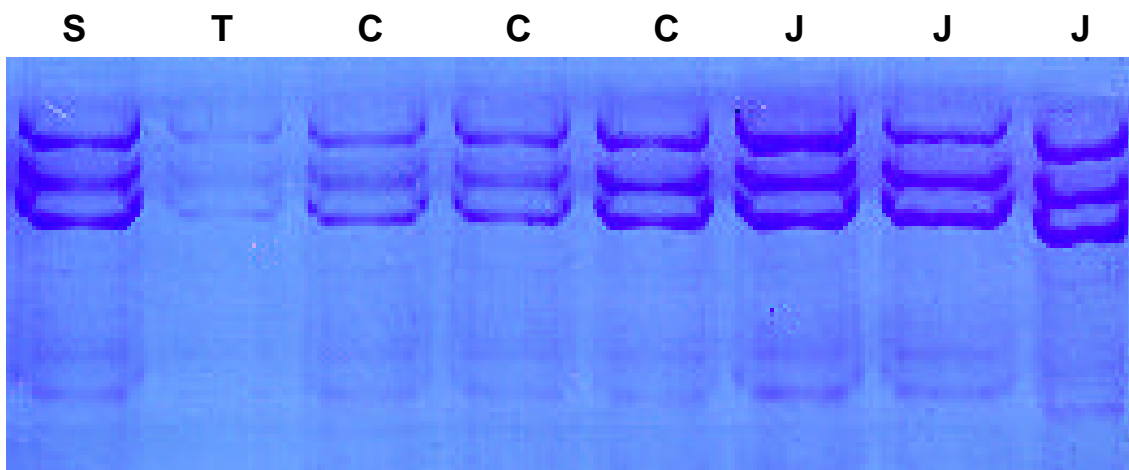


Figura 10 - Padrão eletroforético de lipoxigenase em gel de poliacrilamida da variedade Cristalina, onde: S = semente madura normal; T = semente madura TN; C = controle in vitro e J = 400 μ M de ácido jasmônico.

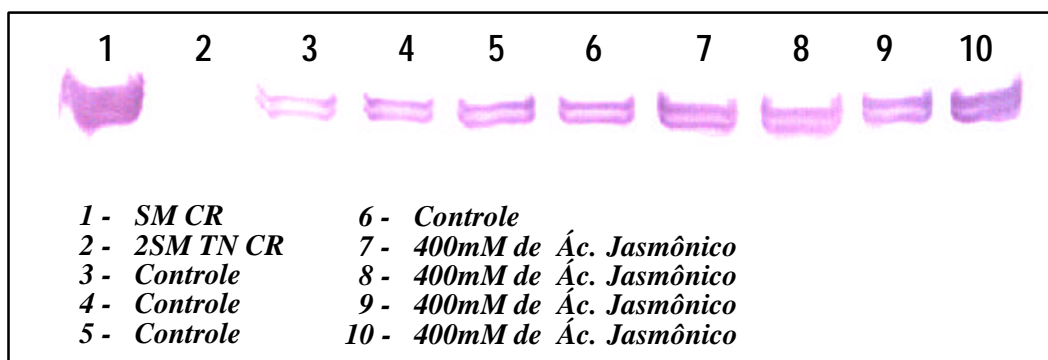


Figura 11 - Padrão de precipitação obtido via técnica de "Western blotting" utilizando antissoro contra lipoxigenase de sementes de soja da variedade cristalina, onde: S = semente madura; T = semente madura TN; C = controle; J = 400 μ M de ácido jasmônico.

Segundo a literatura, ácido jasmônico é um mensageiro intracelular ou intercelular na maioria das plantas. Baixos níveis de ácido jasmônico podem induzir a expressão de inibidores de proteases em folhas de tomate e acúmulo de proteínas de reserva vegetativa (GRIMES et al., 1992).

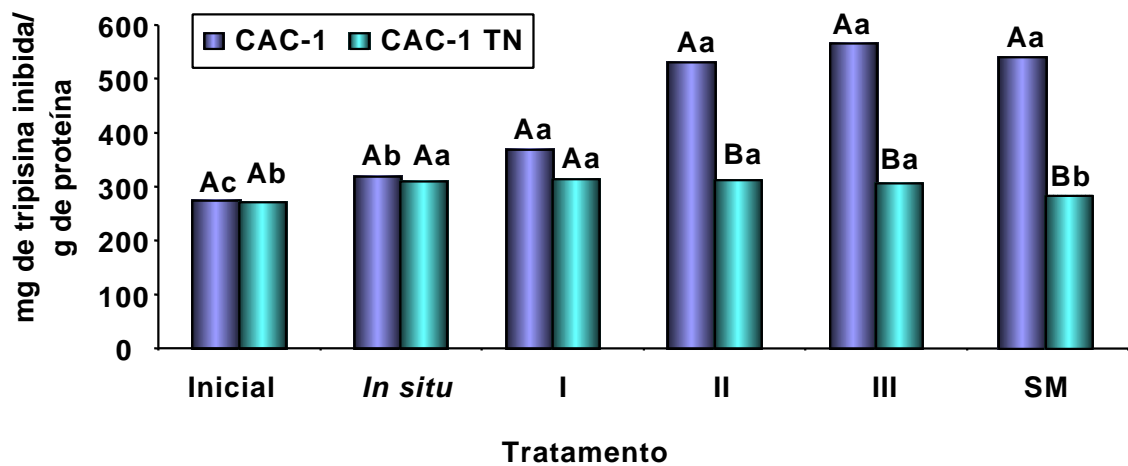
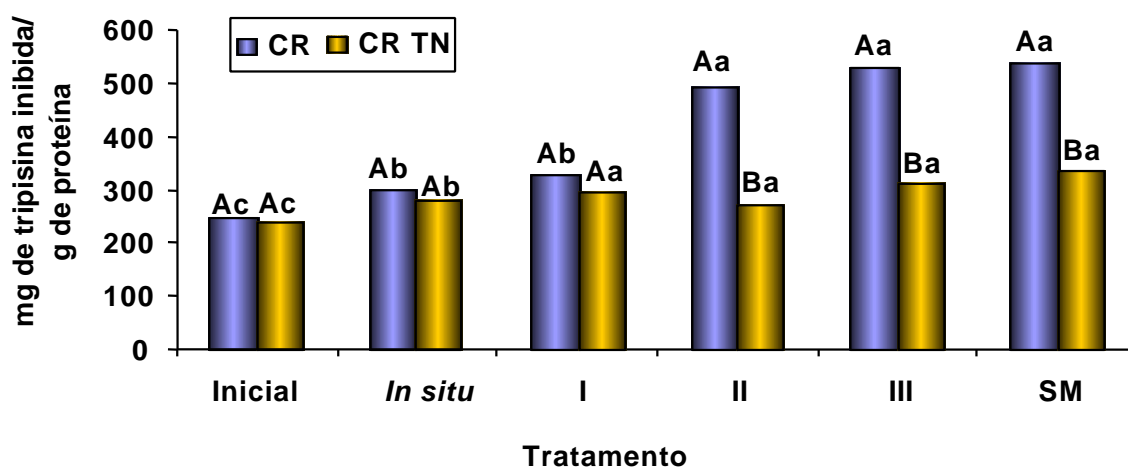
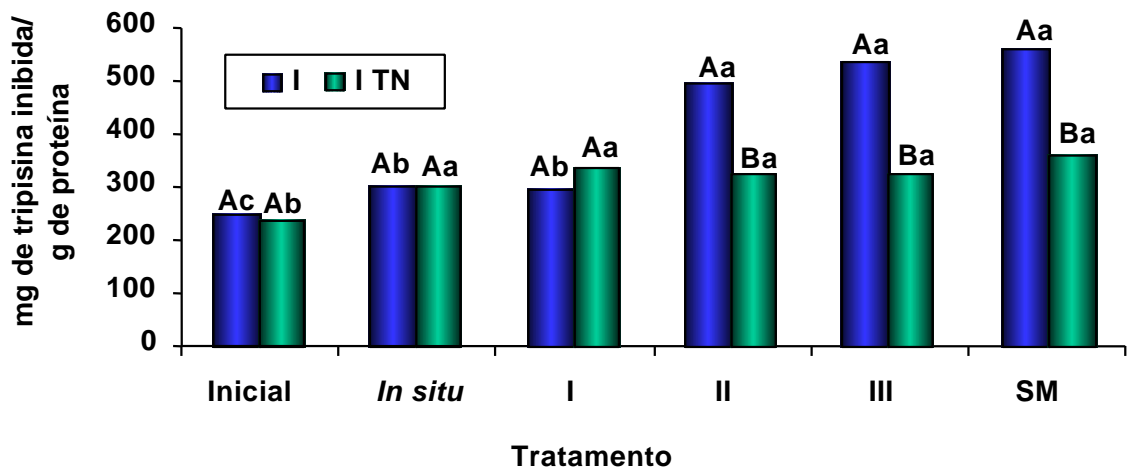


Figura 12 - Miligramas de tripsina inibida/g de proteína de sementes de explantes de soja. Inicial = valores iniciais; *In situ* = controle de casa de vegetação; SM = semente madura; I = controle *in vitro*; II = 200 μ M de ácido jasmônico e III = 400 μ M de ácido jasmônico. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos, dentro do mesmo genótipo, e letras maiúsculas comparam os dois genótipos, no mesmo tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente trabalho, ácido jasmônico exógeno promoveu aumento significativo na síntese de inibidores de proteases em sementes de explantes de soja cultivados in vitro. No entanto, a ação do ácido jasmônico exógeno como molécula indutora da síntese de inibidores de proteases em sementes de soja com ausência de lipoxigenases não foi observada. Esses resultados sugerem que, em sementes de soja, a síntese de inibidores de proteases dependente da via das lipoxigenases não é revertida por ácido jasmônico (Figura 12).

Pode ser observado também que não ocorreu aumento na porcentagem de inibição da atividade trípica em extratos das linhagens CAC TN, Itamarati TN e Cristalina TN (Figura 13) quando comparadas com variedades normais (com presença de lipoxigenases).

Os resultados do presente trabalho indicam que o ácido jasmônico induz a síntese de inibidores de proteases em sementes de soja, via caminho dependente de lipoxigenase, visto que nas sementes com ausência de lipoxigenases, não houve aumento na expressão de inibidores de proteases.

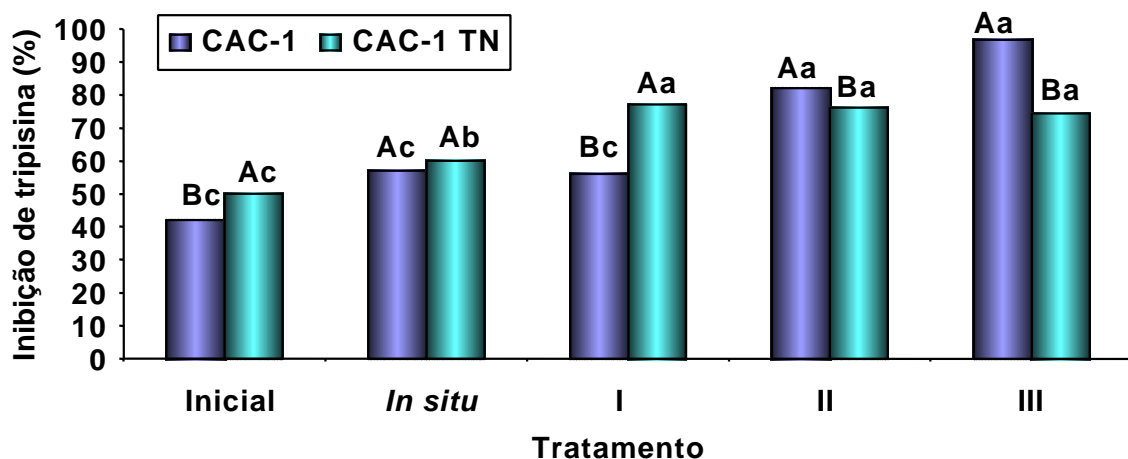
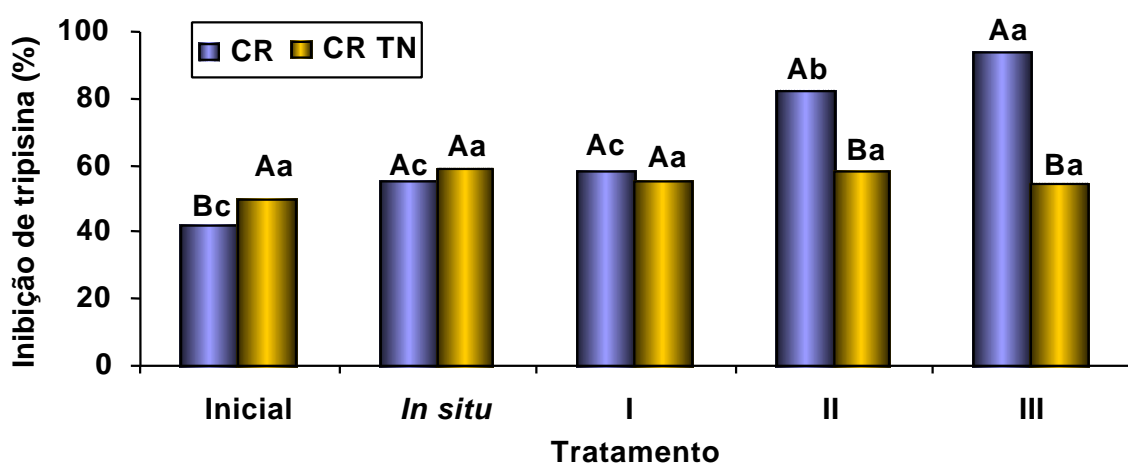
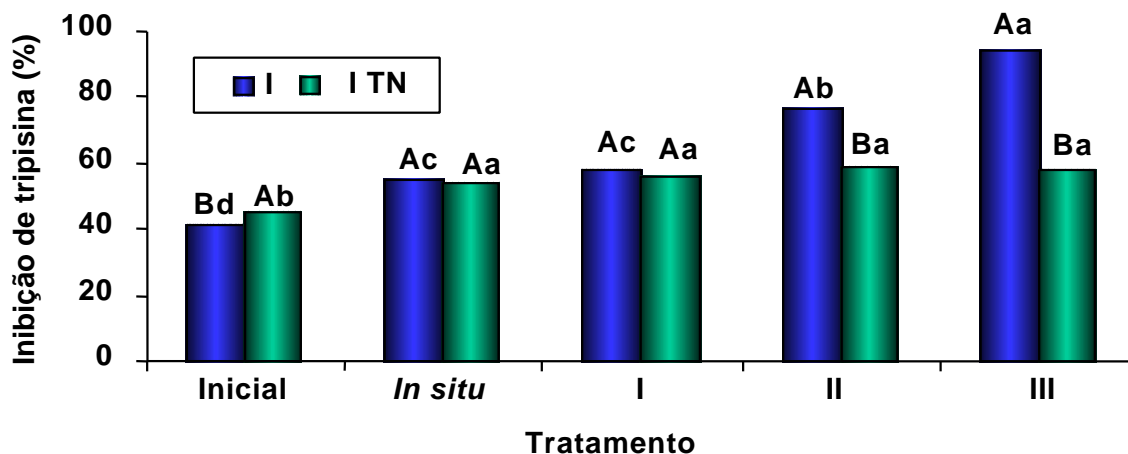


Figura 13 - Inibição de tripsina (%) por extratos de sementes de explantes de soja. Inicial = Valores iniciais; *In situ* = controle de casa de vegetação; I= controle *in vitro*; II= 200 μ M de ácido jasmônico e III = 400 μ M de ácido jasmônico. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos, dentro do mesmo genótipo, e letras maiúsculas comparam os dois genótipos, no mesmo tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O sistema de cultivo *in vitro* mostrou-se ideal para testar os efeitos do ácido jasmônico em sementes de soja, em razão de sua grande reprodutibilidade, condições controladas e perfeito isolamento dos efeitos dos tratamentos testados.

Assim, os resultados obtidos permitiram concluir que o fornecimento exógeno de ácido jasmônico aos meios em que os explantes de soja foram cultivados, induz a síntese de lipoxigenases nas sementes de linhagens normais, com concomitante aumento significativo da síntese de inibidores de proteases. No entanto, em sementes de linhagens desprovidas de lipoxigenases, o fornecimento exógeno de ácido jasmônico não foi capaz de induzir a síntese de inibidores de proteases dependentes de lipoxigenases.

Conclui-se, portanto, que o ácido jasmônico somente é capaz de induzir a síntese de inibidores de proteases em sementes de soja via indução de lipoxigenases. Assim, em sementes que apresentam ausência completa dessas enzimas não observou efeito do ácido jasmônico no que concerne à indução da síntese de inibidores de proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.M., SPILATRO, S.R., KLAVER, S.F., FRANCESCHI, V.R. Jasmonic acid-dependent increase in level of vegetative storage protein in soybean. **Plant Sci.**, v. 62, p. 45-52, 1989.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S.L. Lipoxygenase from soybean. **Methods Enzimol.**, v. 71, p. 441-51, 1981.
- BELL, E., CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 8675-79, 1995.
- BELL, E., MULLET, J.E. Characterization of na Arabidopsis lipoxygenase gene responsiveto methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, v.103, p. 1133 - 1137, 1991.
- BILD, G.S., RAMADOSS, C.S., AXELROD, B. Effect of substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenases isoenzymes. **Lipids**, v.12, p. 732-35,1977.
- BOHLAND, C., BALKENHOHL, T., LOERS G., FEUSSNER, I., GRAMBOWJ H.D. Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin, oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 679-685, 1997.
- BRANDON, D.L., BATES, A.H., FRIEDMAN, M. Antigenicity of soybean protease inhibitors **J. Agric. Food. Chem** p. 107-129, 1993.
- BRANDON, D.L., BATES, A.H. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the bowman-birk protease inhibitor of soybeans. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 37, (4), p. 1192-1196,1989.

- BRANDON, D.L., HAQUE, S., FRIEDMAN, M. Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 35, p.195-200, 1987.
- BUNKER T.W., KOETJE, D.S., STEPHENSON, L.C., CREELMAN A.R., MULLET J.E., GRIMES H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low . **The Plant Cell** , vol 7, p. 1319-1331 1995.
- CARVALHO, W.A. **Efeito da eliminação genética de lipoxigenases sobre os níveis de inibidores de proteases em sementes de soja.** Viçosa - UFV: MG, 89p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- CHANDLER, P.M., HIGGINS, T.J.V., RANDALL, P.J., SPENCER, D. Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency. **Plant Physiol.**, v. 71, p. 47-54, 1983.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Anu. Ver.Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**,v. 48, p. 355 - 381 1997.
- CREELMAN, R.A., TIERNEY, M.L., MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants, Regulation during development and responset to biotic and abiotic stress. **Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4114-4119, 1995.
- DAMMAN, C., ROJO, R., SÁNCHEZ-SERRANO J.J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible gene in potato, through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant Journal**, v.11, p. 773-782, 1997.
- DEMOLE, E., LEDERER, E., MERIEIER, D. Isolement et determination de la structure du jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique de essence de jasmin. **Helv. Chim Acta**, v. 45, p. 675-685 1962.
- DOARES, S.H., SYROVETS, T., WEILER, E.W., RYAN, C.A. Oligogalacturonides and chitosan active plant defensive genes through the octadecanóide pathway. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 92, p. 4095-4098, 1995.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and propertier of two chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.
- FARMER, E.E., CALDELARI, D., PEARCE, G., SIMMONS, M.K. RYAN C.A. Diethylthiocarbamic acid inhibits the octadecanoid signaling pathway for the wound induction of proteinase inhibitors in tomato leaves. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 337-342, 1994.

- FARMER, E.E., JOHNSON, R.R., RYAN, C.A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. **Plant. Physiol.**, v.98, p. 995-1002,1991.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Interplant communication, airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proc. Nath. Acad. Sci. USA**, v. 87,p. 7713-16, 1990.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Octadenoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, v. 11, p. 129-134,1992.
- FEUSSNER, L., WASTERNAK C., KINDL, H, KUHUN, H. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplast of barley leaves . **Plant J.**, v. 7, p. 949-957, 1995.
- FRANCESCHI, V.R., GRIMES, H.D. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. **Plant Biology**, v. 88, p. 6745-49, 1991.
- GARDNER, W.H. Biological roles and biochemistry of a lipoxygenase pathway. **Hort Science**, v.30, p.10 , 1995.
- GARDNER, W.H. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1084, p. 221-239, 1992.
- GEERTS, A., FELTKAMP, D., ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tuber of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 269-277 1994.
- GRIMES, H., KOETJE, D.S., FRANCESCHI, R. Expression activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. **Plant Physiology**, v. 100, p. 433-443. 1992.
- HEITZ T., BERGEY D.R., RYAN, C. A gene encoding a chloroplast targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 1085 - 1093, 1997.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v.76, p. 249-253, 1988.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Exp. Sta. Circ.**, p 347, 1950.
- KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase L₄, a component of the 94 kilodalton storage protein in vegetative tissue, expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methy jasmonate. **Plant Cell Physiol.**, v. 34, p. 1063-1072, 1994.

- KODA, Y., KIRUTA, Y., KITAHARA, T., NISHI, T., MORI, K. Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1111-1114, 1992.
- KODA, Y., KIRUTA, Y. Wound-induced accumulation of jasmonic acid in tissues of potato tubers. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 751-756, 1994.
- KODA, Y., WARD, J.L., BEALE, M.H. Biological activity of methyl 7-methyljasmonates. **Phytochemistry**, v. 38, p. 821-823, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- LEHMANN, J., ATZORN, R., BRUCKNER, C., REINBOTHES, C, LEOPOLD J., WASTERNAK, C. PARTHIER, B. Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. **Planta**, v. 197, p. 56-162, 1995.
- LINSMAYER, E.M., SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 18, p. 100-127, 1995.
- MACK, A.J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isozymes in higher plants biochemical properties and physiological role. Isozymes. **Current Top. Biol.**, v. 13, p. 127-154, 1987.
- MASON, H.S., DEMALD, D.B., CREELMAN, R.A., MULLET J.E. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. **Plant Physiol.**, v. 98 p. 859-867, 1991.
- MELAN M.A., DONG, X.H., ENDARA, M.E., DAVIS K.R., AUSUBEL, F.M., PETERMAN, T.K. *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 441-50, 1993.
- MOSQUIM, P.R., SODEK, L. Culture of soybean fruit explants, growth conditions and efficiency of nitrogen sources for reserve protein synthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 71-76, 1991.
- MULLER, M.J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Physiol Plant**, v. 100, p. 653-663, 1997.
- MULLET, J.E., MASON, H.S. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **Plant Cell**, v. 2, p. 569 - 579, 1990.
- NELSON, M.J., SEITZ, S.P. The structure and function of lipoxygenase. **Current Biology.**, v. 4, p. 878-884, 1994.
- OLIVEIRA D.A., MORAES, R.M.A., ROBHEBOIS, G.B., OLIVEIRA, M.G., BARROS, G.E., MOREIRA, M.A. Identification of the three genotypic classes

- for soybean lipoxygenases 1 and 3 bases on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p.71-74, 1998.
- PARTHIER, B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development, many facts and few hypotheses on their actions. **Bot. Acta**, v.104, p. 446-454, 1993.
- PENÃ-CORTÉS, H., FISAHN, J., WILLMITZER, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4106-4113, 1995.
- PETROVIC, N., MIERSCH, O., RAUNIKAR, M., KOVAG, M. Potato virus Y^{N,TN} alters the distribution and concentration of endogenous jasmonic acid in potato plants grown *in vitro*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 237-244, 1997.
- RACKIS, J.J., SESSA, D.J., HONI, D.H. Flavor problems of vegetable food proteins. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 56, p. 262-271, 1979.
- REINBOTHE, C., PARTHIER, R. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. **Planta**, v.201, p. 281-287, 1997.
- RICKAUER, M., BOTTIN, A. Regulation of proteinase inhibitor production in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 30, p. 579-584, 1992.
- RICKAUER, M., BRODSCHELM, W., BOTTIN, A., VERONESI, C., GRIMAL, H., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defense responses in tobacco cells. **Planta**, v. 202, p. 155-162, 1997.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants - Their role in development and stress response. **Planta**, v. 51c, p. 123-138, 1995.
- ROYO, J., VANCANNEYT, G., PEREZ, G., SANZ, C., STORMANN, K., ROSAHL, S., SANCHEZ-SERRANO, J.J. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21012-21019, 1996.
- RYAN, C.A., FARMER, E.E. Oligosaccharide signals in plants, a current assessment. **Annu. Ver. Plant. Physiology. Mol. Biol.**, v. 42, p. 651-664, 1991.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annu. Ver Plant Physiology**, v. 24, p.173-196, 1973.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The differential expression of wound inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 286-299, 1996.

- SCHEWE, T., RAPOPORT, S.M., KUHU, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase comparison with others lipoxygenases. **Adv. Enzymol. Mol. Biol.**, v. 58, p. 191-272, 1986.
- SCHWEIZER, P., BUCHALA, A., SILVERMAN, P. Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 79-88, 1997.
- SEO, S., SANO, H., OHASHI, Y. Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 740-745, 1997.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase, structure and function. **Annu. Ver. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p.145-88, 1991.
- SIEGRIST, J., JEBLICK, W., KAUSS, H. Defense responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyl segments exhibiting acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1365-1374, 1994.
- SIMPSON, T., GARDNER, H.W. Allene oxide synthase and allene oxide cyclase, enzymes of the jasmonic acid pathway, localized in *Glycine max* tissues. **Plant Physiology**, v. 108, p. 199-202, 1995.
- 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. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- STAHLHUT, R.W., HYMOWITZ, T. Variation in the low molecular weight proteinase inhibitor of soybeans. **Crop Sci.**, v. 23, p. 766-769, 1983.
- STAWISCK, P. Jasmonate, genes, and fragrant signals. **Plant Physiology**, v. 99, p. 804-807, 1992.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T., MUENSTER, A.M.E. *In vitro* culture of immature cotyledons of soybean. **Ann. Bot.**, v. 41, p 29-39, 1977.
- VICK, B.A., ZIMMERMAN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 458-461, 1984.
- VIDHYASEKARAN, P. **Physiology of disease resistance in plants**. Boca Raton: Florida, CRC Press, 1995. p. 199-202.
- WASTERNAK, C., ATZORN, R., BLUME, B., LEOPOLD, J., PARTHIER, B. Ursolic acid inhibits synthesis of jasmonate-induced proteins in barley leaves. **Phytochemistry**, v. 35, p. 49-54, 1994.
- WASTERNAK, C., PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, v.2, p. 302-307, 1997.

WEIDHASE, R.A., KRAMELL, H.M., LEHMANN, J. Methyl jasmonate induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf fragments. **Plant Sci.**, vol. 51, p. 177-186, 1987.

YOSHIKAWA, M. Macromolecules, recognition and the triggering of resistance. In: CALLOW, J.A. (Ed.) **Biochemical plant pathology**. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1983. p. 267-298.