

FRANCINE BARBOSA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA “VIA DAS LIPOXIGENASES” EM PLANTAS DE  
SOJA SUBMETIDAS AO ATAQUE DE INSETOS-PRAGA

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  
AGOSTO - 1999

FRANCINE BARBOSA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA “VIA DAS LIPOXIGENASES” EM PLANTAS DE  
SOJA SUBMETIDAS AO ATAQUE DE INSETOS-PRAGA

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

APROVADA: 5 de março de 1999.

---

Prof. Maurílio Alves Moreira  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Elizabeth P. Batista Fontes  
(Conselheira)

---

Prof. George H. Kling de Moraes

---

Prof. Tânia Toledo de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus queridos pais Juvenil e Maria José.

Aos meus irmãos Simone e Antonio.

Ao meu sobrinho Fellipe.

À Goreti.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Dep. de Agroquímica, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

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

Aos meus pais, meus irmãos e meu sobrinho, pelo apoio, incentivo, carinho e pela confiança.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, pela confiança, pela presença, pelo estímulo e, acima de tudo, pela amizade que demonstrou em todo o decorrer do curso.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pelos ensinamentos transmitidos, pelas sugestões e pela colaboração dispensada durante este trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela colaboração e pelo incentivo na execução deste trabalho.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela colaboração, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pelo apoio e pela colaboração.

Ao professor Marcelo Coutinho Picanço e João Alfredo Marinho Ferreira, por terem cedido os insetos para a montagem do experimento.

À Maria Regina Vilarinho de Oliveira, Luzia Helena Correia Lima e sua equipe de pesquisadores do CENARGEN-EMBRAPA, pela identificação da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*).

Ao professor Giovani Mocelin, pelas sugestões e pelas análises realizadas sob sua orientação.

Ao Newton Deniz Piovesan, pela grande colaboração na montagem do experimento, pelas valiosas sugestões e pelo apoio.

Ao meu irmão, por ter me auxiliado durante todos os dias de coleta das plantas, durante o experimento.

À minha amiga Ângela, pelo companheirismo.

Ao meu amigo Cristiano César de Araújo Ferreira, pela amizade, pelo auxílio irrestrito e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos Angélica Aparecida Vieira, Lucinete Regina Colombo e Kelly Fabiane Santos Ricardo, pelo companheirismo e auxílio.

Aos meus colegas de laboratório Giordani, William e Christiano, pela colaboração na realização das análises de hexanal, aldeídos totais e inibidores de proteases e, ainda, pela agradável convivência.

Aos meus colegas de laboratório Rodrigo, Marcelo, Ritinha, Valéria e Márcio, pela agradável convivência.

Aos meus amigos Eduardo Pereira Monteiro, Solange Starling Brandão e Maria Cândida Carelli, pelo apoio e, principalmente, pela amizade.

Aos funcionários do BIOAGRO José Fausto Sant'anna e Aloísio Nunes Cordeiro, pelo auxílio constante.

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

## **BIOGRAFIA**

FRANCINE BARBOSA SILVA, filha de Juvenil Barbosa Silva e Maria José das Dôres Silva, nasceu em 22 de dezembro de 1973, na cidade de Governador Valadares, Estado de Minas Gerais.

Em fevereiro de 1997, graduou-se no curso de Bacharelado e Licenciatura em Química, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Agroquímica na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 5 de março de 1999.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Lipoxigenases de sementes .....	7
2.2. Lipoxigenases de folhas .....	8
2.3. Funções fisiológicas das lipoxigenases em tecidos vegetais ..	10
2.3.1. Crescimento e desenvolvimento .....	10
2.3.2. Senescência.....	11
2.3.3. Resposta de plantas a estresses .....	12
2.3.4. Síntese de moléculas regulatórias .....	14
2.4. A interação planta-inseto .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1. Material genético .....	21
3.2. Ataque de insetos .....	22
3.2.1. Ataque de moscas-brancas ( <i>Bemisia argentifoli</i> ) .....	22
3.2.2. Ataque de lagarta da soja ( <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner)	22
3.3. Obtenção de extratos foliares.....	22
3.4. Métodos analíticos cinéticos.....	23
3.4.1. Determinação da atividade de lipoxigenase.....	23
3.4.2. Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja.....	24

	Página
3.4.3. Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja .....	25
3.4.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases em plantas de soja .....	25
3.5. Quantificação de proteínas totais no extrato bruto .....	25
3.6. Determinação de inibidores de proteases .....	26
3.7. Determinação de aldeídos totais .....	27
3.8. Determinação de hexanal.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## EXTRATO

SILVA, Francine Barbosa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 1999. **Caracterização da “via das lipoxigenases” em plantas de soja submetidas ao ataque de insetos-praga.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Everaldo Gonçalves de Barros.

Lipoxigenases (EC: 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a dioxigenação estereoespecífica de ácidos graxos polinsaturados que contêm o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, formando hidroperóxidos que são posteriormente metabolizados e produzem substâncias com atividades fisiológicas pronunciadas. As LOXs são responsáveis pela formação de compostos orgânicos responsáveis pelo “beany flavor” das sementes de soja, que reduz drasticamente a utilização desta oleaginosa na alimentação humana. Uma estratégia na eliminação deste sabor indesejável é a retirada, através de manipulação genética, das LOXs de semente. Além disso, é descrito o envolvimento dessas isoenzimas no crescimento e desenvolvimento, na senescência e na biossíntese de moléculas regulatórias. Este trabalho avaliou a capacidade da planta em responder ao ataque de insetos-praga (um mastigador e outro sugador) pela “via das lipoxigenases”, tendo sido realizadas análises bioquímicas e cinéticas do “pool” de lipoxigenases foliares e dos possíveis produtos finais da via. Foram utilizados dois genótipos de soja: um

normal (variedade IAC-100) e outro com ausência completa de lipoxigenases nas sementes (linhagem IAC-100 TN). As plantas foram submetidas a uma população de insetos-praga (lagarta da soja ou mosca-branca) em gaiolas de filó. Para lagarta da soja, o primeiro trifolíolo da planta, no estágio V3 de desenvolvimento, foi coletado 6, 12 e 24 horas após o ataque da planta pelo inseto. A seguir o inseto foi retirado e o primeiro trifolíolo coletado após 6, 12, 24 e 48 horas. No caso da mosca-branca, o primeiro trifolíolo da planta, no estágio V3 de desenvolvimento, foi coletado 12, 24, 48 e 72 horas após o ataque da planta pelo inseto. Em seguida o inseto foi retirado e o primeiro trifolíolo coletado após 6, 12, 24 e 48 horas. Os resultados das análises bioquímico-cinéticas revelaram dois picos mais acentuados de atividade e atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0 nos dois tratamentos, com temperatura ótima de atividade e atividade específica a 25 °C. Para ambos os genótipos, as atividades foram maiores nos tratamentos do que nos respectivos controles. Para a lagarta da soja, os valores de  $K_M$  aparente, determinados no “pool” de lipoxigenases foliares de plantas de soja dos dois genótipos analisados, diminuíram a partir de 6 até 24 horas, em presença do inseto, e de 6 até 48 horas, após remoção do inseto. Para a mosca-branca, os valores de  $K_M$  aparente no “pool” de lipoxigenases foliares de plantas de soja dos dois genótipos analisados decresceram com o tempo de ataque, ou seja, de 12 até 72 horas, em presença do inseto; após a remoção do inseto, estes valores voltaram a aumentar. A variação no valor de  $K_M$  aparente para ambos os genótipos sugere uma alteração do “pool” de lipoxigenases em resposta ao ataque de insetos. Tanto no experimento com lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) quanto naquele com mosca-branca (*Bemisia argentifolii*), observou-se aumento significativo na produção de inibidores de proteases após a remoção dos insetos, para ambos os genótipos analisados. Esses resultados, aliados aos dados obtidos para as constantes cinéticas, reforçam a hipótese de que as isoenzimas lipoxigenases são enzimas-chave no sistema de defesa de plantas de soja contra herbívoros e que o acúmulo de inibidores de proteases é, provavelmente, um mecanismo de defesa da planta. As análises dos níveis de hexanal e aldeídos totais nos dois experimentos revelaram aumento significativo nos níveis de aldeídos totais após a remoção dos insetos, para os dois genótipos, no tratamento com lagarta; e aumento

mais significativo para mosca-branca antes da remoção, para a linhagem IAC-100 TN. Uma produção significativa de hexanal só ocorreu para a variedade IAC-100, no tratamento com mosca-branca. Esses resultados sugerem que o mecanismo de defesa de plantas de soja submetidas ao ataque de insetos-praga, pela via das lipoxigenases, também pode seguir o caminho de produção de aldeídos.

## ABSTRACT

SILVA, Francine Barbosa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 1999. **Characterization of lipoxygenases pathway of soybean plants submitted to insect attack.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee Members: Maurílio Alves Moreira, Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Everaldo Gonçalves de Barros.

Soybeans are the major oil and protein crop producer. Their grains have a high protein products, but they are less acceptable by the human consumer because of the “beany flavor” which are caused by small compounds organic produced by lipoxygenase (EC: 1.13.11.12) acting upon polinsaturated fatty acid. One strategy for eliminating the “beany flavor” is the removal of lipoxygenase isoenzymes (LOXs) from the seeds by genetic manipulation. However LOXs to be associated with the growth, development, senescence, temporary nitrogen storage, biosynthesis of regulatory molecules and protection against attack by insects and pathogens. This work evaluated the capacity of the plant to respond to the attack of the whitefly (sucking insect) and of the soybean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner) via the lipoxygenases pathway. The kinetic characterization of the “pool” of lipoxygenases and the final products of the pathway were determined. Two genotypes of soybean were used: one normal (cultivar IAC-100) and the other devoid of LOXs in the seeds (cultivar IAC-100 TN). The plants were placed in

contact with the insects and the first trifoliolate leaf was collected for the analysis. The results of the biochemical and kinetic studies showed two pronounced peaks of lipoxygenase activity at pH 4.5 and pH 6.0 with temperature optimum at 25 °C. The  $K_{Mapp}$  values decreased until 24 hours after removing the whitefly from the soybean and decreased until 48 hours after removing the soybean caterpillar, suggesting a change in the “pool” of LOX in response to the attack of the insects. Significant increase in the aldehydes after removing insects was observed. There was a noticeable increase in protease inhibitors for cultivar IAC-100 and IAC-100 TN after removing insects. This suggest that the production of protease inhibitors and aldehydes are involved in the defense mechanism of soybean plant against whitefly and soybean caterpillar injury. Genetic removal of LOX from the seeds has not changed the expression of LOX in the leaves which act on the defense mechanism of the soybean plant.

## 1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (EC1.13.11.12) catalisam a dioxigenação estereoespecífica de ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, com formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando, assim, moléculas reativas com atividades fisiológicas pronunciadas. Com base nas muitas tentativas que vêm sendo feitas no sentido de se estabelecerem as funções bioquímica e fisiológica de lipoxigenases em tecidos vegetais, descreve-se o envolvimento destas isoenzimas no crescimento e desenvolvimento; na senescência; na resposta a ferimentos e a danos causados por insetos-praga e patógenos; e na biossíntese de moléculas regulatórias em plantas (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991). É sugerido, ainda, que as isoenzimas lipoxigenases sejam utilizadas como proteínas de reserva vegetativa no armazenamento temporário de nitrogênio (SMITH et al., 1985).

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

características organolépticas de diversos produtos alimentícios (HILDEBRAND, 1989). Recentemente, pesquisadores do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, na UFV, eliminaram geneticamente as lipoxigenases presentes no grão. Esta é, sem dúvida, a melhor alternativa para a eliminação do sabor característico da soja, desde que esta manipulação genética não altere a composição e, em consequência, as funções fisiológicas dessas isoenzimas presentes nas folhas de soja, tendo em vista suas participações nos mecanismos de defesa da planta contra insetos-praga e patógenos.

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

SEKIYA et al. (1983) encontraram grandes variações nas atividades de lipoxigenases de folhas de 28 espécies de plantas estudadas e observaram que as folhas de soja foram as que apresentaram as atividades de lipoxigenases mais elevadas. Estes autores também encontraram uma correlação positiva entre a atividade destas enzimas e a produção de aldeídos voláteis pelas plantas. GRAYBURN et al. (1991) observaram a presença de, pelo menos, três isoenzimas de lipoxigenases em folhas de soja e demonstraram que estas são diferentes daquelas encontradas em sementes e que pelo menos uma é diferente das encontradas em hipocótilos/radículas de plantas de soja. Recentemente, SARAVITZ e SIEDOW (1995) constataram que a concentração das isoenzimas de lipoxigenases decresce acentuadamente com a idade das folhas e que as formas mais acídicas são mais abundantes em folhas com idade intermediária. Após fermentos, as mesmas isoenzimas acídicas tiveram considerado aumento de atividade, quando comparadas com a atividade observada em plantas normais.

Duas principais vias para o metabolismo dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzidos pelas lipoxigenases, chamadas de “Via das Lipoxigenases”, vêm sendo propostas para plantas superiores, para as quais apenas alguns intermediários foram identificados até o momento. Assim, os hidroperóxidos

são posteriormente metabolizados em plantas por diferentes enzimas, incluindo hidroperóxido liase e hidroperóxido ciclase. A hidroperóxido liase produz aldeídos de seis carbonos, como o trans-2-hexenal (componente que dá a característica sabor e odor de frutos e folhas) e a traumatina. Tem sido proposto que os aldeídos formados pela ação da lipoxigenase inibem o crescimento de fungos, insetos e protozoários (CROFT et al., 1993) e, ainda, poderiam estar agindo como um sinal químico na atração do inimigo natural do herbívoro para a planta danificada (PARÉ e TUMLINSON, 1997). A traumatina, também conhecida como hormônio do ferimento, e o ácido traumático são compostos que podem estar envolvidos no processo de sinalização e divisão celular em resposta a ferimentos em plantas (ZIMMERMAN e COUDRON, 1979).

A hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico, que, após uma redução e três  $\beta$ -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico, que tem atividade de fito-hormônio e está envolvido na regulação dos processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a injúria e patógenos, ou seja, indução da expressão de genes que codificam inibidores de proteases (CROFT et al., 1993; GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992).

Entre as pragas que atacam as culturas de soja, citam-se a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) e a mosca-branca (*Bemisia argentifolii*). A lagarta da soja alimenta-se de folhas jovens e, quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta. Por se tratar de um inseto mastigador, a lagarta da soja pode levar a um desfolhamento completo da planta. Já a mosca-branca, por se tratar de um inseto sugador, não causa danos visíveis à planta quando se alimenta desta (FERREIRA e AVIDOS, 1998). Entretanto, essas pragas podem levar a planta de soja à morte ou à diminuição da produção, especialmente quando há alta densidade populacional do inseto. Quando esses insetos se alimentam, além de removerem nutrientes, eles injetam toxinas na planta.

Uma vez que o envolvimento das isoenzimas de lipoxigenases no mecanismo de defesa de plantas contra injúrias causadas por insetos-praga tem sido descrito, torna-se cada vez mais importante a caracterização bioquímica e cinética dessas isoenzimas, em especial daquelas presentes nas folhas; esta caracterização será útil para o esclarecimento das funções

bioquímico-genéticas e fisiológicas relacionadas às funções de defesa das plantas contra danos causados por insetos-praga e patógenos e para a regulação do metabolismo vegetal pela via das lipoxigenases.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidorreductase, EC 1.13.11.12) catalisam a adição estereoespecífica de oxigênio molecular no sistema cis,cis-1,4-pentadieno de ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos de ácidos graxos (SIEDOW, 1991). O sistema cis, cis-1,4-pentadieno comumente ocorre nos ácidos graxos di- e tri-insaturados, como o ácido linolênico (C<sub>18:3</sub>) e o ácido linoléico (C<sub>18:2</sub>), os quais são os principais substratos para lipoxigenases em plantas superiores (OHTA et al., 1991). O ácido linoléico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas, compreendendo mais que 80% do grupo acil dos lipídios de membrana dos cloroplastos. O ácido linoléico, o mais utilizado em experimentos laboratoriais, encontra-se em maior concentração em sementes e embriões (HILDEBRAND et al., 1988). Os hidroperóxidos formados são posteriormente metabolizados e produzem várias substâncias com atividades fisiológicas relevantes (KOCK et al., 1992).

O oxigênio é introduzido em ambas as posições, ou seja, 9- ou 13-carbono do ácido linoléico ou linolênico, formando os ácidos 9- ou 13-hidroperoxiloléico ou linolênico, respectivamente (SANZ et al., 1992). A relação entre 9- e 13-hidroperóxidos difere para lipoxigenases de diferentes espécies de plantas (VICK e ZIMMERMAN, 1987).

Essas isoenzimas 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).

Apesar de as lipoxigenases serem encontradas em muitos tecidos de plantas e animais, os níveis de expressão variam muito entre os diferentes tecidos (HILDEBRAND et al., 1988). As atividades de lipoxigenases em soja não variam somente entre os diferentes órgãos, mas também entre os diferentes estádios de desenvolvimento de um determinado tecido (SIEDOW, 1991).

No sistema animal, as lipoxigenases catalisam o primeiro passo na síntese de compostos regulatórios, como leucotrienos e lipoxinas, que desempenham funções nos processos inflamatórios, na imunidade e hipersensibilidade e nas reações de defesa do hospedeiro. No sistema vegetal, acredita-se que as lipoxigenases desempenhem função na germinação e senescência da semente e em resposta a estímulos ambientais, como injúria e ataque de patógenos (SIEDOW, 1991). Sugere-se que produtos da trajetória da lipoxigenase estejam envolvidos na resposta da planta a injúrias, nas interações patógeno-hospedeiro, na regulação do crescimento e desenvolvimento e como compostos que afetam a qualidade dos alimentos (ROSAHL, 1996).

Além da soja, muitas outras culturas vêm sendo estudadas com o objetivo de se determinar o real papel fisiológico das lipoxigenases, como trigo (GUSS et al., 1968), ervilha (ANSTIS e FRIEND, 1974), batata (GREEN e RYAN, 1972), tomate (GREEN e RYAN, 1972; PEARCE et al., 1991; FARMER e RYAN, 1992), arroz (OHTA et al., 1991), tabaco (RICKAUER et al., 1992; FARMER e RYAN, 1992) e grão-de-bico (SANZ et al., 1992), dentre outras.

Geralmente, a atividade de lipoxigenase e os níveis de proteína e de transcritos são maiores em folhas jovens e declinam com o aumento da idade da folha (HILDEBRAND et al., 1988; ZHUANG et al., 1992). Além disso, as lipoxigenases de folhas de soja têm propriedades diferentes daquelas das três isoenzimas encontradas nas sementes (HILDEBRAND et al., 1988; GRAYBURN et al., 1991; ZHUANG et al., 1992, SARAVITZ e SIEDOW, 1995).

Lipoxigenases (TRANBARGER et al., 1991) e proteínas de reserva vegetativa (FRANCESCHI e GIAQUINTA, 1983a, 1983b, 1983c; FRANCESCHI et al., 1983) acumulam-se transitoriamente nas células especializadas do mesófilo paraveinal. A localização celular e subcelular dos produtos dos genes de lipoxigenases vegetativas (*vlx*) demonstrou que as proteínas *vlxA* e *vlxB* acumulam-se no citosol do mesófilo paraveinal, sugerindo que estas proteínas

possam funcionar como enzimas ativas no transporte de nutrientes da planta. A localização específica das proteínas *v1xC* e *v1xD* no vacúolo do mesófilo paraveinal e seu acúmulo em resposta à remoção da parte reprodutiva da planta sugerem que elas funcionam como proteínas de armazenamento temporário de nitrogênio (STEPHENSON et al., 1998). Isoformas de lipoxigenase foram ainda detectadas nos cloroplastos de células de tecidos fotossintéticos e núcleo (FEUSSNER et al., 1995) e citosol (SIEDOW, 1991), associadas à membrana plasmática e microssomal (NELLEN et al., 1995) e à mitocôndria de células de alfafa (GROSSMAN et al., 1972). Devido à ampla distribuição das isoenzimas nos tecidos vegetais, torna-se inviável a afirmação sobre o envolvimento destas num único papel fisiológico.

Aumento na expressão de lipoxigenases tem sido detectado em plantas durante ou após uma variedade de estresse, incluindo ataque de insetos (HILDEBRAND et al., 1989), infecção por patógenos (CROFT et al., 1990; KATO et al., 1992; KOCK et al., 1992; MELAN et al., 1993) e ferimento mecânico (HILDEBRAND, 1989; BELL e MULLET, 1993; SARAVITZ e SIEDOW, 1995). A relevância fisiológica da indução de lipoxigenases por condições de estresse tem sido estabelecida; e várias propostas têm sido sugeridas, incluindo degradação da membrana durante a resposta de hipersensibilidade (CROFT et al., 1990), produção de derivados de ácidos graxos, moléculas antimicrobianas (OHTA et al., 1991; KATO et al., 1992; CROFT et al., 1993) e síntese de substâncias relacionadas ao crescimento de plantas, como ácido abscísico (CREELMAN et al., 1992) e ácido jasmônico (FARMER e RYAN, 1992; KOCK et al., 1992).

## **2.1. Lipoxigenases de sementes**

AXELROD et al. (1981) separaram as lipoxigenases de sementes de soja em três isoenzimas distintas, que foram originalmente denominadas lipoxigenases -1, -2 e -3. As três isoenzimas de semente são proteínas globulares, solúveis em água e formadas por uma única cadeia polipeptídica e mostram alto grau de homologia entre si, de no mínimo 70% na seqüência de aminoácidos, com LOX-1 e LOX-2 apresentando homologia de 81% na sua seqüência primária (HILDEBRAND et al., 1988). A caracterização subsequente

de lipoxigenases em várias outras plantas revelou que uma parte da seqüência das proteínas era conservada com uma massa molecular de cerca de 95 KDa (ROSAHL, 1996). A Tabela 1 apresenta as principais características das três lipoxigenases estudadas (CRISTOPHER et al., 1972; BILD et al., 1977; HILDEBRAND e KITO, 1984; SHIBATA et al., 1987; HILDEBRAND et al., 1988; COELHO, 1993).

Tabela 1 - Principais propriedades das isoenzimas lipoxigenases de semente de soja

Propriedades	Lipoxigenase-1	Lipoxigenase-2	Lipoxigenase-3
PM	94.038	97.053	96.857
PI	5,68	6,25	6,15
pH(ótimo)	9,5	6,5	5,0-9,0
Produto da reação	95:5 13-HPO:9-HPO	50:50 13-HPO:9-HPO	65:35 13-HPO:9-HPO
Especificidade pelo substrato	Ácidos graxos ionizados	Ácidos graxos não-ionizados	Ácidos graxos não-ionizados
$K_M$ ( $\mu$ M) ácido linoléico, como substrato	85	16	340

(13-HPO: ácido 13-hidroperoxidolinolênico; 9-HPO: ácido 9-hidroperoxidolinolênico)

A LOX-1 é mais efetiva na hidroperoxidação de ácidos graxos livres, ao passo que LOX-2 e LOX-3 são, relativamente, 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.

## 2.2. Lipoxigenases de folhas

Enquanto as lipoxigenases de semente de soja têm sido intensamente estudadas, a diversidade e as características das lipoxigenases de folhas de

soja têm sido menos pesquisadas (GRAYBURN et al., 1991), e pouco se conhece sob o ponto de vista da relação estrutura/função dessas enzimas.

Investigações recentes indicam que a expressão de pelo menos dois genes de lipoxigenases é induzida em folhas de soja em resposta a ferimento (BELL e MULLET, 1993; SARAIVITZ e SIEDOW, 1996). KATO et al. (1993) mostraram que a expressão do gene de soja para LOX-4 aumenta em folha após a remoção do dreno reprodutivo. BUNKER et al. (1995) observaram a indução da expressão de dois genes adicionais de lipoxigenase (loxA e vlxC) em folhas após remoção da vagem. Em folhas de soja feridas, houve aumento na expressão de LOX-7 e LOX-8 após ferimento (SARAIVITZ e SIEDOW, 1996).

Por meio da técnica de cromatofocalização, GRAYBURN et al. (1991) identificaram três picos distintos de atividade de lipoxigenases em folhas de soja. Os valores de pI das três isoenzimas contidas nesses picos foram iguais a 6,67; 5,91; e 5,67. As curvas de pH dessas três isoenzimas revelaram valores de pH ótimos de 5,5; 6,2; e 8,5.

Durante o crescimento vegetativo, folhas de soja acumulam três polipeptídeos de aproximadamente 27, 29 e 94 KDa (SMITH et al., 1985). Esses polipeptídeos, que são proteínas de reserva vegetativa, acumulam-se durante o crescimento vegetativo normal e, com o desenvolvimento da vagem, são rapidamente degradados, aumentando o "pool" de aminoácidos disponíveis para os estágios iniciais do enchimento do grão. A proteína de reserva vegetativa de 94 KDa apresenta composição aminoacídica bastante semelhante à das lipoxigenases, acreditando-se que ela faça parte da família das lipoxigenases (TRANBARGER et al., 1991).

Provavelmente, a função mais importante das proteínas de reserva vegetativa seja nutrição de sementes e de folhas nos primeiros estágios do desenvolvimento devido ao fato de essas proteínas se acumularem nas folhas, mesmo sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio (TRANBARGER et al., 1991; KLAUER et al., 1991).

SIEDOW (1991) relata que as maiores atividades de lipoxigenases ocorrem, em geral, nas folhas mais novas. ZHUANG et al. (1992) também verificaram que folhas mais novas de soja possuem maior atividade de lipoxigenases do que folhas mais velhas. SARAIVITZ e SIEDOW (1995)

detectaram, em folhas de soja, duas classes distintas de isoenzimas de lipoxigenases, uma com uma faixa de ponto isoelétrico neutro e outra ácida, sugerindo também haver diferenças entre as isoenzimas das sementes e das folhas de soja.

Muitas tentativas vêm sendo feitas no sentido de estabelecer o papel das lipoxigenases em tecidos vegetais. 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.

## **2.3. Funções fisiológicas das lipoxigenases em tecidos vegetais**

### **2.3.1. Crescimento e desenvolvimento**

Lipoxigenases desempenham importante papel no crescimento e desenvolvimento de plantas. Altos níveis de atividade de lipoxigenases têm sido observados em tecidos em crescimento (MELAN et al., 1993).

Aumento na atividade de lipoxigenases durante o desenvolvimento da semente tem sido observado em um número variado de espécies de plantas (SIEDOW, 1991). É curioso que o aumento da atividade de lipoxigenases observado durante a germinação coincide com o aumento da atividade de hidroperóxido liase, que é a enzima que catalisa a primeira reação na biossíntese de traumatina. O aumento concomitante de lipoxigenase e de enzimas envolvidas no metabolismo de hidroperóxidos de ácidos graxos derivados de lipoxigenases é consistente com a função de lipoxigenases na geração de reguladores de crescimento derivados de lipídios (MELAN et al., 1993).

Um grande aumento na atividade de lipoxigenases em hastes de soja em crescimento (hipocótilo/radícula), após a germinação, foi observado por PARK e POLACCO (1989). HILDEBRAND et al. (1988), avaliando as

lipoxigenases em plantas de soja, concluíram que as maiores atividades da enzima são detectadas, em geral, no ápice das plantas, o que corresponde às células jovens. SARAVITZ e SIEDOW (1995) observaram que, durante o desenvolvimento de folhas de soja, as isoenzimas de lipoxigenases da faixa neutra e a maioria das isoenzimas da faixa ácida estavam presentes em maior abundância nas folhas jovens, declinando em quantidade com o aumento da idade das folhas.

A função das lipoxigenases no processo de germinação pode estar ligada à mobilização de lipídios, ou seja, à destruição da membrana celular, permitindo, assim, o transporte de compostos de reserva para o embrião (ROSAHL, 1996). CREELMAN e MULLET (1997) relatam que ácidos jasmônico e metil jasmonato (produtos da “via das lipoxigenases”) estimulam a germinação de sementes inativas e que o aumento observado nos níveis de ácido jasmônico é relacionado com a mobilização de reservas da semente.

A oxidação de lipídios de reserva catalisada por lipoxigenase também é relatada no processo de germinação por FEUSSNER et al. (1995). Alguns lipídios de reserva servem como fonte de nitrogênio da semente durante a germinação. A ligação de lipoxigenase a substâncias lipídicas e sua ativação sugerem que esta enzima possa ter uma função específica durante o processo de germinação (FEUSSNER et al., 1995).

### **2.3.2. Senescência**

A perda da integridade da membrana, uma característica inerente da senescência, ocorre via peroxidação de lipídios, processo este proposto como sendo iniciado ou promovido por radicais livres ou enzimaticamente, por meio da ação de lipoxigenases (LESHEM, 1988). A produção de ânions superóxidos contribui para a degradação da membrana, e a produção de altos níveis de radicais oxigênio é dependente da presença de ácido linoléico, o qual é substrato das lipoxigenases (ROSAHL, 1996). As lipoxigenases são enzimas que catalisam a reação direta de ácidos graxos polinsaturados com oxigênio, produzindo hidroperóxidos, e têm ainda importante função na degradação da membrana lipídica induzida pela senescência (RÍO et al., 1998).

Os hidroperóxidos de ácidos graxos, que são produtos da ação dessas enzimas, são altamente reativos, podendo causar a senescência por vários mecanismos diferentes, incluindo inativação ou inibição da síntese de proteínas, inibição da atividade fotoquímica nos cloroplastos e deterioração das membranas celulares. Essa alteração das membranas leva a um aumento na permeabilidade, resultando em aumento dos níveis de cálcio nas células e em estímulo de fosfolipases (VICK e ZIMMERMAN, 1987). A produção de radicais livres pelas lipoxigenases é um assunto de grande interesse nas pesquisas de senescência de plantas (LESHEM, 1998). SIEDOW (1991) relata que vários estudos têm indicado que o aumento na atividade das lipoxigenases é uma característica comum da senescência de plantas. No entanto, observa-se claramente que é necessária uma melhor caracterização desta atividade das lipoxigenases, a fim de que seu papel, na senescência, seja claramente demonstrado.

### **2.3.3. Resposta de plantas a estresses**

As lipoxigenases de plantas podem também estar envolvidas na resposta das plantas a ferimentos e outros estresses (GALLIARD, 1978). A resposta das plantas a ferimentos por um número variado de mecanismos de defesa inclui a fortificação das paredes celulares, a indução de genes relatos de defesa e a síntese de compostos antimicrobianos (ROSAHL, 1996).

Aumento na atividade de lipoxigenase em resposta a ferimento mecânico (MELAN et al., 1993) e infecção por patógenos (CROFT et al., 1990; RICKAUER et al., 1992; OHTA et al., 1991; KOCK et al., 1992) tem sido demonstrado. Genes de defesa também são induzidos por ferimentos mecânicos causados por herbívoros, tanto em resposta local quanto em tecidos distantes. Ferimentos de folhas menores de várias espécies de plantas resultam no acúmulo de proteínas de defesa em folhas feridas e em não-feridas (GREEN e RYAN, 1972). A ativação de genes de defesa em plantas é iniciada com a geração de sinais no sítio de ataque do inseto ou patógeno (HOWE et al., 1996).

Tem sido mostrado que injúria de células de plantas ativa uma lipoxigenase específica. Na presença de oxigênio, esta enzima é ativada e

catalisa a formação de hidroperóxidos de ácido linoléico e de outros ácidos graxos polinsaturados (SPITELLER, 1993).

Altas atividades de lipoxigenases 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 lipídios, o que resulta na formação de aldeídos voláteis de seis e nove carbonos (SEKIYA et al., 1983). Os compostos de seis carbonos são liberados do tecido da planta e formam a base do odor característico de tecidos de plantas (BATE et al., 1998). As características sabor e odor são importantes determinantes da qualidade de vegetais e frutas frescas (HATANAKA et al., 1982). Hexanal, por exemplo, é um composto que limita a utilização da soja na alimentação (MÁRCZY et al., 1995). Aldeídos voláteis de seis carbonos produzidos por essa rota também têm propriedades antimicrobianas, sugerindo que eles podem funcionar na defesa da planta (CROFT et al., 1993). Em adição, esses aldeídos de seis carbonos podem inibir a germinação de sementes, sugerindo que eles também podem desempenhar uma função de sinalização em plantas. Recentemente, foi demonstrado que aldeídos voláteis de seis carbonos também sinalizam uma variedade de genes de defesa em *Arabidopsis* (BATE et al., 1998). Assim, estes aldeídos podem representar um papel importante na resistência de plantas a doenças.

Dependendo da origem da enzima, a atividade de lipoxigenases sobre ácido linolênico pode produzir ácido 9- e 13-hidroperoxidolinolênico ou uma mistura dos dois, que são posteriormente metabolizados (CROFT et al., 1993). Um dos produtos formados é o ácido 12-oxo-cis-9-dodecenóico, que é um precursor do hormônio do ferimento em plantas, o ácido traumático (SIEDOW, 1991). Outro importante composto produzido é o trans-2-hexenal. Tem-se sugerido que o trans-2-hexenal possa estar envolvido no mecanismo de defesa de plantas contra patógenos (VICK e ZIMMERMAN, 1987). Esse aldeído foi avaliado em vários experimentos e mostrou-se capaz de inibir o crescimento de fungos (CROFT et al., 1993), insetos (Basaniak, 1984, citado por CROFT et al., 1993) e protozoários (Von Schildknecht e Paucch, 1961, citados por CROFT et al., 1993). O mecanismo de atividade antimicrobiana do

trans-2-hexenal não é conhecido. CROFT et al. (1993) relataram que bactérias tratadas com este aldeído apresentam precipitação do DNA e lise de algumas células.

Em experimentos realizados por PARÉ e TUMLINSON (1997), foi demonstrado que a aplicação de secreções orais de lagarta (*Gossypium hirsutum* L.) em algodão aumentou a produção de aldeídos voláteis, o que pode servir como um sinal químico que atrai o inimigo natural do herbívoro. Esses resultados estabelecem que a planta representa um papel ativo e dinâmico, mediando a interação entre herbívoros e seus inimigos naturais. No entanto, a sucessão de reações bioquímicas que ocorrem em resposta ao herbívoro que se alimenta da planta e que ativam a produção de aldeídos voláteis ainda não é bem entendida (PARÉ e TUMLINSON, 1997).

#### **2.3.4. Síntese de moléculas regulatórias**

As lipoxigenases estão também 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 (SCHEWE et al., 1996). Estes hidroperóxidos podem ser metabolizados em plantas superiores por diferentes enzimas, que incluem hidroperóxido liase e hidroperóxido ciclase (Figura 1).

O ácido 13-hidroperóxido linolênico dá origem, enzimaticamente, ao ácido 12-oxo-cis-9-dodecenóico, por ação de hidroperóxido liase. Esse composto pode ser metabolizado a ácido 12-oxo-trans-10-dodecenóico, também conhecido como traumatina (VICK e ZIMMERMAN, 1987). A traumatina pode ser convertida a ácido traumático pela oxidação do grupamento carbonila (VICK e ZIMMERMAN, 1987) e pode ser responsável pela indução da divisão celular e subsequente formação de calos em plantas submetidas a ferimento, bem como estar envolvida na transdução de sinais em resposta a ferimentos (ZIMMERMAN e COUDRON, 1979). Outro composto produzido por ação de hidroperóxido liase é o trans-2-hexenal, que pode estar envolvido no mecanismo de defesa de plantas contra patógenos (VICK e ZIMMERMAN, 1987) e insetos (CROFT et al., 1993).

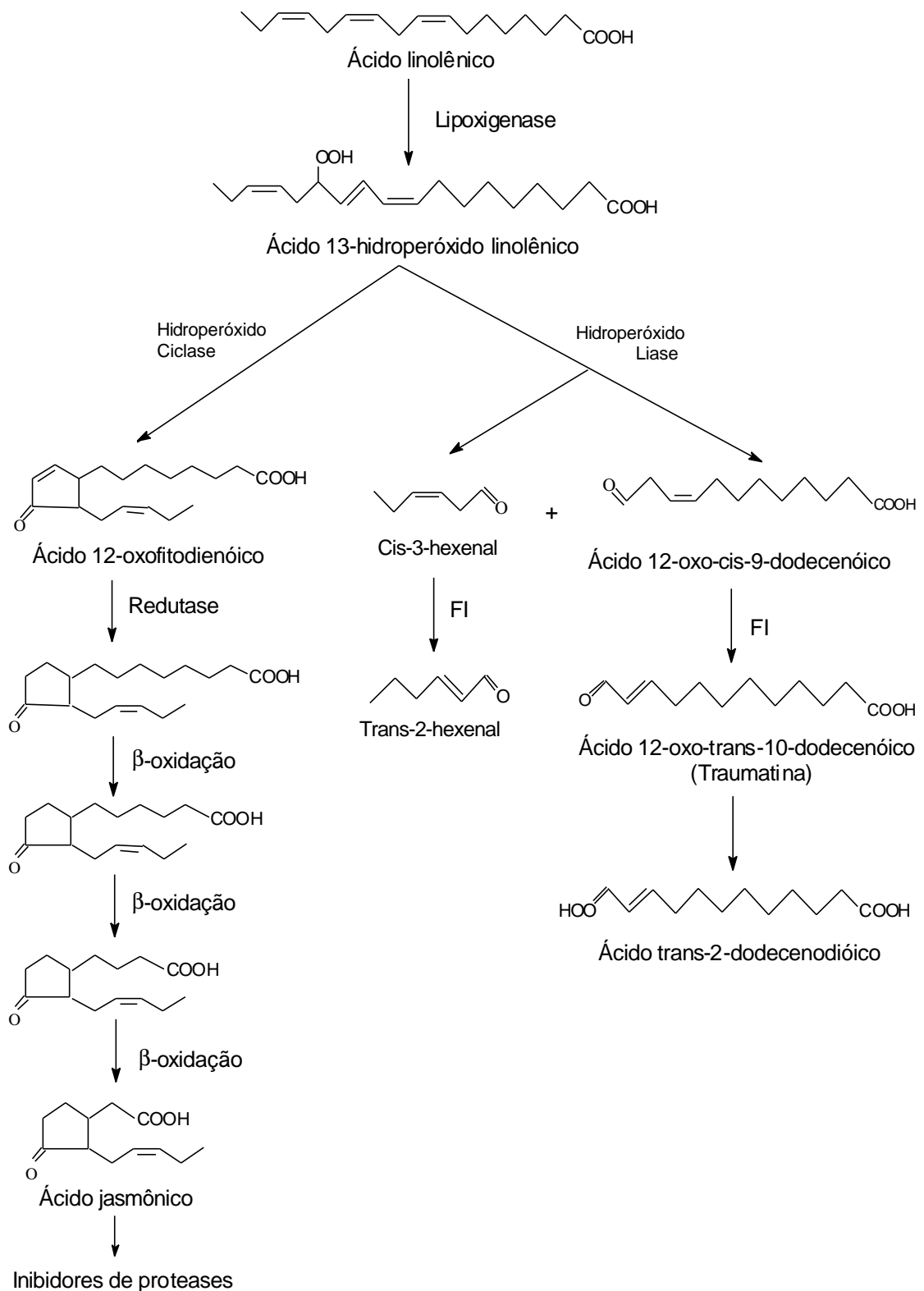


Figura 1 - Via bioquímica das lipoxygenases, mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolênico. FI: fator de isomerização (CROFT et al., 1993; GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992).

A cascata de sinalização intracelular que é ativada em resposta ao ferimento tem mostrado o envolvimento de uma rota derivada de lipídios direcionada para a síntese de ácido 12-oxo-fitodienólico e ácido jasmônico (FARMER e RYAN, 1992), dois ativadores da transcrição de genes de defesa. O ácido 12-oxo-fitodienólico é produzido enzimaticamente por ação de hidroperóxido ciclase sobre o produto primário da reação catalisada por lipoxigenase (ácido 13-hidroperoxilinolênico). A seguir, o ácido 12-oxo-fitodienólico sofre uma redução e três  $\beta$ -oxidações, originando o ácido jasmônico.

O ácido jasmônico tem muitas das características gerais de hormônio ou regulador do crescimento de plantas, que é definido como substância endógena da planta que age em baixas concentrações, afetando processos fisiológicos (DAVIES, 1987). Os jasmonatos estão envolvidos na transdução de moléculas sinais em resposta a estresses vegetais, particularmente ferimento (CREELMAN e MULLET, 1997) e ataque por patógenos (FARMER e RYAN, 1990, 1992; CREELMAN et al., 1992). O ácido jasmônico e sua forma de ocorrência comum, metil jasmonato, afetam uma variedade de processos fisiológicos (KODA, 1992), incluindo a expressão de genes que codificam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1990, 1992),

Danos causados em folhas de plantas de tomate por insetos mastigadores ou outros meios mecânicos resultam numa rápida ativação transcricional de inibidores de proteases (GRAHAN et al., 1986). O modelo proposto por FARMER e RYAN (1992) para genes que codificam inibidores de protease em plantas de tomate mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa (Figura 2). No modelo, os passos-chave envolvem a interação dos sinais com receptores de membrana plasmática e que conduzem à ativação de lipase e o lançamento de ácido linolênico no citoplasma. O ácido linolênico seria convertido a ácido 12-oxo-fitodienólico (por ação da lipoxigenase) e posteriormente a ácido jasmônico, que é proposto interagir com um receptor, para ativar a expressão de genes inibidores de proteases. Tem sido sugerido que uma proteína com 200 resíduos de aminoácidos (prossistemina), presente na membrana, seja processada em um polipeptídeo com 18 resíduos de aminoácidos e que este polipeptídeo atue como um sinal sistêmico na via de transdução de sinais em

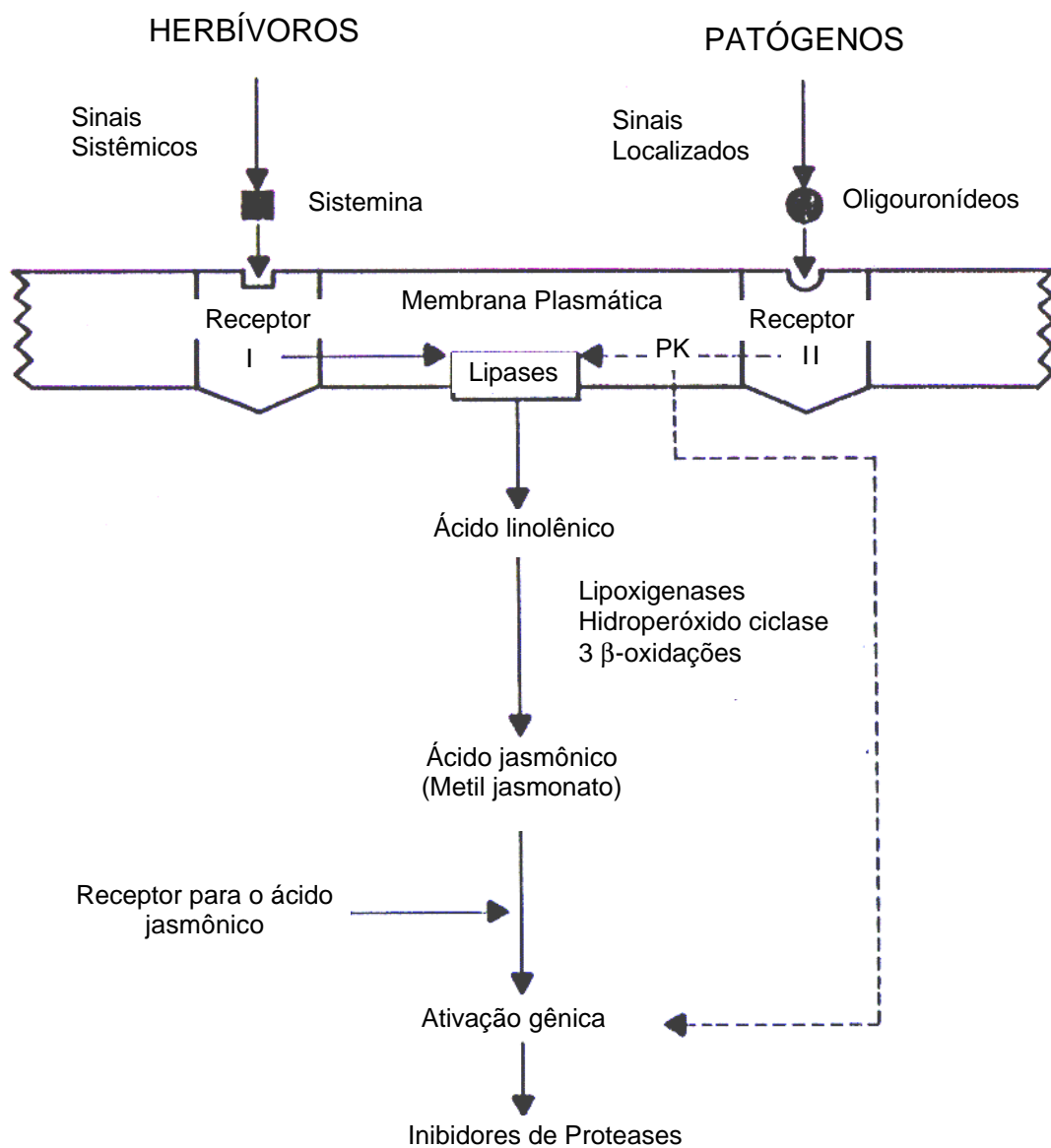


Figura 2 - Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por ferimento em folhas de tomate. PK=Proteína Cinase (FARMER e RYAN, 1992).

plantas atacadas por herbívoros (GREEN e RYAN, 1972; GRAHAN et al., 1986; FARMER e RYAN, 1992; RYAN e PEARCE, 1998). Devido à mobilidade deste polipeptídeo pelo floema, ele foi denominado sistemina (RYAN e PEARCE, 1998). PEARCE et al. (1991) demonstraram que sistemina induz a síntese de dois inibidores de proteases em plantas. GREEN e RYAN (1972) relatam que o ferimento da folha parece ser a causa primária da indução e acumulação de inibidores de proteases. Resultados obtidos por estes mesmos autores estabelecem que inibidores de proteases acumulam-se em tecidos aéreos de plantas de tomate e batata, como uma consequência direta de danos causados por insetos ou ferimento mecânico em folhas.

O ácido jasmônico é um produto da via das lipoxigenases, quando a planta é submetida a estresses, como: ferimento, ataque de insetos-praga e patógenos, excesso de sais e baixos níveis de água. Logo, as isoenzimas de lipoxigenases estão relacionadas com o aumento da expressão diferencial desses genes induzidos por ataque de insetos-praga que atuam no sistema de defesa da planta. A recente observação de que ácido jasmônico e metil jasmonato são poderosos indutores da síntese de inibidores de proteases aumentou a possibilidade de que estes compostos sejam mediadores secundários na indução da expressão de genes inibidores de proteases (STASWICK e WHOWELL, 1992; PEÑA-CORTÉZ et al., 1993; SCHWEIZER et al., 1997). Entretanto, até o momento não se conhece a verdadeira função do ácido jasmônico intracelular nas plantas, já que muitos experimentos têm sido feitos com aplicação exógena deste composto.

#### **2.4. A interação planta-inseto**

Na interação planta-inseto, as plantas têm utilizado uma variedade de moléculas protéicas tóxicas para sua proteção. Inibidores de proteases servem como um mecanismo de defesa da planta (RYAN, 1990). Alguns inibidores de proteases são sintetizados constitutivamente, em altos níveis, em órgãos de reserva, como sementes, enquanto outros são induzidos em folhas após ferimento (GIRI et al., 1998). É postulado que inibidores de proteases têm efeito em proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no

intestino do inseto (HILDER et al., 1987). Os inibidores de serino-proteases, por exemplo, mostram-se capazes de afetar o crescimento de insetos herbívoros e podem funcionar como agentes de defesa da planta contra insetos-praga (JONGMA et al., 1994). Inibidores de tripsina e quimotripsina, expressos em plantas de tabaco transgênica, resultam na redução da reprodução de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (THOMAS et al., 1995). HILDER et al. (1987) sugerem o envolvimento de inibidores de proteases na proteção de plantas contra predação de Lepidoptera. Danos causados em folhas de plantas de tomate por insetos mastigadores ou por meios mecânicos resultam numa rápida ativação transcricional de genes de defesa induzidos por ácido jasmônico, em folhas feridas e distantes (GREEN e RYAN, 1972; HEITZ et al., 1997).

A lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) é um dos grandes problemas da agricultura brasileira, e, atualmente, a mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) também tem se tornado alvo de muitos pesquisadores, devido aos grandes danos causados.

Por se tratar de uma praga que possui aproximadamente 700 plantas hospedeiras, a mosca-branca tem atingido um número variado de culturas, como soja, tomate, feijão, abóbora, jiló, melão, milho, algodão, plantas ornamentais, etc. É um inseto da ordem Hemiptera e possui tamanho aproximado de 0,9 mm. Apesar de ser um inseto muito pequeno, tem causado grandes danos às culturas de soja. É sugador e se alimenta da seiva da planta, podendo levá-la à morte ou à diminuição da produção, especialmente quando há alta densidade populacional do inseto. Além disso, atua como vetor de geminivírus. Quando a mosca se alimenta, ela, além de remover nutrientes, injeta toxinas na planta. Ao se alimentar, a mosca-branca excreta uma substância pegajosa (*honeydew*), que pode provocar o aparecimento de fungos e, ainda, abaixar a capacidade fotossintética e outras funções fisiológicas da planta (FERREIRA e AVIDOS, 1998). Em condições de alta umidade, o acúmulo de “honeydew” resulta no desenvolvimento de fumagina, camada escura sobre a folha, reduzindo a fotossíntese e impedindo a respiração. Em altas proporções, a fumagina poderá interferir na produção da cultura, além de poder atingir o fruto, causando-lhe um efeito prejudicial (GERK, 1993).

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga desfolhadora bastante problemática em culturas brasileiras (CASTIGLIONI e VENDRAMIM, 1996). Mesmo em baixas densidades populacionais, este inseto causa grandes danos à lavoura de soja, que vai desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A lagarta da soja é um inseto mastigador e se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ela ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. Quando se alimentam, além de removerem nutrientes, as lagartas injetam toxinas na planta (GALGARO et al., 1998).

Como as lipoxigenases fazem parte da via de transdução de sinais no mecanismo de defesa de plantas contra insetos-praga, tornam-se cada vez mais importantes a caracterização bioquímica e cinética de cada uma das isoenzimas de lipoxigenase, em especial daquelas presentes nas folhas, e, conseqüentemente, o conhecimento das suas funções bioquímico-genéticas e fisiológicas relacionadas às funções de defesa das plantas contra danos causados por pragas e patógenos e na regulação do metabolismo vegetal pela "Via das Lipoxigenases".

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material genético

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade IAC-100 e da linhagem com ausência completa de LOX nas sementes (IAC-100 TN). Sementes de IAC-100 foram fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. A linhagem IAC-100 TN foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV e se encontra na quinta geração do primeiro retrocruzamento. Foi realizada seleção de plantas mais aparentadas a IAC-100 com base em caracteres morfológicos. As plantas foram germinadas a 27 °C por 48 horas, transferidas para vasos com capacidade para 4,0 kg de solo e cultivadas em condições de casa de vegetação.

Utilizou-se como fonte de enzima a primeira folha trifoliolar de plantas de soja da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN no estágio V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977). Os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

## **3.2. Ataque de insetos**

### **3.2.1. Ataque de moscas-brancas (*Bemisia argentifolii*)**

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram colocadas em gaiolas de filó e submetidas a uma população de moscas-brancas (*Bemisia argentifolii*). Após 12, 24, 48 e 72 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados, para posterior obtenção de extratos foliares. Após estes tempos, os vasos foram transferidos para outra gaiola de filó, com ausência completa dos insetos. O mesmo procedimento de coleta foi efetuado nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após a remoção do inseto. Com o objetivo de se determinar a resposta da planta, a primeira folha trifoliolar foi utilizada para a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos de lipoxigenases. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos em plantas-controle.

### **3.2.2. Ataque de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner)**

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram colocadas em gaiolas de filó e submetidas a uma população de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). Após 6, 12, 24 e 48 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados, para posterior obtenção de extratos foliares. Após estes tempos, as lagartas foram removidas das plantas e o mesmo procedimento de coleta foi efetuado nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas. Com o objetivo de se determinar a resposta da planta, a primeira folha trifoliolar foi utilizada para a determinação dos parâmetros bioquímicos e cinéticos de lipoxigenases. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos em plantas-controle.

## **3.3. Obtenção de extratos foliares**

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

Os folíolos pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido foram triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v), e, em seguida, centrifugado a 17200xg por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para a determinação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985) e para a determinação da atividade de lipoxigenase pelo método espectrofotométrico, utilizando-se linoleato de sódio como substrato (AXELROD et al., 1981).

### **3.4. Métodos analíticos cinéticos**

#### **3.4.1. Determinação da atividade de lipoxigenase**

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

Preparou-se uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de tween 20 (SIGMA). Em seguida, homogeneizou-se a solução com auxílio de uma pipeta automática, de forma a evitar a formação de bolhas. Para o clareamento da solução, foram adicionadas gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL envolvido por papel-alumínio, e o volume, aferido. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos eppendorf de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio e armazenados a -20 °C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, misturaram-se 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,0. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por um período de 2,5 minutos. Sob as mesmas condições procedeu-se com o branco, que

consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. Experiência anterior do laboratório de Enzimologia, BIOAGRO/UFV, demonstrou que nestas condições de reação a atividade é linear com o tempo. As velocidades iniciais foram determinadas pela medida de absorção a 234 nm em função do tempo, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para o produto formado. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas.

### 3.4.2. Efeito do pH sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja

Nas determinações dos perfis de pH, 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
monofosfato/fosfato dissódico	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
ácido bórico/borato de sódio	9,0-10

As determinações das atividades de lipoxigenases nos respectivos valores de pH foram realizadas misturando-se 1,0  $\mu\text{L}$  do extrato bruto foliar a 4,0  $\mu\text{L}$  da solução-estoque de linoleato de sódio a 1,0 mL de tampão 0,05 M de cada um dos respectivos pH descritos anteriormente. Para cada valor de pH foram feitas análises em triplicata. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por um período de 2,5 minutos, a 25 °C.

A partir das absorvâncias obtidas, foram calculadas as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico utilizando-se a equação (1); em seguida, construiu-se um gráfico tendo na ordenada as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico e na abscissa os valores de pH analisados.

### **3.4.3. Efeito da temperatura sobre a atividade de lipoxigenases de plantas de soja**

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

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

### **3.4.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases em plantas de soja**

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

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

### **3.5. Quantificação de proteínas totais no extrato bruto**

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

Para as determinações de concentrações de proteínas, utilizou-se o kit SIGMA como reagente de trabalho, que se constituiu de uma solução de ácido bicinconínico e uma solução de sulfato de cobre (II) – pentahidratado 4% (p/v).

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

### 3.6. Determinação de inibidores de proteases

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

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

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P} \quad (2)$$

em que

A = absorvância em 410 nm do padrão - absorvância em 410 nm da amostra;

B = diluição da amostra;

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

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNA dá uma leitura de absorvância em 410 nm. No caso de tripsina, sobre D,L-BapNA = 0,019 (KAKADE et al., 1974).

### **3.7. Determinação de aldeídos totais**

Nas determinações de aldeídos totais nos extratos foliares, foi utilizado o método colorimétrico desenvolvido por SANTOS et al. (1993), utilizando-se 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente de cor.

A 50 mg de folhas liofilizadas e moídas foram adicionados 4 mL de etanol 2%. Após ser mantido por duas horas à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 31.000 g por 15 minutos, a 15 °C. Para a reação do teste, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, à qual foram adicionados 0,5 mL de solução de MBTH 0,1% e 1,25 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,23%. Exatamente 6 min após a adição de FeCl<sub>3</sub>, adicionaram-se 3 mL de acetona. Para a reação do controle, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, à qual foram adicionados 3 mL de acetona, impedindo que a reação ocorresse, e a seguir 0,5 mL de MBTH 0,1% e 1,25 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,23%. As leituras da absorvância foram feitas a 635 nm, sendo os resultados expressos como a diferença da absorvância observada ao final da reação e na reação controle. As análises foram realizadas em três repetições.

### **3.8. Determinação de hexanal**

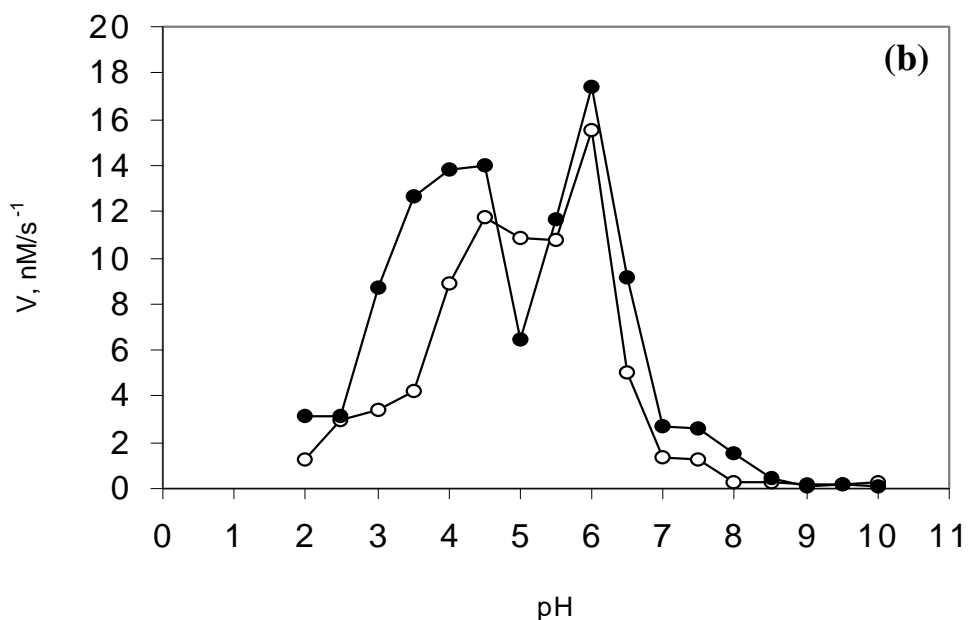
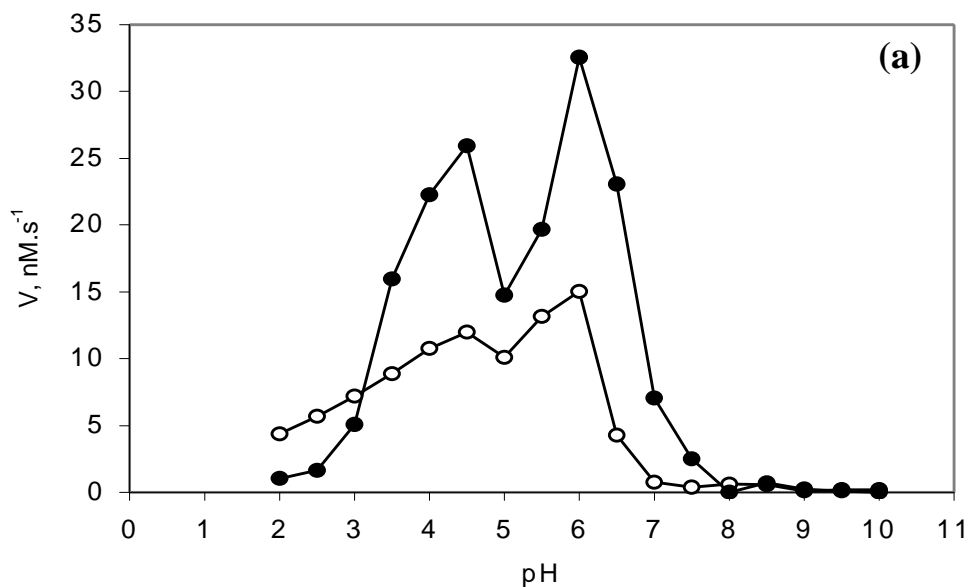
A determinação de hexanal foi realizada por cromatografia gasosa, pelo método do “head-space”, segundo UTUMI et al. (1998), em frascos tipo penicilina, hermeticamente fechados, contendo 50 mg da folhas liofilizadas e

moídas e 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, aquecidos a 40 °C por 20 minutos. A partir dos gases liberados, 0,8 mL foi injetado automaticamente em cromatógrafo a gás SHIMADZU, modelo GC-14 B, equipado com detector de ionização de chama, "head-space sampler" modelo HSS-2B, e integrador C-R7A. As análises foram realizadas em três repetições, sob as seguintes condições: temperatura inicial de coluna de 45 °C, programada para elevar a 7 °C por minuto até 70 °C, temperatura esta mantida por 5 minutos, elevando-se posteriormente para 15 °C por minuto, até 200 °C; temperatura do injetor, 200 °C; e do detector, 250 °C. Utilizou-se coluna carbowax (25 m x 0,53 mm), e o gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo de 5,7 mL/min. A identificação de hexanal foi realizada por injeção prévia de um composto-padrão, e os resultados foram expressos em área do pico, em milivolts.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 3 e 4 apresentam os perfis pH versus atividade de lipoxigenase sobre a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico, da primeira folha trifoliolar de plantas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, coletadas 24 horas após remoção da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) e 48 horas após a remoção da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hubner), com seus respectivos controles. As Figuras 5 e 6 mostram os perfis de pH versus atividade específica, para os dois tratamentos. Os perfis para os demais tempos de análise, para os dois genótipos analisados, nos dois tratamentos, apresentaram-se semelhantes (dados não-mostrados).

Os resultados das Figuras 3 e 4 mostram dois picos mais acentuados de atividade de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0 para os dois genótipos analisados e seus respectivos controles. A existência de dois picos distintos sugere a atuação de isoenzimas no mecanismo de defesa de plantas de soja pela via das lipoxigenases. Isto é confirmado através das Figuras 5 e 6, em que a distância entre os picos da atividade específica de lipoxigenase para os dois genótipos analisados e seus respectivos controles não sofreu variação, mostrando que não ocorre ativação enzimática, mas sim atuação de isoenzimas. Estas figuras mostram ainda que os valores observados de atividade e atividade específica se apresentaram maiores nos testes do que nos respectivos controles. Essa última observação sugere que as plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca e de lagarta da soja responderam a esses tipos de estresse através do aumento de atividade de lipoxigenases.

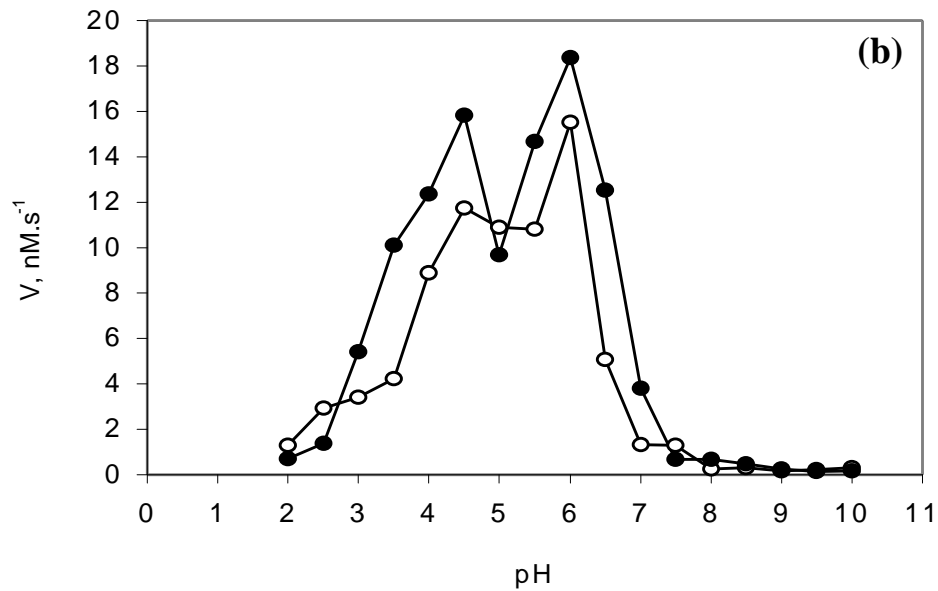
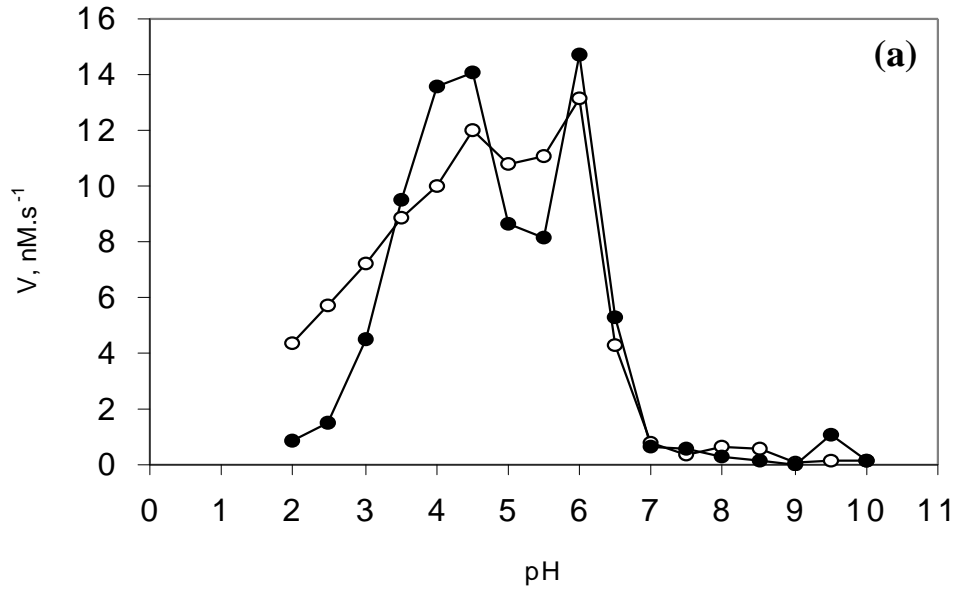


(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Condições experimentais: extrato bruto obtido dos folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 50 mM: 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 mono/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  $\mu$ L.

Figura 3 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de mosca-branca, e seu respectivo controle.

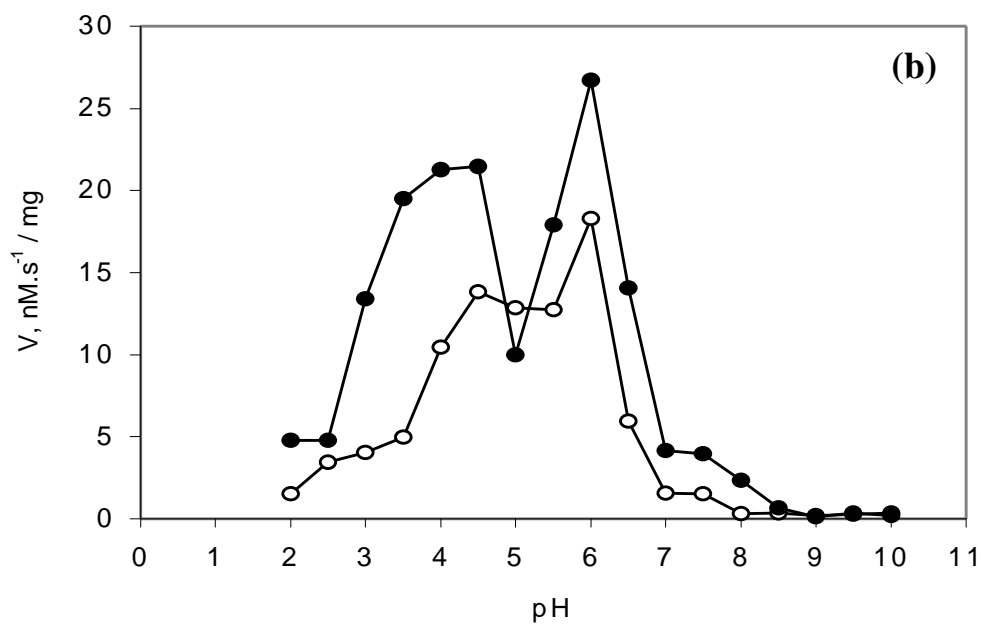
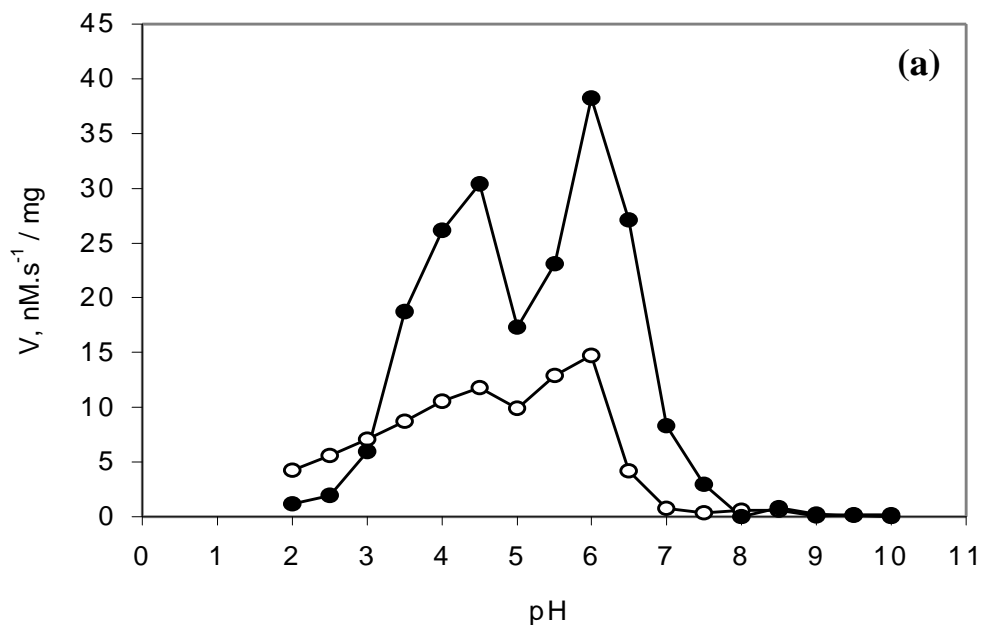


(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Condições experimentais: extrato bruto obtido dos folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Enzima e substrato incubados a 25 °C, nos seguintes tampões 50 mM: 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 mono/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  $\mu$ L.

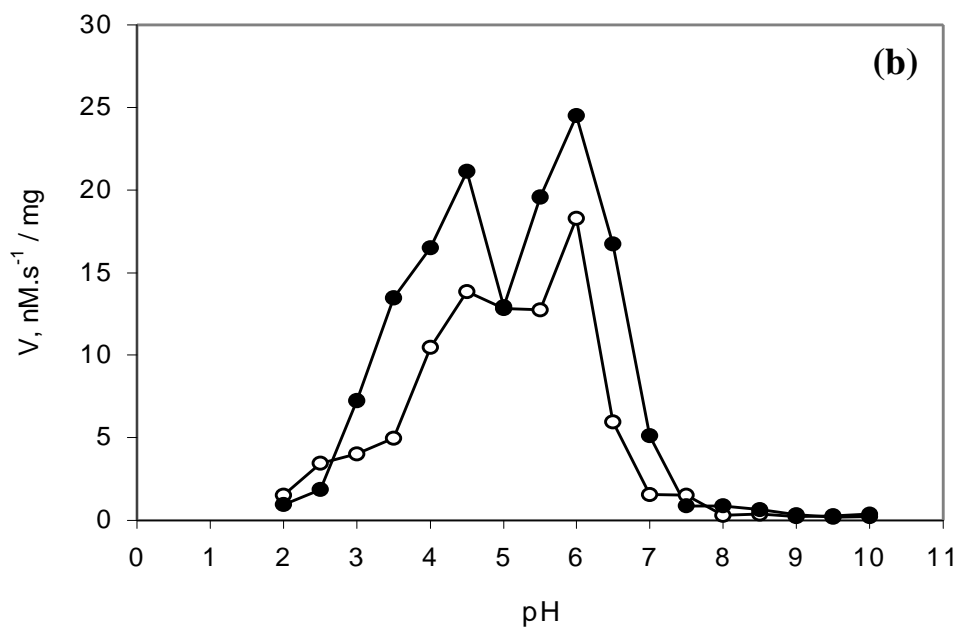
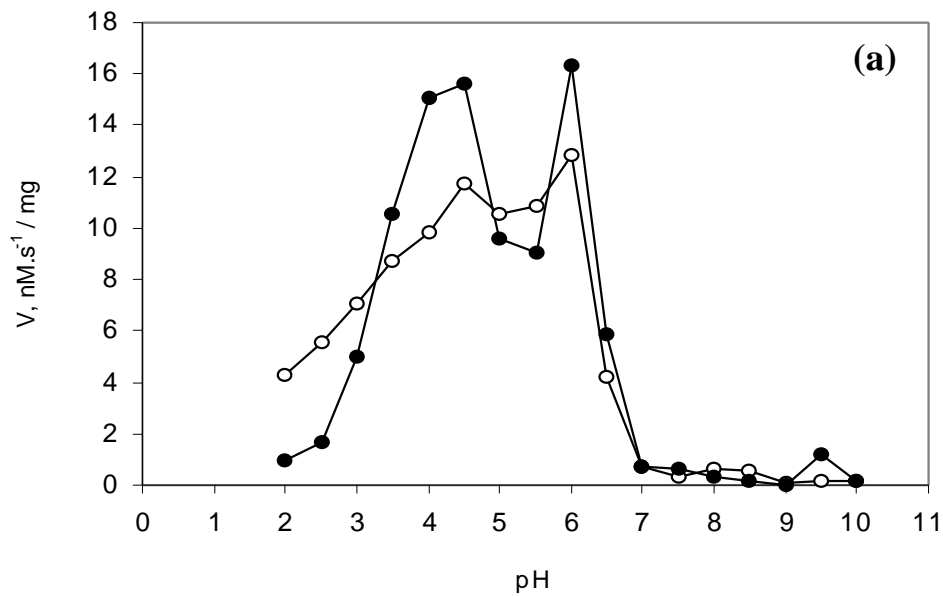
Figura 4 - Efeito do pH sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de lagarta da soja, e seu respectivo controle.



(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.  
 (○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Folículos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto, em vários valores de pH.

Figura 5 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de mosca-branca, e seu respectivo controle, em vários valores de pH.



(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.  
 (○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Folículos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto, em vários valores de pH.

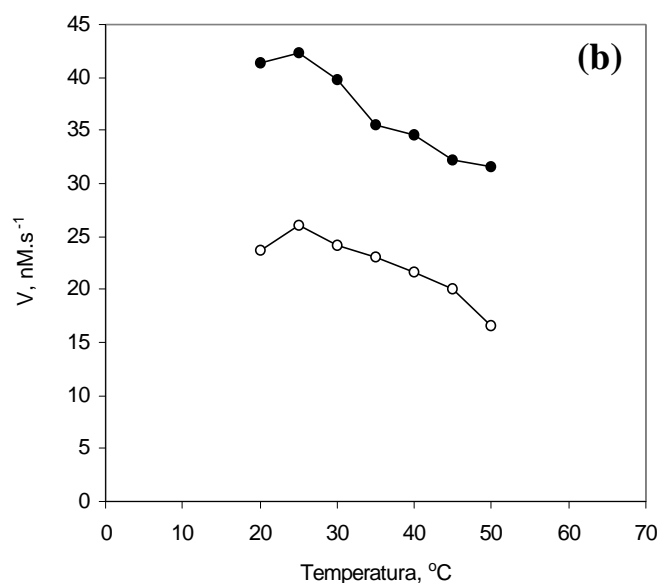
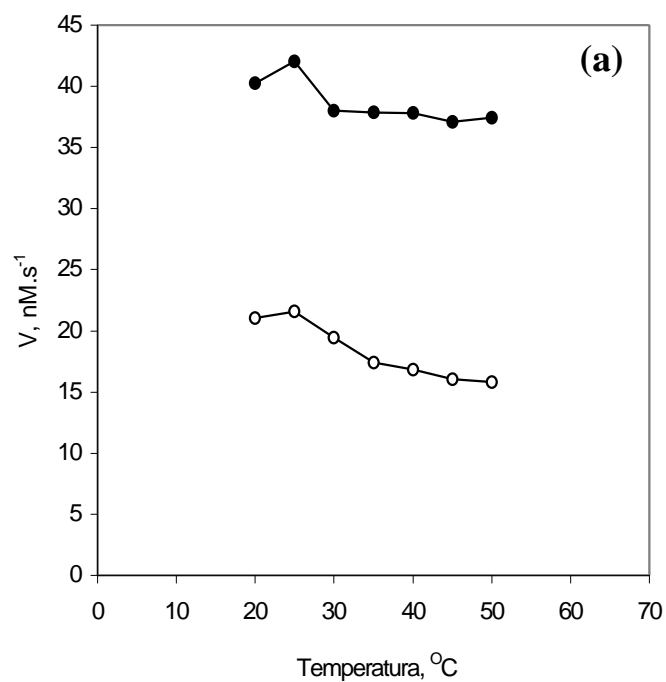
Figura 6 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de lagarta da soja, e seu respectivo controle, em vários valores de pH.

Os valores de pH ótimo para a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca e de lagarta da soja, estão dentro da faixa de pH ótimo encontrada por outros autores em outros estudos, como REDGEL et al. (1995) em sementes de ervilha, pH ótimo 6,8; AVDIUSHIKO et al. (1993) em pepino, pH ótimo 5,0; MINGUES–MOSQUEIRA et al. (1993) em pimentão, pH ótimo 6,5; KOCK et al. (1992) em folhas de tomate inoculadas com *pseudomonas*, pH ótimo entre 6,4 e 7,2; LEONI et al. (1985) em semente de girassol, pH ótimo 6,2; e GALLIARD e PHILLIPS (1971) em tubérculos de batata, pH 5,5–6,0.

Os picos para formação de hidroperóxidos de ácido linoléico catalisada por lipoxigenases, determinados neste experimento, também estão em concordância com os resultados obtidos por outros autores em plantas de soja. KATO et al. (1993) caracterizaram uma lipoxigenase de folha de soja que aparece após a remoção dos primórdios florais, com pico de pH em 6,4, denominada L-4. LANNA et al. (1996) caracterizaram lipoxigenases de folha de soja dos genótipos Cristalina e IAC-100 com alta atividade em pH 6,0, do genótipo UFV-TN com pH ótimo em 7,0 e, ainda, outros picos de atividade em pH 4,5 e 7,5. SARAIVITZ e SIEDOW (1996) e VIEIRA (1999) também caracterizaram lipoxigenases de folhas de soja submetidas a ferimento mecânico observando picos de pH para formação de hidroperóxidos em pH 7,0 (SARAIVITZ e SIEDOW, 1996) e pH 4,5 e 6,0 (VIEIRA, 1998).

Assim, a faixa de pH observada em neste trabalho é similar aos dados obtidos na literatura e sugere o envolvimento de isoenzimas lipoxigenase no mecanismo de defesa de plantas de soja contra o ataque de insetos-praga, devido à presença de dois picos distintos de atividade.

As Figuras 7 e 8 apresentam os perfis de temperatura versus atividade de lipoxigenase de folhas de soja sobre o ácido linoléico a pH 6,0 dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, coletadas 24 horas após a remoção da mosca-branca e 48 horas após a remoção da lagarta da soja, respectivamente, com seus controles. As Figuras 9 e 10 apresentam os mesmos perfis expressos em atividade específica. Os perfis para os demais tempos de análise não foram apresentados.

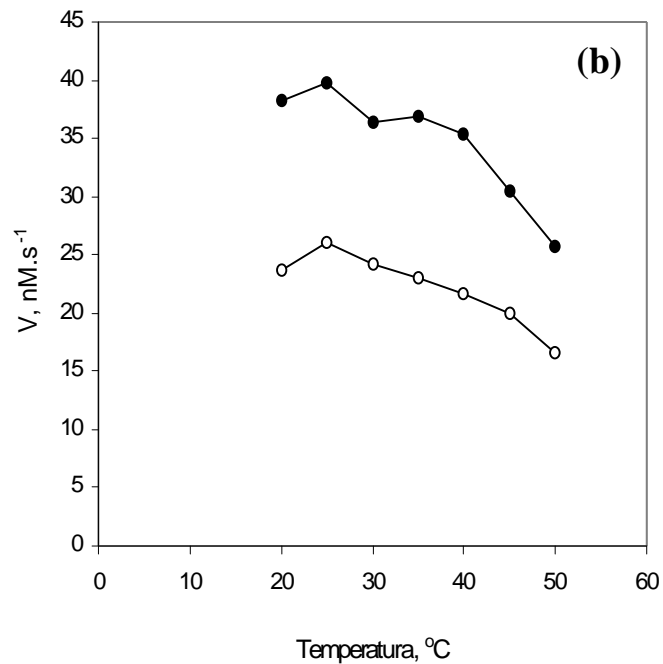
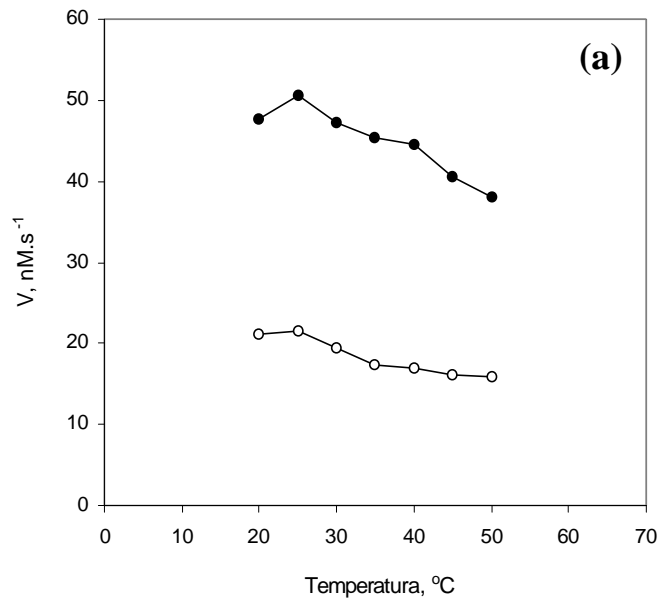


(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Condições experimentais: extrato bruto dos folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Tampão acetato de sódio 50,0 mM, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Concentração do ácido linoléico:  $4,0 \times 10^{-5}$  M. Quantidade de extrato bruto: 1 $\mu$ L.

Figura 7 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácidos linoléicos catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), de plantas atacadas por mosca-branca, e seu respectivo controle.



(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Condições experimentais: extrato bruto dos folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Tampão acetato de sódio 50,0 mM, pH 6,0, a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50  $^{\circ}\text{C}$ . Concentração do ácido linoléico:  $4,0 \times 10^{-5}$  M. Quantidade de extrato bruto:  $1\mu\text{L}$ .

Figura 8 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de formação de hidroperóxidos de ácidos linoléicos catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), de plantas atacadas por lagarta da soja, e seu respectivo controle.

Observam-se valores mais acentuados de atividade a 25 °C para os dois genótipos e seus respectivos controles. As Figuras 9 e 10 mostram aumento de atividade de lipoxigenase em folhas de soja submetidas ao ataque de insetos, em comparação com os respectivos controles. Os dados de atividade específica sugerem uma resposta da planta de soja a este tipo de estresse, pela via das lipoxigenases.

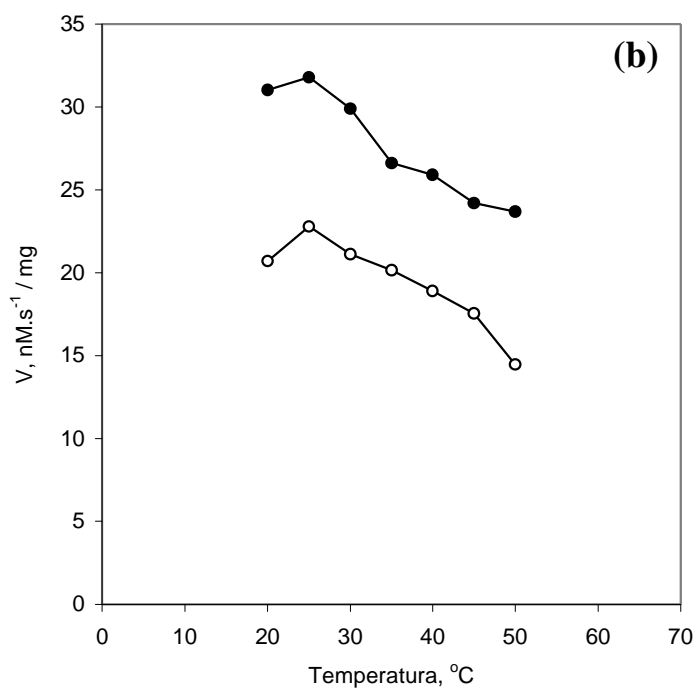
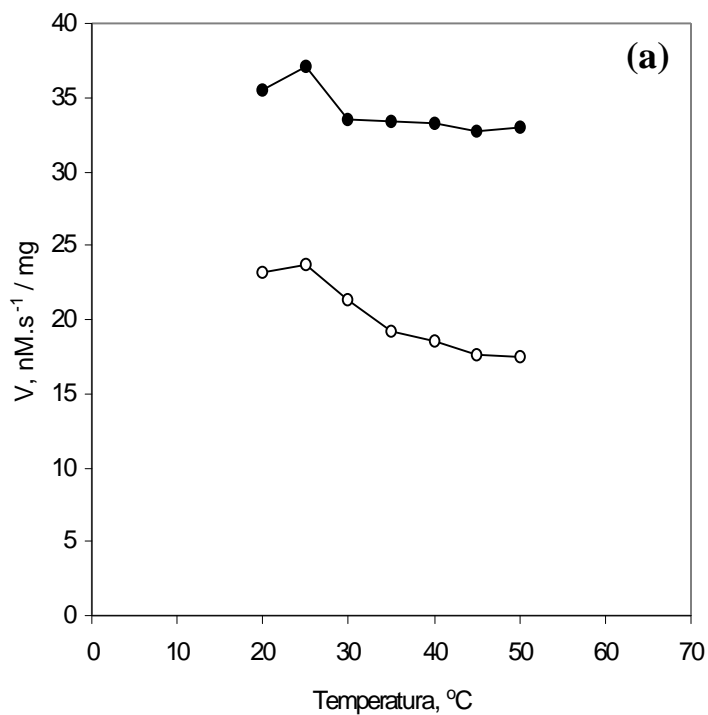
Os dados deste trabalho concordam com os resultados obtidos por LANNA et al. (1996) para lipoxigenases foliares de soja no estágio V4 de desenvolvimento dos genótipos IAC-100, UFV-TN e Cristalina e também com os dados obtidos por VIEIRA (1998) para lipoxigenases foliares de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, de plantas da variedade IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, submetidas a ferimento mecânico, em que apresentaram pico de atividade a 25 °C.

Os gráficos de Michaelis-Menten para a variedade IAC-100 e para a linhagem IAC-100 TN, no tempo de 24 horas após a remoção da mosca-branca e 48 horas após a remoção da lagarta da soja, encontram-se representados nas Figuras 11 a 14. Nestas figuras encontram-se ainda inseridos os gráficos de Lineweaver-Burk.

Nos dois tratamentos, ambos os genótipos apresentam gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que o “pool” de lipoxigenases de folhas de soja submetidas a ataque de insetos segue a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada. Os gráficos para os demais tempos do tratamento apresentam perfis semelhantes.

Os Quadros 1 e 2 apresentam os valores de  $K_{M\ app}$  e  $V_{m\áx\ app}$ , em pH 6,0, para as isoenzimas lipoxigenase de folhas de soja, primeira folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca e lagarta da soja, respectivamente, e seus controles, utilizando-se ácido linoléico como substrato.

Para os dois genótipos analisados no tratamento com mosca-branca, os valores de  $K_{M\ app}$  determinados no “pool” de lipoxigenases de folhas de soja, em 12, 24, 48 e 72 horas, em presença do inseto, foram menores do que os respectivos controles. Além disso, os valores de  $K_{M\ app}$  diminuíram, para ambos os genótipos, com o tempo de ataque da planta pelo inseto, ou seja,

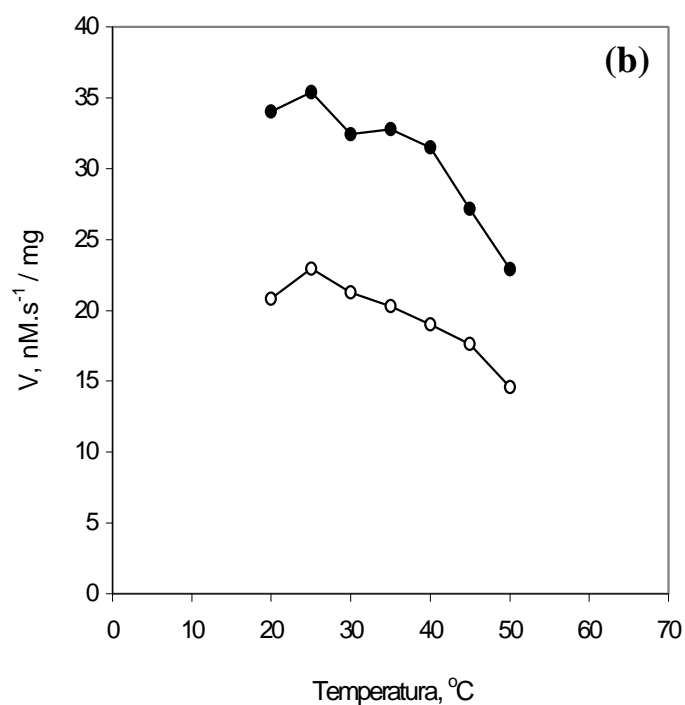
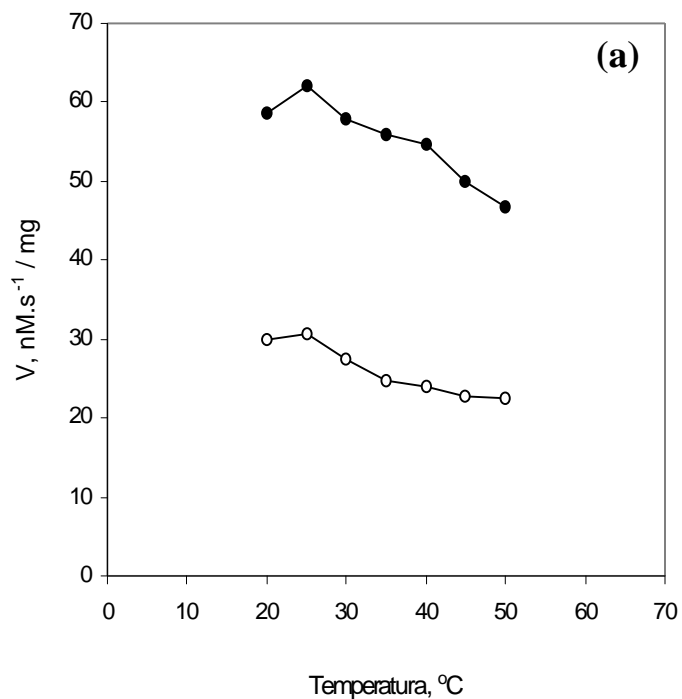


(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

Folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto, em vários valores de pH.

Figura 9 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de mosca-branca, e seu respectivo controle, em vários valores de temperatura.

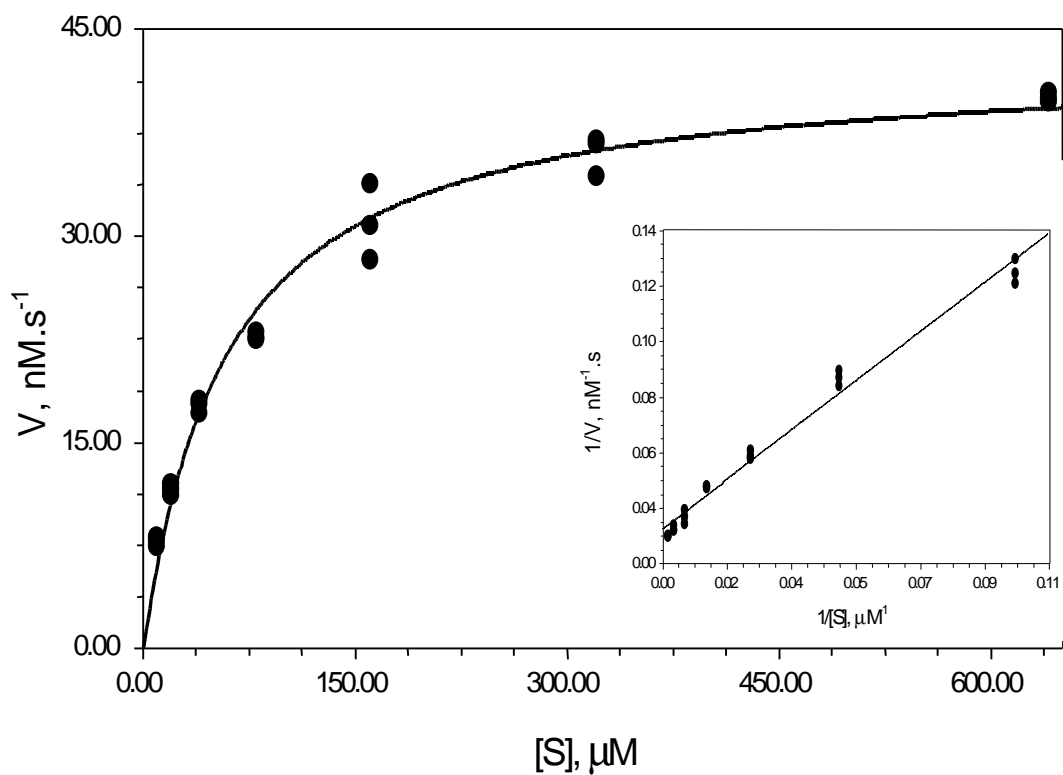


(●—●) representa as velocidades da reação enzimática em plantas atacadas por mosca-branca.

(○—○) representa as velocidades da reação enzimática em plantas-controle.

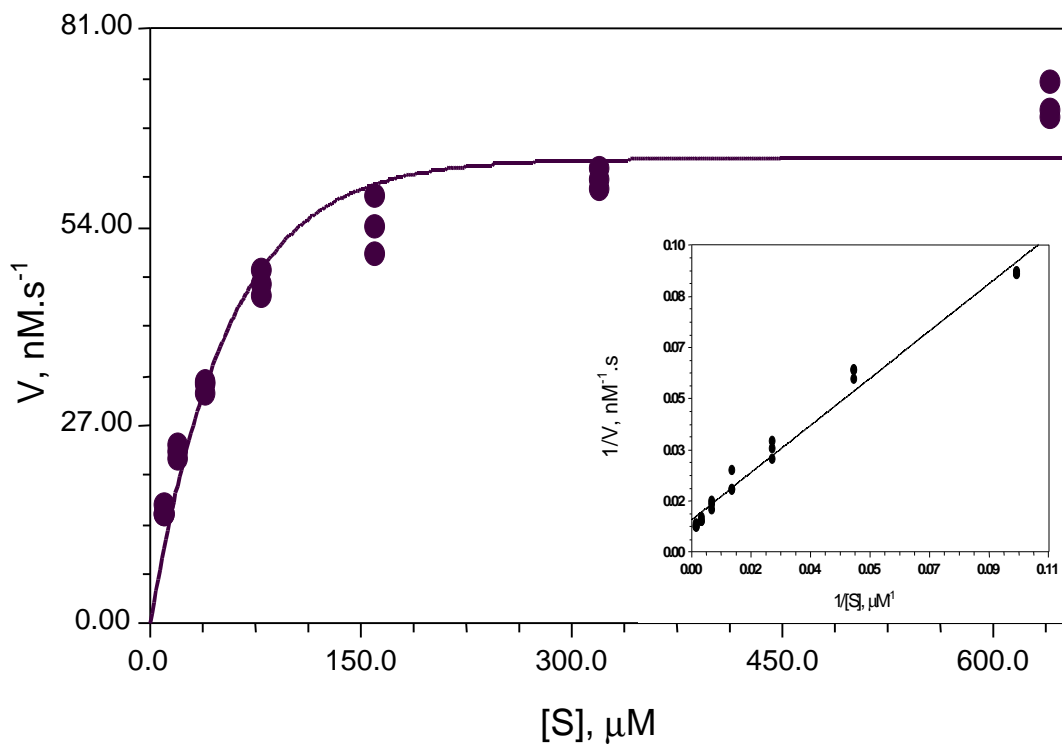
Folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto, em vários valores de pH.

Figura 10 - Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da variedade IAC-100 (a) e da linhagem IAC-100 TN (b), submetidas ao ataque de lagarta da soja, e seu respectivo controle, em vários valores de temperatura.



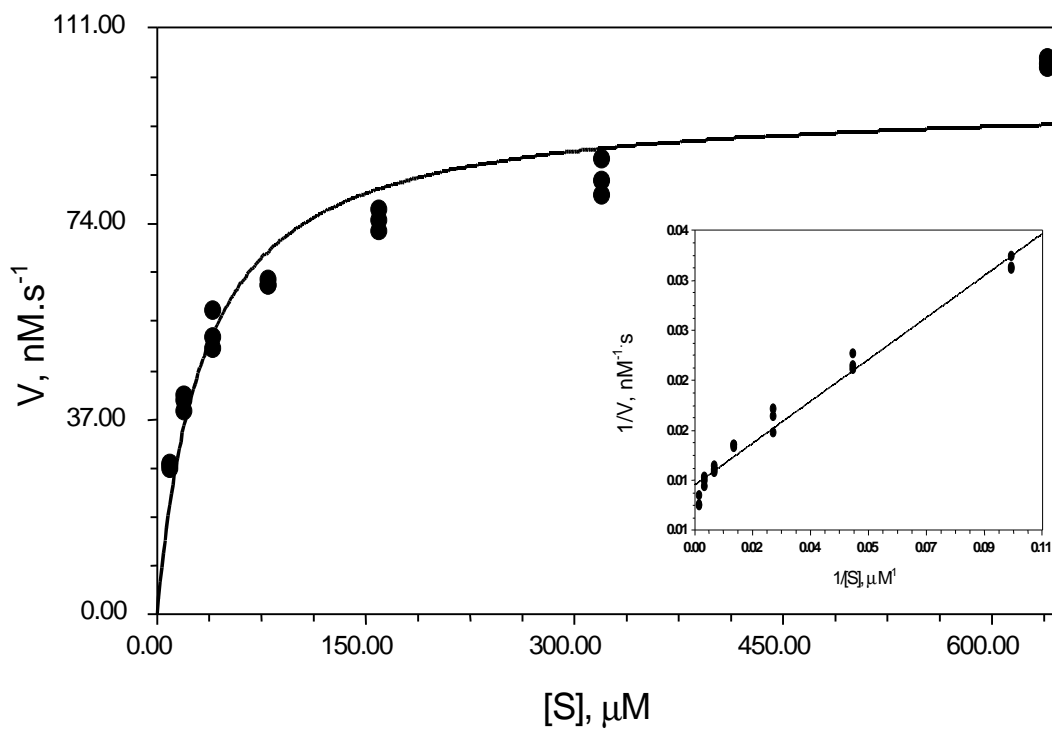
Condições experimentais: extrato bruto preparado a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 a 0,64 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 0,96 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  $V_{m\áx\ app}$ . Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

Figura 11 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja de plantas do genótipo IAC-100, submetidas ao ataque de mosca-branca.



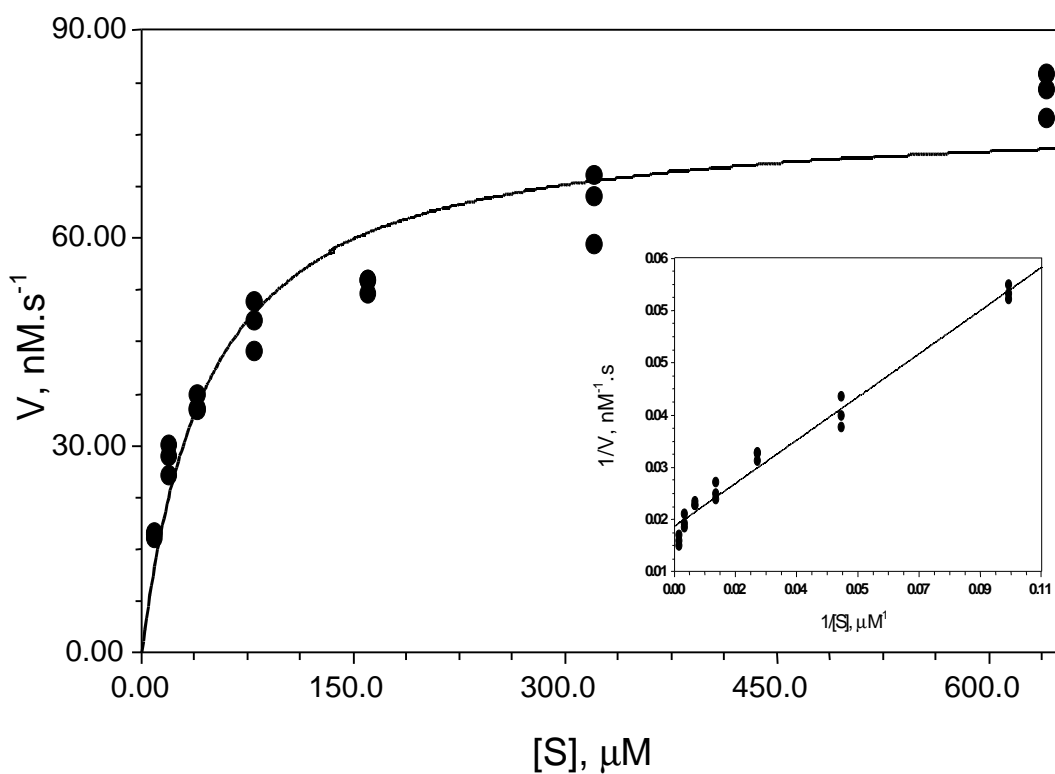
Condições experimentais: extrato bruto preparado a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 a 0,64 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 0,96 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.

Figura 12 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja de plantas do genótipo IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca.



Condições experimentais: extrato bruto preparado a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 a 0,64 mM. Quantidade de extrato bruto: 1  $\mu\text{L}$ . Concentração de proteína total no extrato bruto: 0,96 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.

Figura 13 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja de plantas do genótipo IAC-100, submetidas ao ataque de lagarta da soja.



Condições experimentais: extrato bruto preparado a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 24 horas após a remoção do inseto. Reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico: 0,01 a 0,64 mM. Quantidade de extrato bruto: 1  $\mu\text{L}$ . Concentração de proteína total no extrato bruto: 0,96 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.

Figura 14 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de soja de plantas do genótipo IAC-100 TN, submetidas ao ataque de lagarta da soja.

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

Tempo (horas)	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle		Mosca-branca		Controle		Mosca-branca	
	$K_M \text{ app } (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} \text{ (nM/s)}$	$K_M \text{ app } (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} \text{ (nM/s)}$	$K_M \text{ app } (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} \text{ (nM/s)}$	$K_M \text{ app } (\mu\text{M})$	$V_{\text{máx app}} \text{ (nM/s)}$
Em presença do inseto								
12	122,47	227,70	87,78	131,39	116,74	112,22	96,15	81,92
24	120,74	112,22	79,69	83,64	110,87	105,43	80,84	70,15
48	122,19	179,43	68,65	69,36	114,17	99,26	60,41	61,42
72	125,20	112,17	36,77	71,86	117,85	144,27	54,29	87,06
Após remoção do inseto								
6	123,58	98,46	40,19	76,03	116,00	123,83	51,45	84,21
12	121,17	79,21	44,67	60,28	115,91	119,31	44,50	71,87
24	122,98	149,19	58,99	42,99	116,78	105,42	51,23	60,33
48	110,87	109,73	94,48	74,33	119,21	174,88	101,51	95,88

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

Tempo (horas)	IAC-100				IAC-100 TN			
	Controle		Lagarta		Controle		Lagarta	
	$K_{M\ app}$ ( $\mu$ M)	$V_{m\áx\ app}$ (nM/s)	$K_{M\ app}$ ( $\mu$ M)	$V_{m\áx\ app}$ (nM/s)	$K_{M\ app}$ ( $\mu$ M)	$V_{m\áx\ app}$ (nM/s)	$K_{M\ app}$ ( $\mu$ M)	$V_{m\áx\ app}$ (nM/s)
Em presença do inseto								
6	119,44	174,76	105,7150	217,4070	117,91	142,13	118,1620	280,6000
12	122,47	127,70	101,1060	134,6990	116,74	112,22	112,5050	167,6710
24	120,74	112,22	94,0622	228,691	110,87	105,43	92,4810	176,5040
Após remoção do inseto								
6	123,58	98,46	66,3952	121,6390	116,00	123,83	65,2444	106,1270
12	121,17	79,21	46,9640	115,8350	115,91	119,31	48,5869	116,3663
24	122,98	149,19	46,8881	81,1135	116,78	105,42	45,0425	77,1612
48	110,87	109,73	31,5046	95,6214	119,21	174,88	32,9958	68,1459

ocorreu decréscimo do valor de  $K_{M\ app}$  de 12 até 72 horas, em presença do inseto, na planta de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN. Após a remoção do inseto da planta de soja, ou seja, 6, 12, 24 e 48 horas, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, os valores de  $K_{M\ app}$  do “pool” de lipoxigenases foram aumentando novamente e, 48 horas após a remoção do inseto, se equipararam aos valores dos controles para IAC-100 e IAC-100 TN. Os dados sugerem que a planta continua tendo resposta ao ataque de mosca-branca, através da via das lipoxigenases, até 24 horas após remoção do inseto.

Para o tratamento com lagarta da soja, os valores de  $K_{M\ app}$  determinados no “pool” de lipoxigenases de folhas de soja, em 6, 12 e 24 horas, em presença do inseto, apresentaram-se menores do que os respectivos controles, para os dois genótipos analisados. Além disso, os valores de  $K_{M\ app}$  decrescem para ambos os genótipos com o tempo de ataque da planta pelo inseto, ou seja, ocorreu decréscimo do valor de  $K_{M\ app}$  de 6 até 24 horas em presença do inseto na planta de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN. Após a remoção do inseto da planta de soja, ou seja, 6, 12, 24 e 48 horas, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, os valores de  $K_{M\ app}$  do “pool” de lipoxigenases continuam diminuindo até o tempo de 48 horas após a remoção do inseto, sugerindo que a planta continuou tendo resposta ao ataque de lagarta da soja, através da via das lipoxigenases, até 48 horas após esta remoção.

A diminuição dos valores de  $K_{M\ app}$  para os dois genótipos, nos dois tratamentos, reflete uma alteração do “pool” de lipoxigenases em resposta ao ataque de mosca-branca e de lagarta da soja, demonstrando uma otimização da atuação destas isoenzimas ao ataque dos insetos.

A diferença pouco pronunciada nos valores de  $K_{M\ app}$ , entre os dois genótipos analisados, sugere que a remoção genética das três lipoxigenases de sementes não alterou o mecanismo de defesa da planta de soja contra insetos-praga, através da via das lipoxigenases.

As Figuras 15 e 16 e os Quadros 3 e 4 representam os resultados de inibidores de proteases expressos em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína, para a variedade IAC-100 e para a linhagem IAC-100 TN, de plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca e lagarta da soja, respectivamente.

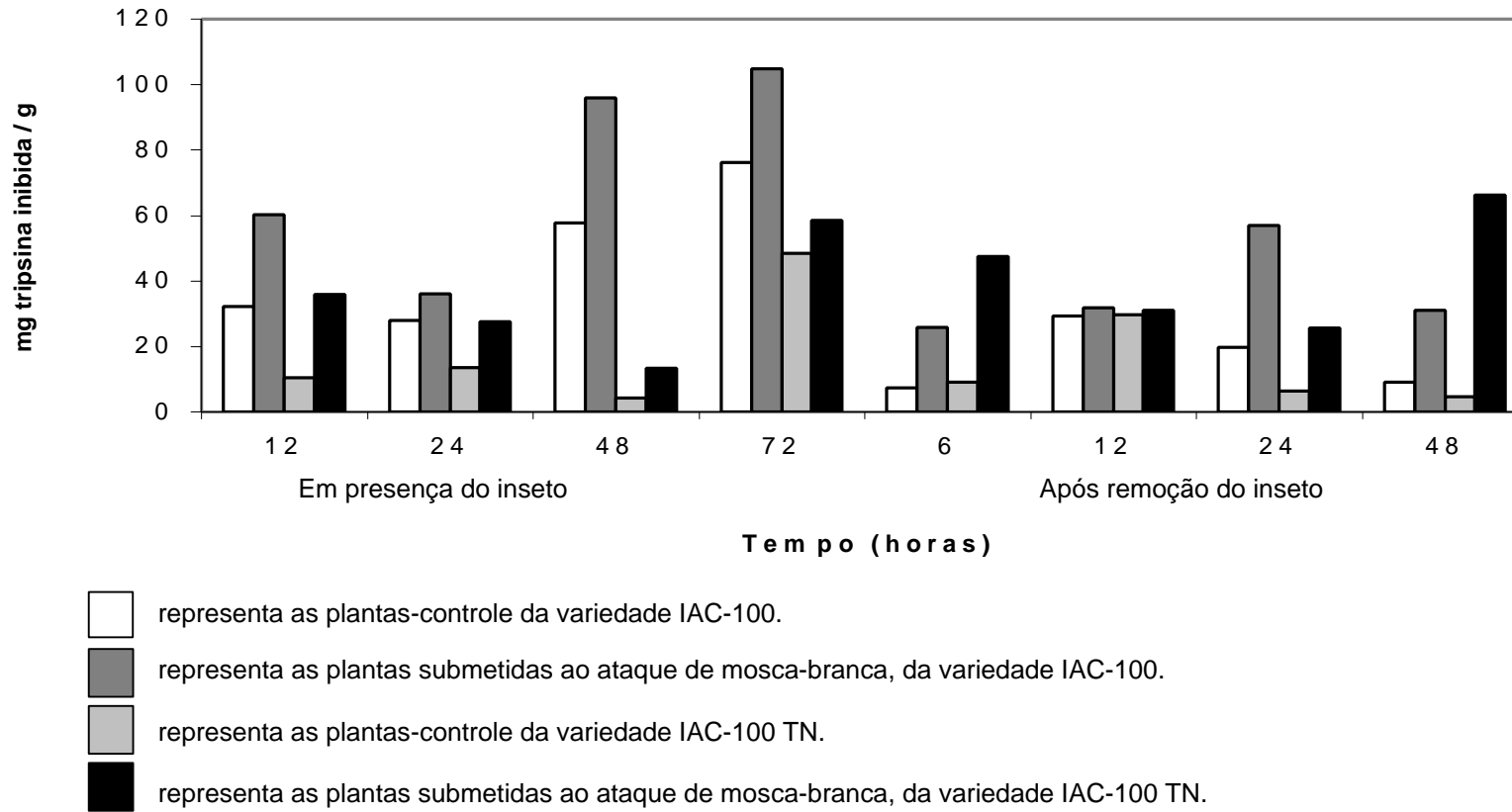


Figura 15 - Miligrama de tripsina inibida por grama de proteína em folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca.

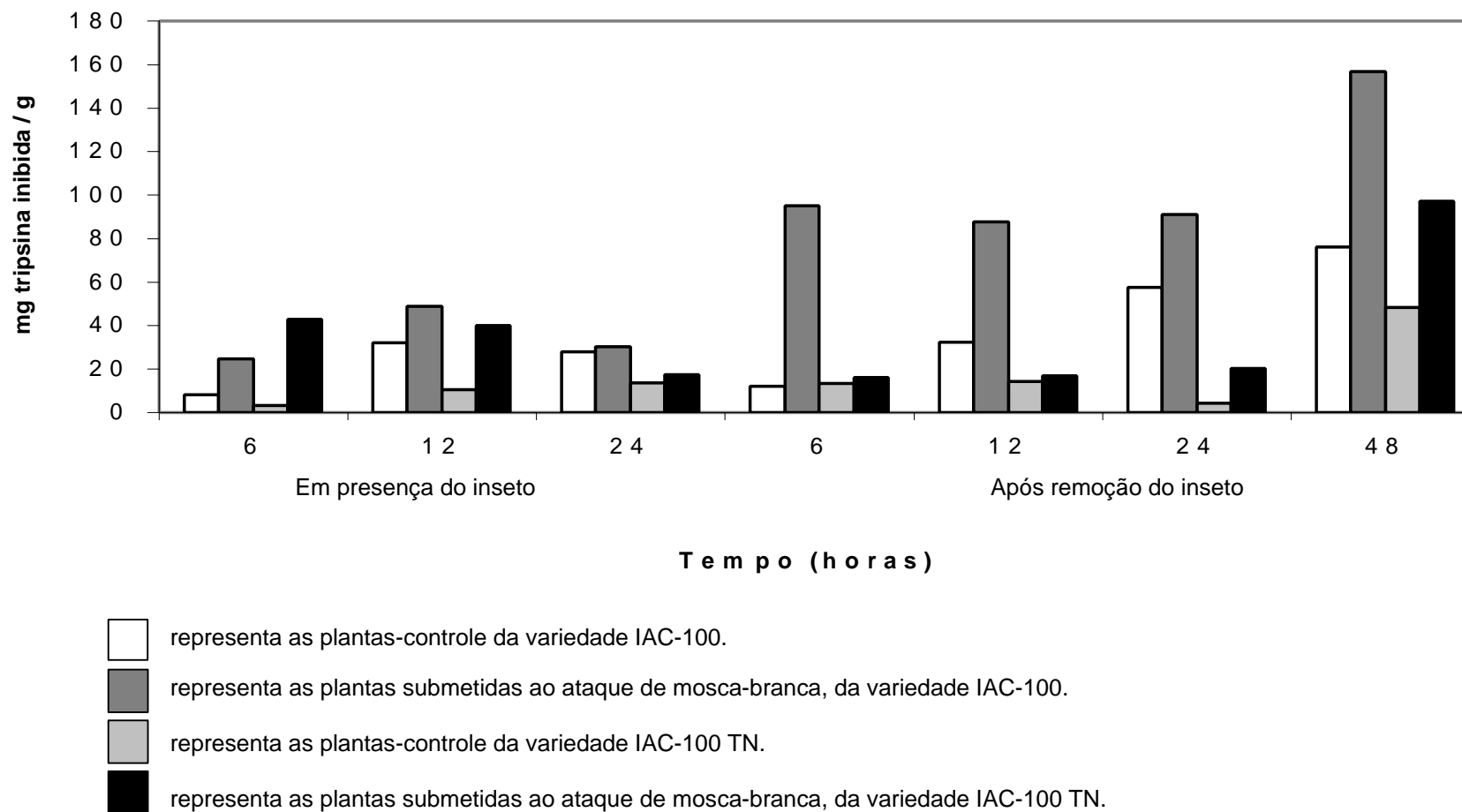


Figura 16 - Miligrama de tripsina inibida por grama de proteína em folhas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de lagarta da soja.

Quadro 3 - Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas a ataque de mosca-branca

mg tripsina inibida / g				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Mosca-branca	Controle	Mosca-branca
Em presença do inseto				
12	32,19 <sup>1</sup>	60,29	10,53 bc B	35,81 b A
24	27,97	36,12	13,59 b B	27,46 c A
48	57,69	95,89	4,36 c B	13,44 d A
72	76,20	104,84	48,42 a B	58,47 a A
Após remoção do inseto				
6	7,28 a A	29,31 a A <u>a</u> <u>A</u>	9,10 b B	47,45 b A <u>ab</u> <u>A</u>
12	29,35 a A	28,86 a A <u>a</u> <u>A</u>	29,72 a A	30,93 c A <u>b</u> <u>A</u>
24	19,71 a B	57,02 a A <u>a</u> <u>A</u>	6,41 b B	25,50 c A <u>b</u> <u>B</u>
48	9,05 a B	49,51 a A <u>a</u> <u>A</u>	4,72 b B	66,31 a A <u>a</u> <u>A</u>

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

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

Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 4 - Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas a ataque de lagarta da soja

mg tripsina inibida / g				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Lagarta	Controle	Lagarta
Em presença do inseto				
12	8,35 <sup>1</sup>	24,71	3,38	43,01
24	32,19	48,94	10,53	40,18
48	27,97	30,47	13,59	17,57
Após remoção do inseto				
6	12,14 c B	95,26 b A	13,26 b A	16,15 b A
12	32,35 b B	87,67 b A	14,48 b B	16,90 b A
24	57,69 ab B	91,06 b A	4,36 c B	20,44 b A
48	76,20 a B	156,81 a A	48,42 a B	97,23 a A

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

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

Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

A Figura 15 e o Quadro 3 mostram aumento significativo na produção de inibidores de proteases na linhagem IAC-100 TN, em relação às plantas-controle, durante todo o tempo em que as moscas-brancas estavam em contato com as plantas de soja; porém não ocorreu interação significativa para a variedade IAC-100. Também não ocorreu aumento significativo nos níveis de inibidores de proteases com o decorrer do tempo, após a remoção do inseto, para a variedade IAC-100. Uma diferença significativa em relação ao controle só ocorreu 24 horas após a remoção do inseto. Um aumento significativo foi observado para a linhagem IAC-100 TN, em relação às plantas-controle, após a remoção da mosca; mas a única diferença significativa observada entre os dois genótipos só ocorreu 24 horas após a remoção da mosca-branca.

No experimento com lagarta da soja (Figura 15 e Quadro 4), ocorreu aumento significativo nos níveis de inibidores de proteases, nos dois genótipos analisados, com o decorrer do tempo, após a remoção da lagarta. Observou-se, ainda, aumento significativo em relação aos respectivos controles, porém não houve interação significativa entre os dois genótipos analisados.

Esses resultados, juntamente com os dados de parâmetros cinéticos, indicam um possível mecanismo de defesa da planta de soja ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolii*), envolvendo a via das lipoxigenases. Isso parece ocorrer através do aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e, em seguida, da ação da hidroperóxido ciclase, levando o hidroperóxido formado a ser convertido em ácido 12-oxo-fitodienólico e, posteriormente, a ácido jasmônico. Este último é proposto interagir com um receptor, a fim de ativar a expressão de genes para produção de inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992).

Esses resultados concordam com aqueles obtidos por GREEN e RYAN (1972), FARMER e RYAN (1992), DAMMAN et al. (1997) e CREELMAN e MULLET (1997), em que se sugere que o ácido jasmônico seja parte integral de um sistema de transdução de sinais intracelulares que regulam a transcrição de genes que codificam inibidores de proteases. GREEN e RYAN (1972) mostraram que ferimentos em folhas de batata ou folhas de tomate pelo besouro Colorado, ou suas larvas, induzem um rápido acúmulo de inibidores de proteases em todos os tecidos aéreos da plantas. THOMAS et al. (1995) também relataram que a expressão de inibidores de tripsina em plantas

de tabaco mostrou redução na reprodução de mosca-branca (*Bemisia tabaci*). TAYLOR e LEE (1997) também sugerem que os inibidores de proteases atuam na proteção de plantas contra Lepidoptera. Assim, inibidores de proteases em plantas afetam o desenvolvimento de vários herbívoros (TAYLOR e LEE, 1997; PEÑA CORTÉS et al., 1993; JONGMA et al., 1994; HILDER et al., 1987).

Portanto, os resultados observados reforçam a hipótese de que a acumulação de inibidores de proteases em resposta ao ataque de herbívoros é um provável mecanismo de defesa da planta.

Os Quadros 5 e 6 apresentam os níveis de hexanal determinados em plantas de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas ao ataque de mosca-branca e lagarta da soja, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, da primeira folha trifoliolar, com seus respectivos controles. Os Quadros 7 e 8 apresentam os níveis de aldeídos totais para os dois genótipos, nas mesmas condições.

Pelo Quadro 5, observa-se que houve aumento significativo nos níveis de hexanal de 24 até 48 horas, para a variedade IAC-100, na presença da mosca-branca, em relação aos respectivos controles, o que não ocorreu para a linhagem IAC-100 TN. Observou-se ainda maior produção de hexanal para a variedade IAC-100 em relação à linhagem IAC-100 TN, na presença do inseto. Após a remoção deste, não ocorreu interação significativa.

Não houve interação significativa nos níveis de hexanal, para os dois genótipos analisados, no tratamento com lagarta da soja, tanto antes quanto após a remoção do inseto (Quadro 6).

Observa-se, através do Quadro 7, que praticamente não houve diferença significativa, quanto aos níveis de aldeídos totais, entre os tratamentos e seus respectivos controles, na presença de mosca-branca, para ambos os genótipos; porém, a linhagem IAC-100 TN produziu maiores níveis de aldeídos totais do que a variedade IAC-100. Após a remoção da mosca, não houve interação significativa entre IAC-100 TN e seus controles e entre os dois genótipos analisados. Ocorreu aumento significativo apenas 6 e 24 horas após a remoção da mosca-branca, para a variedade IAC-100.

O Quadro 8 mostra aumento significativo na produção de aldeídos totais para a variedade IAC-100, a 6 e 48 horas após a remoção deste inseto, em relação aos respectivos controles. Para a linhagem IAC-100 TN, não houve

Quadro 5 - Níveis de hexanal em folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca, com seus respectivos controles

Níveis de hexanal				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Mosca-branca	Controle	Mosca-branca
Na presença do inseto				
12	1349,67 <sup>1</sup> a A	1140,33 b B <u>b</u> <u>A</u>	550,67	586,33 <u>a</u> <u>B</u>
24	1235,67 a B	1477,67 a A <u>a</u> <u>A</u>	597,00	550,00 <u>a</u> <u>B</u>
48	1106,67 a B	1455,67 a A <u>a</u> <u>A</u>	578,00	588,33 <u>a</u> <u>B</u>
72	1109,00 a A	958,33 b A <u>b</u> <u>A</u>	605,00	513,67 <u>a</u> <u>B</u>
Após remoção do inseto				
6	1079,67	1040,33	685,00	558,67
12	1114,00	1205,67	622,67	577,67
24	1170,33	1205,67	712,33	555,00
48	890,33	1147,33	714,33	382,67

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

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

Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 6 - Níveis de hexanal em folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de lagarta da soja, com seus respectivos controles

Níveis de hexanal				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Lagarta	Controle	Lagarta
Na presença do inseto				
12	1266,00 <sup>1</sup>	1282,33	577,00	628,00
24	1349,67	1458,00	550,67	746,33
48	1235,67	1366,67	597,00	834,00
Após remoção do inseto				
6	1359,67	1520,00	590,00	772,33
12	1367,00	1687,67	728,33	932,00
24	1106,67	1362,00	578,00	584,00
48	1109,00	1500,00	605,00	784,67

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 7 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de mosca-branca, com seus respectivos controles

Níveis de aldeídos totais				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Mosca-branca	Controle	Mosca-branca
Na presença do inseto				
12	0,75 <sup>1</sup> b A	0,80 b A <u>b</u> <u>B</u>	0,83 c B	0,91 b A <u>b</u> <u>A</u>
24	0,77 b B	0,98 a A <u>a</u> <u>A</u>	0,91 b A	0,91 b A <u>b</u> <u>B</u>
48	0,87 a A	0,85 b A <u>b</u> <u>B</u>	0,99 a A	1,01 a A <u>a</u> <u>A</u>
72	0,83 ab A	0,85 b A <u>b</u> <u>B</u>	1,02 a A	0,97 a B <u>a</u> <u>A</u>
Após remoção do inseto				
6	0,78 b B	0,85 b A	0,96	0,92
12	0,84 ab A	0,88 b A	0,97	0,99
24	0,85 ab B	0,98 a A	1,14	1,00
48	0,91 a A	0,90 ab A	1,05	0,94

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

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

Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 8 - Níveis de aldeídos totais em folhas de soja, na primeira folha trifoliolar, no estágio V3 de desenvolvimento, dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, submetidas ao ataque de lagarta da soja, com seus respectivos controles

Níveis de aldeídos totais				
Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Lagarta	Controle	Lagarta
Na presença do inseto				
12	0,77 <sup>1</sup>	0,78	0,89 a A	0,88 a A
24	0,75	0,85	0,83 b A	0,89 a B
48	0,77	0,91	0,91 a A	0,86 a B
Após remoção do inseto				
6	0,78 b B	0,97 a A <u>a</u> <u>A</u>	0,85 b A	0,76 c B <u>b</u> <u>B</u>
12	0,84 ab A	0,80 c A <u>c</u> <u>A</u>	0,97 a A	0,84 ab B <u>a</u> <u>A</u>
24	0,88 ab A	0,87 b A <u>b</u> <u>A</u>	0,99 a A	0,79 bc B <u>ab</u> <u>B</u>
48	0,83 a B	0,87 b A <u>b</u> <u>A</u>	1,02 a A	0,85 a B <u>a</u> <u>A</u>

<sup>1</sup> Valores são a média das análises de três repetições.

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

Nas linhas, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula (ou maiúscula grifada) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias que não estão seguidas de letras não apresentam interação significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

produção significativa em relação às plantas-controle. Comparando os dois genótipos, observou-se que 12 e 48 horas após a remoção da lagarta não houve diferença significativa entre os níveis de aldeídos totais, o que pode indicar que a remoção genética das três isoenzimas lipoxigenases da semente não alterou a produção de aldeídos totais em folhas de soja na linhagem IAC-100 TN.

Em plantas submetidas ao ataque de patógenos e a outras formas de estresse, como ferimento e ataque de insetos, vários produtos derivados de lipídios, incluindo aldeídos com seis carbonos, podem ser formados pela ação seqüencial de várias enzimas que fazem parte da via das lipoxigenases sobre ácidos graxos, como os ácidos linoléico e linolênico (VICK e ZIMMERMAN, 1987). Os resultados deste estudo sugerem que o mecanismo de defesa de plantas de soja contra ataque de insetos-praga como mosca-branca e lagarta da soja, através da via das lipoxigenases, também pode seguir o caminho no qual a hidropéroxido ciclase atua, com conseqüente produção de aldeídos.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a capacidade da planta de soja de responder ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) e lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) através da “via das lipoxigenases”. Para isso, analisou-se o efeito do ataque do inseto em folhas de soja sobre a atividade do “pool” de lipoxigenases e 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 de soja dos dois genótipos foram submetidas ao ataque de mosca-branca, e o primeiro trifoliolo, coletado a 12, 24, 48 e 72 horas. O primeiro trifoliolo submetido à lagarta da soja foi coletado a 6, 12 e 24 horas. A seguir, o inseto foi retirado e o primeiro trifoliolo, coletado após 6, 12, 24 e 48 horas, para os dois tratamentos.

Os resultados das análises bioquímico-cinéticas de plantas de soja atacadas por mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) e por lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) revelaram dois picos mais acentuados de atividade e atividade específica de lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0 nos dois tratamentos, com temperatura ótima de atividade e atividade específica a 25 °C. Para ambos os genótipos, as atividades foram maiores nos tratamentos do que nos respectivos controles. Os valores de KM aparente no “pool” de lipoxigenases foliares de plantas de soja dos dois genótipos analisados decresceram com o tempo de ataque. No tratamento com mosca-branca,

esses valores decresceram de 12 até 72 horas em presença do inseto, e, após a remoção do inseto, estes valores voltaram a aumentar. No tratamento com lagarta da soja, os valores de KM aparente decresceram até 48 horas após a remoção do inseto. A variação no valor de KM aparente para ambos os genótipos sugere uma alteração do “pool” de lipoxigenases em resposta ao ataque de herbívoros.

No tratamento com mosca-branca, observou-se aumento significativo na produção de inibidores de proteases antes da remoção para a variedade IAC-100 e aumento significativo após a remoção do inseto, para ambos os genótipos analisados. No tratamento com lagarta da soja, observou-se aumento significativo após a remoção do inseto, para ambos os genótipos analisados. Esses resultados, aliados aos dados obtidos para as constantes cinéticas, reforçam a hipótese de que as isoenzimas lipoxigenases são enzimas-chave no sistema de defesa de plantas de soja contra herbívoros e que o acúmulo de inibidores de proteases é, provavelmente, um mecanismo de defesa da planta.

As análises dos níveis de hexanal e aldeídos totais no tratamento com mosca-branca revelaram aumento significativo nos níveis de aldeídos totais antes da remoção do inseto para os dois genótipos analisados e, ainda, aumento significativo após a remoção, para a variedade IAC-100. Uma produção significativa de hexanal só ocorreu para a variedade IAC-100 (antes da remoção do inseto). No tratamento com lagarta da soja, as análises dos níveis de aldeídos totais revelaram aumento significativo após a remoção do inseto para a variedade IAC-100, mas não houve aumento significativo nos níveis de hexanal. Esses resultados sugerem que o mecanismo de defesa de plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca, pela via das lipoxigenases, também pode seguir o caminho de produção de aldeídos, porém a produção preferencial, provavelmente, não é de hexanal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVDIUSHIKO, S.A., YE, X.S., KUE, J., HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenase is an abundant protein in cucumber exudates. **Planta**, v.193, p.349-357, 1994.
- ANSTIS, P.J.P., FRIEND, J. The isozyme distribution of etiolated pea seedling lipoxigenase. **Planta**, v.115, p.329-335, 1974.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods Enzymol.**, v.71, p.441-451, 1981.
- BATE, N.J., SIVASANKAR, S., MOXON, C., RILEY, J.M.C., THOMPSON, J.E., ROTHSTEIN, S.J. Molecular Characterization of an arabidopsis gene encoding hydroperoxide liase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. **Plant Physiol.**, v.117, p.1393-1400, 1998.
- BELL, E., MULLET, J.E. Caracterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiol.**, v.103, n.4, p.1133-1137, 1993.
- BILD, G.S., RAMADOSS, C.S., AXELROD, B. Effect of substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenases isoenzymes. **Lipids**, v.12, n.9, p.732-735, 1977.
- 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**, v.7, p.1319-1331, 1995.
- CASTIGLIONI, E.A., VENDRAMIM, J.D. Desenvolvimento de lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner) em cultivares de soja com diferentes densidades larvais de criação. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.53, n.1, p.146-151, 1996.

- CHRISTOPHER, J.P., PISTORIOUS, E.K., AXELROD, B. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.284, p.54-62, 1972.
- COELHO, I.C.C. **Caracterização físico-química das lipoxigenases 1 e 2 da semente de soja**. Viçosa: UFV. 1993. 82p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- CREELMAN, R. A., BELL, E., MULLET, J.E. Involvement of lipoxygenase like enzyme in abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiolog.**, v.99, p.1258-1260, 1992.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.48, p. 355-381, 1997.
- CROFT, K.P.C., VOISER, C.R., SLUSARENKO, A.J. Mechanism of hypersensitive cell collapse: Correlation of increase lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L) inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Mol. Plant Physiol.**, v.36, p.49-62, 1990.
- CROFT, K.P.C., JÜTTNER, F., SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiol.**, v.101, p.13-24, 1993.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and function. In: STASWICK, P.E. **Plant Physiol.**, v.99, p.804-807, 1992.
- DAMMAN, C., ROJO, E., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant J.**, v.11, n.4, p.773-782, 1997.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.87, p.7713-7716, 1990.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell.**, v.4, p.129-134, 1992.
- FERREIRA, L.T., AVIDOS, M.F.D. Mosca-Branca – presença Indispensável no Brasil. **Bio Tecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n.4, 1998.
- FEUSSNER, I., WASTERACK, C., KINDL, H., KÜHN, H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.92, p.11849-11853, 1995.

- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, 1977. 11p. (Special Report, 80)
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. **Planta**, v.157, p.411-421, 1983a.
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. II. Structural, metabolic end compartmental changes during reproductive growth. **Planta**, v.157, p.422-431, 1983b.
- FRANCESCHI, V.R., GIAQUINTA, R.T. Specialized cellular arrangements in legume leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation: comparison of the paraveinal mesophyll. **Planta**, v.159, p. 415-422, 1983c.
- FRANCESCHI, V.R., WITTENBACH, V.A., GIAQUINTA, R.T. The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. III. Immunohistochemical localization of specific glycopeptides in the vacuole after depodding. **Plant Physiol.**, v.72, p.586-589, 1983.
- GALGARO, L., POMPERMAYER, P., PAULILLO, L.C.M.S., SILVA-FILHO, M.C. Partial characterization of serine proteinase activity in the larval midgut of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hueb. (Lepidoptera: Pyralidae). In: REUNIÃO ANUAL DA SBBq, 17, 1998, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SBQq, 1998. p.21.
- GALLIARD, T. Lipolytik and lipoxygenase enzyme in plants and their action in wounded tissues. In: KAHL, G. (Ed.) **Biochemistry of wounded plant tissue**. Berlin, 1978. p.55-201.
- GALLIARD, T., PHILLIPS, D.R. Lipoxygenases from potato tubers. Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position 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.**, v.1084, p.221-239, 1991.
- GERK, A.O. **Biologia da mosca-branca-Trialetodes vaporium (Homoptera: Aphelinidae) pelo complexo planta-hospedeiro**. Viçosa: UFV, 1993. 78p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- GIRI, A.P., HARSULKAR, A.M., DESHPANDE, V.V., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinase. **Plant Physiol.**, v.116, p.393-401, 1998.

- GRAHAN, J.S., HALL, G., PEARCE, G., RYAN, C.A. Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. **Planta**, v.169, p.399-405, 1986.
- GRAYBURN, WS., SCHNEIDER, G.R., HAMILTON - KEMP, T.R., BOOKJANS, G., ALI, K., HILDEBRAND, D.F. Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. **Plant Physiol.**, v.95, p.1214-1218, 1991.
- GREEN, T.R., RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p.776-777, 1972.
- GROSSMAN, S., BEM-AZIZ, A., ASCARELLI I., BUDOWSKI, P. Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfafa leaves. **Phytochem.**, v.11, p.509-514, 1972.
- GUSS, P.L., MACKO, V., RICHARDSON, T., STAHMANN, M.A. Lipoxidase in early growth of wheat. **Plant Cell**, v.9, p.415-422, 1968.
- HATANAKA, A., KAJIWARA, T., SEKIYA, J., IMOTO, M., INOUE, S. Participation and properties of lipoxygenase and hidroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. **Plant e Cell Physiol.**, v.23, p.91-99, 1982.
- HEITZ, T., BERGEY, D.R., RYAN, C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jamonate. **Plant Physiol.**, v.114, p.1085-1093, 1997.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.249-253, 1989.
- HILDEBRAND, D.F., KITO, M. Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. *J Agric. Food Chem.*, v.32, p.815-819, 1984.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochem. and Physiol.**, v.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.**, v.44c: p.655-659, 1989.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature.**, v.300, p.160-163, 1987.
- HOWE, G.A., LIGHTNER, J., BROWSE, J., RYAN, C.A. Na octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell.**, v.8, p.2067-2077, 1996.
- JONGMA, M.A., BAKKER, P.L., PETERS, J., VISSER, B., STIEKEMA, W.J. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. **Planta**, v.195, p.29-35, 1994.

- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., McGHEE, J.E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376-382, 1974.
- KATO, T., MAEDA, Y., HIRUKAWA, T., NAMAI, T., YOSHIOKA, N. Lipoxygenase activity increments in infected tomato leaves and oxidation product of linolenic acid by its *in vitro* enzyme reaction. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, n.3, p.373-375, 1992.
- KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissue: expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiol.**, v.34, n.7, 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.**, v.97, p.1306-1316, 1991.
- KOCK, E., MEIER, B., EIBEN, H-G., SLUSARENKO, A. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. **Plant Physiol.**, v.99, p.571-576, 1992.
- KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **Int. Ver. Cytol.**, v.135, p.155-199, 1992.
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M. G.A., BARROS, E. G., MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.8, n.2, p.87-92, 1996.
- LEATHERBARROW, R.J. Enzyme 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**, v.50, p.88-92, 1985.
- LESHEM, Y.Y. Plant senescence processes and free radical. **Free Radical Biol. Med.**, v.5, p.39-49, 1998.
- MACK, A.J. PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics Biol. Med. Resear.**, v.13, p.127-54, 1987.
- MÁRCZY, J.S., SIMON, M.L., MÓZSIK, L., SZAJÁNI, B. Comparative study on the lipoxygenase activities of some soybean cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, n.2, p.313-315, 1995.
- MELAN, M.A., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS, K.R., AUSUBEL, F.M., PETERMAN, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.**, v.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**, v.32, p.1103-1108, 1993.
- NELLEN, A., ROJAHN, B., KINDL, H. Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. **Z. Naturforsch.**, v.50, p.29-36, 1995.
- 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., AIBARA, S., MORITA, Y. A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Physiol.**, v.97, p.94-98, 1991.
- PARÉ, P.W., TUMLINSON, J.H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiol.**, v.114, p.1161-1167, 1997.
- PARK, T.K., POLACCO, J.C. Distinct lipoxygenase species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean. **Plant Physiol.**, v.90, p.285-290, 1989.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S., RYAN, C.A. A polipeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v.253, p.895-898, 1991.
- PEÑA-CORTEZ, H., ALBRECHT, T., PRAT, S., WELLER, E.W.W. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta**, n.191, p.123-128, 1993.
- REDGEL, D., SCHEWE, T., KUEHN, H. Comparative characteristics of lipoxygenase isoenzymes from green pea seeds. **Biochemistry (Moscow)**, v.60, n.6, p.715-721, 1995.
- RICKAUER, M., BOTTIN, A., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. 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.
- RÍO, L.A., PASTORI, G.M., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., SEVILLA, F., CORPAS, F.J., JIMÉNEZ, A., LÓPEZ-HUERTAS, E., HERNÁNDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxysomes in senescence. **Plant Physiol.**, v.116, n.1195-1200, 1998.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. **Z. Naturforsch.**, v.51c, p.123-138, 1996.
- RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.28, p.425-449, 1990.

- RYAN, C.A., PEARCE, G. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.14, p.1-17, 1998.
- SANTOS, I.C., REIS, W.J.P., MOREIRA, M.A., REZENDE, S.T., ROCHA, V.S., SEDIYAMA, C.S. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. **Revista Ceres**, v.40, n.231, p.438-444, 1993.
- SANZ, L.C., PÉREZ, A.G., OLÍAS, J.M. La lipoxigenasa en el reino vegetal I. **Propiedades. Informacion.**, v.43, p.287-290, 1992.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiol.**, v.107, p.535-543, 1995.
- SARAVITZ, D.M., SIEDOW, J.N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiol.**, v.110, p.287-299, 1996.
- 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.
- SEKIYA, J., KAJIWARA, T., MUNECHIKA, K., HATANAKA, A. Distribution of lipoxygenases and hidroperide lyase in the leaves of various plant species. **Phytochemistry**, v.22, n.9, p.1867-1869, 1983.
- SCHEWE, T., RAPAPORT, S.M., KUHU, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenases. **Adv. Enzymol. Mol. Biol.**, v.58, p.191-272, 1996.
- SHIBATA, D., STECZKO, J., DIXON, J.E., HERMODSON, M., YAZDANPARAST, R., AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-1. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.10080-10085, 1987.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.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.**, v.15, p.76-85, 1985.
- SPITELLER, G. Review: on the chemistry of oxidative stress. **J. Lipid Mediat.**, v.7, n.3, p.199-221, 1993.
- STASWICK, P.E.S.U., WHOWELL, S.H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n.89, 6837-6840, 1992.

- STEPHENSON, L.C., BUNKER, T.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol.**, v.116, p.923-933, 1998.
- TAYLOR, M.A.J., LEE, M.J. Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides *in vitro*. **Bioch. Biophys. Resear. Communicat.**, v.235, p.606-609, 1997.
- THOMAS J.C., ADAMS, D.G., KEPPEL, V.D., WASMANN, C.C., BROWN, J.K., KANOST, M.R., BOHNERT, H.J. **Plant Physiol. Biochem.**, v.33, p.611-614, 1995.
- TRANBARGER, T.J., FRANCESCHI, V.R., HILDEBRAND, D.F., GRIMES, H.D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **Plant Cell**, v.3, p.973-987, 1991.
- UTUMI, M.M., BARROS, E.G., OLIVEIRA, M.G.A., SEDIYAMA, C.S., MOREIRA, M.A. Efeito de eliminação genética de lipoxigenases e de polipeptídeos de reserva na qualidade da proteína de soja. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.10, n.3, p.203-212, 1998.
- 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**. Orlando: Academic Press, 1987. v.9, p.53-97,
- VIEIRA, A.A. **Caracterização da “via das lipoxigenases” de folhas de soja submetidas a fermento mecânico**. Viçosa: UFV, 1998. 58p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- ZIMMERMAN, DON C., COUDRON, C.A. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. **Plant Physiol.**, v.63, p.536-541, 1979.
- ZHUANG, H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A, HILDEBRAND, D.F. Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. **Plant Physiol**, v.100, p.80-87, 1992.