

TATIANA GÓES JUNGHANS

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ISOLAMENTO  
DE UM cDNA DE LIPOXIGENASES DO SISTEMA RADICULAR DE SOJA

Tese apresentada a Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2000

"Pelo que também Deus o exaltou sobremaneira e lhe deu o nome que está acima de todo nome, para que ao nome de Jesus se dobre todo joelho, nos céus, na terra e debaixo da terra, e toda língua confesse que Jesus Cristo é o Senhor, para glória de Deus Pai."

Fp 2: 9-11

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Curso de Fisiologia Vegetal, em especial ao BIOAGRO – Núcleo de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária, pela oportunidade de treinamento e realização do curso.

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

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação, decisões rápidas, empenho, ensinamentos e sugestões no decorrer da pesquisa.

Aos meus conselheiros, professores Paulo Roberto Mosquim, Maria Goreti de Almeida Oliveira e Everaldo Gonçalves Santos de Barros, pelas valiosas sugestões.

Aos colegas e funcionários da Fisiologia Vegetal e do BIOAGRO, pela colaboração, pela amizade e pelo agradável convívio.

Ao Newton Denis Piovesan, pelo apoio na condução dos experimentos.

À Rita Maria Alves de Moraes e à Marta Fonseca Martins, pela ajuda na execução dos trabalhos no laboratório.

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

## **BIOGRAFIA**

TATIANA GÓES JUNGHANS, filha de Diógenes Lins da Silva e Gilma Costa de Gois, nasceu em Ilhéus, Bahia, em 21 de outubro de 1966.

Em 1985, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, onde graduou-se em Agronomia em janeiro de 1990.

Em março de 1990, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na UFV, defendendo a tese intitulada “Influência da asparagina, glutamina e alantoína na atividade das enzimas sintetase da glutamina e sintase do glutamato em frutos de soja”, em agosto de 1993.

De agosto de 1994 a fevereiro de 1996, foi técnica-pesquisadora, desenvolvendo pesquisas com marcadores moleculares no melhoramento de plantas, no Laboratório de Patologia Florestal/Marcadores Moleculares/BIOAGRO do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Em março de 1997, ingressou no Programa de Pós-Graduação em nível de Doutorado, em Fisiologia Vegetal na UFV.

Em março de 1999, foi contratada, como pesquisadora, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	13
CAPÍTULO 1. NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DE LINHAGENS DE SOJA DESPROVIDAS DAS LIPOXIGENASES DAS SEMENTES .....	19
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.1. Material vegetal .....	21
2.2. Detecção da presença de lipoxigenases em sementes de soja .....	23
2.3. Coleta do exsudato do xilema .....	23
2.4. Determinação de aminoácidos e ureídeos totais .....	23
2.5. Massa seca das plantas e número de nódulos .....	24
2.6. Análise estatística .....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
CAPÍTULO 2. ATIVIDADE DE LIPOXIGENASES DURANTE O DESENVOL- VIMENTO DA RAIZ E DO NÓDULO DE PLANTAS DE SOJA .....	36
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
2.1. Material vegetal .....	38
2.2. Obtenção de extratos radiculares e nodulares .....	39
2.3. Determinação de proteínas totais no extrato bruto .....	39
2.4. Determinação da atividade de lipoxigenases .....	40
2.5. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes temperaturas .....	41

2.6. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes valores de pH .....	41
2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja .....	42
2.8. Análise de lipoxigenases por eletroforese SDS-PAGE e "immunoblotting" .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes temperaturas .....	44
3.2. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes valores de pH .....	44
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ aparente ( $K_{M\ app}$ ) e $V_{máx.}$ aparente ( $V_{máx. \ app}$ ) de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja .....	49
3.4. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de soja .....	54
3.5. "Immunoblotting" de lipoxigenases radiculares e nodulares em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de soja .....	57
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
CAPÍTULO 3. ISOLAMENTO DE UM cDNA PARCIAL DE LIPOXI- GENASE DE NÓDULOS DE SOJA .....	65
1. INTRODUÇÃO .....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	67
2.1. Material vegetal .....	67
2.2. Isolamento de RNA total .....	67
2.3. RT-PCR .....	68
2.4. Clonagem molecular .....	70
2.5. Isolamento de DNA plasmidial .....	72
2.6. Sequenciamento do DNA .....	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	77

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
RESUMO E CONCLUSÕES .....	82

## RESUMO

JUNGHANS, Tatiana Góes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Fixação de nitrogênio, atividade enzimática e isolamento de um cDNA de lipoxigenases do sistema radicular de soja.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Paulo Roberto Mosquim e Everaldo Gonçalves de Barros.

Linhagens de soja triplo nulas (desprovidas das lipoxigenases da semente) foram comparadas com as variedades comerciais elite que lhe deram origem quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Os resultados indicaram que as isoenzimas de lipoxigenases das sementes não são fatores determinantes na formação de nódulos e na fixação de nitrogênio. Utilizando-se as linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, foram avaliados os valores de  $K_{M\ app}$ , atividade e "immunoblotting" de lipoxigenases em raízes coletadas a 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e em nódulos coletados a 10, 15 e 25 dias após emergência. Os valores de  $K_{M\ app}$  para raiz e para nódulo de Doko normal e Doko triplo nula indicaram que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou a expressão das lipoxigenases nestes órgãos. Os valores de  $K_{M\ app}$  para nódulo sugerem que o "pool" de lipoxigenases expresso neste órgão é o mesmo nestas duas linhagens no período estudado. A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, declinou com o passar do tempo. A maior atividade de lipoxigenases no início de formação de raiz, sugere o envolvimento desta enzima no crescimento e desenvolvimento deste órgão. Contudo, para nódulo ocorreu um aumento acentuado na atividade de lipoxigenase aos 25 dias após emergência, em um estágio de desenvolvimento no qual tem-se baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio, sugerindo que lipoxigenase expressa no nódulo estaria envolvida com o armazenamento de nitrogênio. Dois grupos de mobilidade com aproximadamente 94 e 97 KDa foram encontrados nos "immunoblottings" para lipoxigenases de raiz e de nódulo. A intensidade das bandas imuno-reativas em raiz e em nódulo confirmaram os resultados obtidos com atividade de lipoxigenase, sugerindo que as variações de atividade desta enzima nestes órgãos são, principalmente, devido

às variações no teor desta enzima. Utilizando-se dois "primers" específicos para amplificar prováveis fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko, obteve-se uma amplificação diferencial, indicando a expressão de, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, não expressa no nódulo. Um fragmento de PCR proveniente de cDNA do nódulo foi clonado e seqüenciado. A seqüência de aminoácidos deste clone, revelou ser proveniente de um novo membro da família multigênica de lipoxigenase de soja, com possível envolvimento no armazenamento temporário de nitrogênio.

## ABSTRACT

JUNGHANS, Tatiana Góes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2000. **Nitrogen fixation, enzymatic activity and isolation of a cDNA of the lipoxygenases in the root system in soybean.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee members: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Paulo Roberto Mosquim and Everaldo Gonçalves de Barros.

Soybean lines lacking seed lipoxygenases (triple null) were compared with the elite commercial varieties that originated them in relation to nodulation capacity and nitrogen fixation. The results indicate that seeds lipoxygenases isozymes are not decisive factors for nodulation and nitrogen fixation. Doko and Doko triple null lines, inoculated and not inoculated, were used. The lipoxygenases values of  $KM_{app}$ , activity and immunoblotting from roots collected 0, 2, 6, 10, 15 and 25 days after emergency and from nodules collected 10, 15 and 25 days after emergency were measured. The  $KM_{app}$  values of root and nodule Doko and Doko triple null lines indicated that the genetic elimination of seed lipoxygenases did not affect the lipoxygenases expression in this organ. The nodule  $KM_{app}$  values suggest that the lipoxygenases pool expressed in this organ is the same in these two lines during the studied period. The root lipoxygenases activity of Doko and Doko triple null lines, inoculated and not inoculated, reduced with time. The largest lipoxygenases activity observed at the beginning of root formation suggests the involvement of this enzyme in growth and development of this organ. However, for nodules it was noticed an accentuated increase of lipoxygenase activity at 25 days after plant emergency. At this development stage the nodule has slow growth's rate and high nitrogen fixation rate, suggesting that this lipoxygenase could be involved with storage of nitrogen. Root and nodule showed, at least, two mobility groups for lipoxygenases in immunoblottings, with approximately 94 and 97 KDa. The root and nodule immunoreactive bands intensity confirmed the results obtained with lipoxygenase activity, suggesting that activity changes in these organs are mainly due to variations in enzyme concentrations. Two specific primers were used to amplify possible lipoxygenase DNA fragments from nodule and root cDNAs of Doko variety. It was observed a differential amplification in these two organs. At

least a major form of lipoxygenase expressed in the root was not expressed in the nodule. A PCR fragment from nodule with approximately 400 bp was cloned and sequenced, resulting in a 353 bp sequence. The amino acids derived sequence of this cDNA clone, GmLOXN, where compared with others in the GenBank revealing to be a new form of lipoxygenase gene with possible role in temporary nitrogen storage.

## INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa de excelente valor nutricional, contudo, ainda não é bem aceita pela população brasileira. Isto se deve, principalmente, ao seu sabor característico indesejável. Esse sabor característico é resultante da ação de três isoenzimas de lipoxigenases da semente de soja, que atuam na oxidação de lipídeos. O desenvolvimento de cultivares desprovidas das três isoenzimas de lipoxigenases nas sementes de soja é a opção mais viável na melhoria do sabor de produtos de soja.

O Programa de Melhoramento da Qualidade de Soja do BIOAGRO/UFV tem desenvolvido várias linhagens triplo nulas (desprovidas das três isoenzimas da semente) derivadas de variedades elite. Essas linhagens triplo nulas têm sido avaliadas para vários caracteres agrônômicos, contudo, ainda não tinham sido avaliadas quanto à capacidade de nodulação e fixação de N<sub>2</sub>. Tais análises são necessárias, haja visto que o nitrogênio requerido para o desenvolvimento de plantas de soja é quase completamente suprido pela bactéria *Bradyrhizobium*, por meio do estabelecimento de relação simbiótica.

As isoenzimas lipoxigenases são amplamente distribuídas nos organismos aeróbicos, incluindo plantas. Vários clones de cDNA ou genômicos de lipoxigenases têm sido isolados de diferentes espécies vegetais demonstrando uma expressão órgão-específica diferencial. Em soja, lipoxigenases estão organizadas em uma família multigênica com, no mínimo, oito genes. As lipoxigenases de sementes e de folhas de soja têm sido mais estudadas, contudo, as lipoxigenases de raízes e de nódulos não têm sido bem caracterizadas.

Muitos dados disponíveis sobre os produtos metabólicos da via de lipoxigenase sugerem que eles são potentes biorreguladores, tendo papéis importantes em cascatas sinalizadoras, senescência, organogênese, crescimento e desenvolvimento vegetal. Ao mesmo tempo, aspectos bioquímicos e especialmente fisiológicos da via de lipoxigenase vegetal permanecem pouco entendidos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Nódulos radiculares fixadores de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é um processo que pode ser feito unicamente por procariotos, os quais podem ser de vida livre ou estar em simbiose com plantas. Em várias dessas simbioses forma-se o nódulo radicular, onde a bactéria é hospedada intracelularmente. Nessa condição, a bactéria sintetiza a enzima nitrogenase com a qual ela pode reduzir o nitrogênio molecular em amônia. Contudo, somente um pequeno grupo de plantas tem a capacidade de formar nódulos radiculares fixadores de nitrogênio. As bactérias que têm a capacidade de interagir com espécies vegetais da família Leguminosae, são denominadas (*Azo*-, *Brady*-, *Sino*-) *Rhizobium*, que são bactérias de solo gram-negativas (Gualtieri & Bisseling, 2000). A soja só pode ser nodulada por espécies de *Bradyrhizobium* e de *Sinorhizobium*.

A formação de um nódulo fixador de nitrogênio requer que a bactéria induza a atividade mitótica de certas células radiculares, que formarão o primórdio nodular. Além da formação do primórdio, a bactéria deve penetrar nas células nodulares, a fim de desenvolver nódulos fixadores de nitrogênio. A bactéria pode entrar na raiz tanto com mecanismos intracelulares como intercelulares. O modo intracelular de infecção é usado pela maioria das interações rizóbio-leguminosa. O processo inicia-se com o curvamento de pêlos radiculares e no local do curvamento a parede celular é hidrolisada, a membrana plasmática invagina-se e um novo material de parede celular é depositado no sítio de infecção. Dessa maneira, forma-se uma estrutura similar a um tubo, denominada via de infecção, através da qual a bactéria pode entrar na planta. Mais provavelmente, a via de infecção cresce por incorporação de vesículas em sua extremidade, como ocorre no crescimento do tubo polínico (Kijne, 1992).

A via de infecção deve atravessar várias camadas de células corticais radiculares, enquanto que o primórdio do nódulo é formado nas camadas interiores da raiz. Quando a bactéria infectante chega ao primórdio do nódulo, elas infectam um número de células do primórdio. Nesse processo, a bactéria

torna-se rodeada por uma membrana celular vegetal e juntas elas formam o simbiossomo (Roth & Stacey, 1989). Após a infecção, o primórdio desenvolve-se em um nódulo.

Nódulos de leguminosas tem anatomia similar a um caule, com feixes vasculares periféricos e células infectadas no tecido central e eles desenvolvem-se a partir de primórdios que são iniciados no córtex. Os nódulos de leguminosas são classificados em nódulos determinado e indeterminado. Os nódulos indeterminados originam-se a partir de divisões celulares no interior do córtex e possuem um meristema persistente em seu ápice. O tipo de nódulo determinado origina-se a partir de divisões no córtex mais externo e não possui um meristema persistente. O meristema desse tipo de nódulo cessa suas divisões nos estádios iniciais de desenvolvimento. As plantas de soja possuem nódulos do tipo determinado.

### **1.1. Nodulinas**

Pesquisas sobre genes vegetais envolvidos na nodulação têm focalizado especialmente sobre genes que se expressam na raiz, mas não em outras parte da planta. As proteínas específicas de nódulos de leguminosas denominam-se nodulinas. Este nome foi primeiro proposto em 1984 (van Kammen, 1984). Desde então, muitos genes de nodulinas têm sido identificados em nódulos de leguminosas. Desde a descoberta dos primeiros genes de nodulinas, métodos para detectar transcritos, têm se tornado mais sensíveis, por exemplo, métodos baseados em PCR. Pela aplicação de tais métodos, têm-se tornado claro que muitos dos genes “específicos de nódulo”, são de fato, também expressos em outras partes da planta (Gualtieri & Bisseling, 2000).

Leghemoglobinas foram as primeiras proteínas específicas de nódulos identificadas. Essas proteínas têm um papel importante na regulação da concentração de oxigênio livre no interior do nódulo. A enzima nitrogenase da bactéria é muito sensível a oxigênio e por essa razão a concentração de oxigênio livre no interior do nódulo tem que ser baixa. Contudo, o alto requerimento de energia do processo de fixação de nitrogênio, é gerado por fosforilação oxidativa.

Leghemoglobinas têm um papel fundamental nesse paradoxo relativo ao oxigênio, desde que elas facilitam o fluxo de oxigênio para a bactéria com uma baixa concentração de oxigênio livre. Dessa maneira, nitrogenase é protegida dos danos causados pelo oxigênio, enquanto suficiente concentração de ATP pode ser formado para dar suporte à fixação bioquímica de nitrogênio.

Por um longo tempo hemoglobinas vegetais foram consideradas proteínas específicas de nódulo. Contudo, genes de hemoglobinas têm agora sido identificados em várias plantas que são incapazes de formar nódulos fixadores de oxigênio. Plantas que formam nódulos, freqüentemente, possuem genes de hemoglobina que são exclusivamente expressos em órgãos não simbiotes, enquanto que outros genes de hemoglobina são expressos em nódulos radiculares.

## **1.2. Genes de nodulação**

Os genes de nodulação (*nod*) do rizóbio são determinantes na troca de sinais entre hospedeiro e simbiote, e têm sido especialmente estudados (Carlson et al., 1994; van Rhijn & Vanderleyden, 1995). O produto do gene regulatório *nodD* é ativado na presença de sinais da planta, sobretudo flavonóides, e induz a transcrição dos genes estruturais, *nod*, *nol* e *noc*. Por meio dos genes *nod*, *nol* e *noc*, o rizóbio produz o fator Nod, um sinal lipooligossacarídeo, que pode induzir várias respostas da planta, tais como, formação da via de infecção e divisão das células corticais.

A composição de flavonóides de exsudatos da raiz difere entre as espécies vegetais e mesmo entre as diferentes cultivares da mesma espécie de leguminosa. Proteínas NodD provenientes de diferentes espécies ou estirpes de rizóbio, e mesmo da mesma estirpe, podem também diferir em suas preferências para certos flavonóides (Dénarié et al., 1992). Somente quando os flavonóides derivados da planta, bem como, o sinal regulatório do rizóbio possui uma estrutura química adequada e ocorre combinação dos parceiros, é possível a indução dos genes estruturais *nod*. Além disso, flavonóides diferem em seu potencial para ativação de genes (fraco ou forte) e podem também reprimir a

indução do gene *nod*, dependendo da natureza da proteína Nod (Cunningham et al., 1991). Dessa forma, a capacidade e a eficiência de uma estirpe para nodular um certo hospedeiro é grandemente afetada pela especificidade do produto gênico regulatório em relação aos compostos do exsudato radicular.

A expressão dos genes estruturais de nodulação resulta na síntese e exportação do fator Nod, um sinal lipooligossacarídeo composto de uma cadeia conservada de três a cinco resíduos de  $\beta$ -(1,4)-N-acetil D-glucosamina e uma combinação de diferentes substituintes, que são responsáveis pela ampla variedade de hospedeiros alcançados pelas bactérias (Carlson et al., 1994). Os genes comuns *nodABC* codificam enzimas que catalisam a síntese da cadeia de N-acetil D-glucosamina. Mutações nesses genes impedem a produção do fator Nod e conseqüentemente bloqueiam totalmente a nodulação. As ramificações dessa cadeia com diferentes substituintes são mediadas pelo hospedeiro e por genes de nodulação específicos do genótipo do rizóbio. Mutação ou ausência de um desses determinantes que limitam o hospedeiro, não abolem totalmente a capacidade de nodular, porém, causam retardamento da nodulação, redução no número de nódulos formados ou alteram a abrangência de hospedeiros da estirpe (Sargent et al., 1987; Firmin et al., 1993).

## **2. Lipoxigenases**

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxirredutase, EC 1.13.11.12) são isoenzimas pertencentes à classe das oxirredutases, que catalisam a adição de oxigênio molecular a compostos polinsaturados, os quais contêm o sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno (Mack et al., 1987). O oxigênio é introduzido no carbono 9 ou 13 do ácido graxo, por exemplo, ácido linoléico, gerando ácido 9 ou 13 hidroperoxiloléico, respectivamente (Mack et al., 1987). A razão de 9 e 13 hidroperóxidos difere para lipoxigenases de várias espécies vegetais (Vick & Zimmerman, 1984).

Lipoxigenases são proteínas solúveis de cadeia polipeptídica simples, com massa molecular de cerca de 95 KDa (Axelrod et al., 1981). Lipoxigenases contêm ferro não-hêmico ligado ao centro ativo, e este desempenha um papel

essencial na ação catalítica, sendo que cada molécula de enzima contém um átomo de ferro (Sanz et al., 1992), que pode existir tanto como Fe(II), na forma cataliticamente inativa da enzima, ou como Fe(III), na forma ativa (Schilstra et al., 1993).

A maioria das lipoxigenases são inibidas por agentes antioxidantes e alguns agentes quelantes como 4-nitrocatecol e compostos o-fenólicos, por interagirem com o grupo prostético, ou seja, com o ferro não-hêmico da enzima (Sanz et al., 1992).

## **2.1. Ocorrência de lipoxigenase em plantas**

Lipoxigenase tem sido detectada em um grande número de plantas (Siedow, 1991). Embora as isoenzimas de lipoxigenase ocorram em várias células da planta, o tecido específico expressando alto nível de lipoxigenase na planta pode variar bastante, dependendo do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais. Contudo, tecidos mais novos e em crescimento contêm maior nível de lipoxigenase (Eiben & Slusarenko, 1994; Funk et al., 1985; Matsui et al., 1992; Ohta et al., 1986).

Estudos para determinar a localização subcelular revelaram a presença de isoenzimas de lipoxigenase predominantemente no citosol (Siedow, 1991; Stephenson et al., 1998), mas também em cloroplastos (Douillard & Bergeron, 1981; Feussner et al., 1995), mitocôndrias (Grossman et al., 1972), núcleo (Feussner et al., 1995), corpos lipídicos (Feussner & Kindl, 1992), vacúolos (Wardale & Lambert, 1980; Vernooy-Gerritsen et al., 1984; Stephenson et al., 1998), bem como associadas à membrana microssomal e plasmática (Droillard et al., 1993; Macrí et al., 1994, Nellen et al., 1995).

Sementes de soja apresentam três isoenzimas distintas, denominadas LOX 1, 2, e 3. (Axelrod et al., 1981). As três lipoxigenases de semente de soja podem ser agrupadas em dois tipos: I, II. O tipo I inclui a isoenzima LOX 1, seu pH ótimo está em torno de 9,5. O tipo II inclui as duas restantes, denominadas acídicas, com pH ótimo entre 5,8 – 6,2 (Galliard & Chan, 1980). Todas as três

isoenzimas apresentam uma composição em aminoácidos com grande similaridade. LOX 1 apresenta 838 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 94.038, LOX 2, 865 resíduos com peso molecular de 97.035 e LOX 3, 859 resíduos com peso molecular de 96.541. Essas lipoxigenases apresentam de 4 a 7 resíduos de cisteína, 13 resíduos de triptofano, 6 resíduos de histidina, dos quais 4 deles mantêm o átomo de ferro ligado ao centro ativo da enzima sendo importantes na catálise enzimática (Shibata et al., 1988).

Shibata et al. (1988), demonstraram a estrutura primária da LOX 1 de soja por meio de espectroscopia de massa e raio X e concluíram que LOX 1 apresenta uma estrutura secundária constituída por dois domínios, sendo um formado por uma estrutura  $\beta$ -cilíndrica associada a uma  $\alpha$ -hélice e o outro formado por 8 estruturas em  $\beta$ -pregueada e 22  $\alpha$ -hélices.

Uma classe de lipoxigenase distinta das sementes tem sido identificada em tecidos vegetativos (Park & Polacco, 1989; Grayburn et al., 1991). Dentro dessa classe, identificou-se LOX 4, 5 e 6 (Kato et al., 1992) e LOX 7 e 8 (Saravitz & Siedow, 1996).

## **2.2. Funções de lipoxigenase e de seus produtos**

Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de esclarecer o real papel das lipoxigenases em tecidos vegetais (Hildebrand, 1989; Siedow, 1991). Contudo, lipoxigenases apresentam uma ampla distribuição na célula, o que torna difícil a identificação de um papel único para uma dada isoenzima. Isto sugere que diferentes isoenzimas possam exercer funções distintas no crescimento e desenvolvimento de plantas. Além disso, as reações de lipoxigenases podem iniciar a síntese de uma molécula sinalizadora ou estarem envolvidas na indução de mudanças metabólicas ou estruturais na célula (Brash, 1999).

Dentre os compostos produzidos pela via das lipoxigenases (Figura 1), têm-se o ácido traumático, o ácido jasmônico e seus derivados. O ácido traumático é conhecido como hormônio da injúria e postula-se que o ácido jasmônico é parte integrante de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa (Farmer & Ryan, 1992).

O ácido jasmônico é formado pela ação de uma lipoxigenase, localizada nos cloroplastos, de uma aleno oxido sintase, de uma aleno oxido ciclase, de uma redutase e de três  $\beta$ -oxidações (Figura 1). Ácido jasmônico e seus metil jasmonatos podem regular o nível de expressão de lipoxigenase em soja (Bell & Mullet, 1991; Anderson et al., 1989; Grimes et al., 1992), em *Arabidopsis thaliana* (Melan et al., 1993), em batata (Fidantsef et al., 1993; Geerts et al., 1994) e em cevada (Feussner et al., 1995).

Os níveis e a função de ácido jasmônico variam nas plantas, não somente nas células dos diferentes tipos de tecidos, mas também, nos diferentes estádios de desenvolvimento e em resposta a diferentes estímulos ambientais (Creelman & Mullet, 1997). Os níveis de ácido jasmônico em semente de soja são baixos, mas este ácido é encontrado em altos níveis em folhas, tecidos jovens de raízes, flores e frutos em crescimento (Creelman & Mullet, 1995).

A via de transdução de sinais do ácido jasmônico ainda não está bem esclarecida. Presume-se que o ácido jasmônico interaja com receptores de membrana, os quais ativariam a via de sinalização, resultando assim, no aumento da transcrição e da tradução de genes de inibidores de protease em resposta à injúria, bem como na modulação da expressão de outros genes que influenciam em aspectos específicos do crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses bióticos e abióticos (Creelman & Mullet, 1997).

Estudos iniciais mostraram que ácido jasmônico ou metil jasmonato podem promover senescência e atuar como reguladores de crescimento (Parthier, 1991). Pesquisas subsequentes mostraram que ácido jasmônico altera especificamente a expressão gênica e que injúrias e elicitores podem causar acúmulo de ácido jasmônico/metil jasmonato em plantas (Bell & Mullet, 1993).

Injúria mecânica de folhas de batata causou um aumento no teor de ácido abscísico, que por sua vez, ativou a biossíntese de ácido jasmônico. Esse aumento do teor de ácido jasmônico endógeno ativou, subsequente, a expressão de genes induzidos por injúria, tais como, inibidor de protease, de inibidor de catepsina D, de leucina aminopeptidase e de treonina deaminase, em diferentes partes da planta (Dammann et al., 1997). Esses autores sugerem a existência de

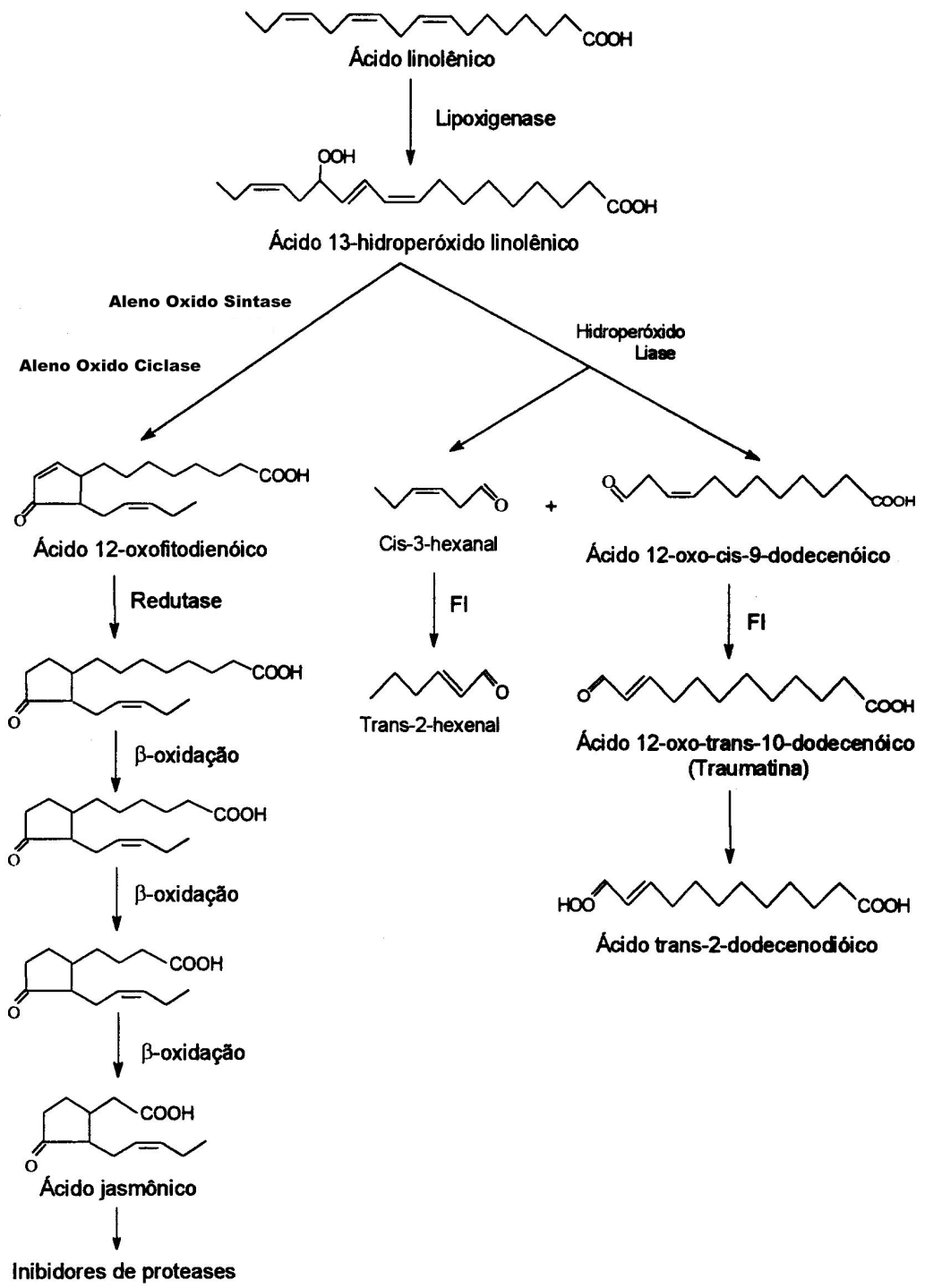


FIGURA 1 – Via bioquímica das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolênico. FI, fator de isomerização. Adaptado de Croft et al., 1993 e Creelman & Mullet, 1997.

uma via complexa e específica de transdução de sinais, presente em cada órgão da planta que regula os efeitos dos fitohormônios, ácido jasmônico e ácido abscísico, na expressão diferencial desses genes induzidos por injúria.

Essa descoberta foi um passo importante para entender o mecanismo de indução de genes de defesa da planta mediante injúria. Sugere-se também a necessidade de etileno juntamente com jasmonato e atuação de oligogalacturonídeos e outros sinais locais externos como luz ultra violeta, para acionarem a via de sinalização em cascata (Farmer & Ryan, 1992).

### **2.2.1. Injúria e resistência a doença**

Alta atividade de lipoxigenases é observada 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 sequencial de lipídios, o que resulta na formação de aldeídos voláteis de seis e nove carbonos. Os compostos de seis carbonos, hexanal, cis-3-hexenal e trans-2-hexenal são importantes componentes do aroma de folhas verdes, e os aldeídos de nove carbonos, cis-3-nonenal, cis-6-nonadienal e outros são encontrados em frutos (Hatanaka et al., 1982). A degradação inicia-se quando os ácidos linoléico e linolênico, são rapidamente dioxigenados pelas lipoxigenases em hidroperóxidos, que são então clivados pela hidroperóxido liase, formando aldeídos como produtos (Gardner, 1991).

O aldeído trans-2-hexenal foi avaliado em vários experimentos, e mostrou-se capaz de inibir o crescimento de fungos, insetos e protozoários. O mecanismo de atividade antimicrobiana do trans-2-hexenal não é conhecido. Croft et al. (1993) relataram que bactérias tratadas com esse aldeído apresentaram precipitação do DNA e lise de algumas células.

As plantas respondem à injúria por meio de um variado mecanismo de defesa, incluindo a fortificação da parede celular, aumento da expressão de genes de defesa, síntese de moléculas anti-microbianas, bem como a iniciação de processos que levam à cicatrização (Rosahl, 1996). Quando o inseto se alimenta

da planta, ele provoca danos, e em resposta a esse dano, a planta produz níveis elevados de compostos voláteis, os quais podem servir como um sinal químico que atrai os inimigos naturais do inseto. São produzidos terpenos acíclicos, bem como xiquimatos, butiratos e compostos voláteis como o 3-hexenal, produzidos pela via das lipoxigenases (Figura 1), quando folhas são danificadas (Paré & Tumlinson, 1997).

Em folhas de soja submetidas à injúria, verificou-se o aumento de expressão de LOX 7 e LOX 8 (Saravitz & Siedow, 1996). Embora a expressão de LOX 7 e LOX 8 aumente após injúria e após aplicação exógena de metil jasmonato, também é expressa em níveis elevados em folhas jovens, em flores e tecidos embrionários imaturos. É possível que LOX 7 e LOX 8 desempenhem papéis fisiológicos importantes, estando presentes em todos os estádios de desenvolvimento da planta e também servindo como fase inicial no mecanismo de defesa da planta (Saravitz & Siedow, 1996).

### **2.2.2. Proteína de reserva vegetativa**

Klauer et al. (1991), estudaram o envolvimento das lipoxigenases durante a fase de crescimento vegetativo e verificaram acúmulo de três polipeptídeos de aproximadamente 27, 29 e 94 kDa no vacúolo de células do tecido do mesófilo paraveinal de folhas de plantas de soja. 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 estádios iniciais do enchimento do grão. Provavelmente, a função mais importante dessas proteínas é a nutrição de sementes e de folhas nos primeiros estádios de desenvolvimento, porque essas proteínas se acumulam nas folhas, mesmo sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Desses polipeptídeos, o de 94 kDa é um membro da família de lipoxigenase (Tranbarger et al., 1991) e responde a muitos dos estímulos que induzem a expressão de genes de proteínas de reserva vegetativa (Tranbarger et al., 1991; Grimes et al., 1993), tal como, a abundância de nitrogênio estimulando o acúmulo de maiores níveis de lipoxigenases (Grimes et al., 1993). Dessa forma,

sugere-se que lipoxigenases de plantas sejam proteínas bifuncionais capazes de catalisar a peroxidação de lipídios e também de auxiliar no armazenamento temporário de nitrogênio durante o crescimento vegetativo.

Dentre as lipoxigenases caracterizadas em tecidos vegetativos de plantas de soja, foi verificado aumento da expressão do gene para LOX 4 após a remoção dos primórdios florais (Kato et al., 1993), de LOX 5 e 6, após a remoção da vagem (Bunker et al., 1995) e de LOX 7 e 8, após injúria das folhas (Saravitz & Siedow, 1996). Segundo Stephenson et al. (1998), LOX 6 e 7, podem exercer funções importantes no armazenamento de nitrogênio a curto prazo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A.; FARKAS, T.; SOMLYAI, G. & KIRÁLY, Z. Consequence of O<sub>2</sub> – geration during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiological Molecular Plant Pathology**, 34:13-26, 1989.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAASKO, S.L. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- BELL, E. & MULLET, J.E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Molecular and General Genetics**, 230:456-462, 1991.
- BELL, E. & MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, 103:1133-1137, 1993.
- BRASH, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(34):23679-23682, 1999.
- 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 vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid levels remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995.
- CARLSON, R.W.; PRICE, N.P.J. & STACEY, G. The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 7:684-695, 1994.
- CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 92:4114-4119, 1995.
- CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology Molecular Biology**, 48:355-381, 1997.
- CROFT, K.P.C.; JUTTNER, F. & SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L. leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica*. **Plant Physiology**, 101:13-14, 1993.

- CUNNINGHAM, S.; KOLLMEYER, W.D. & STACEY, G. Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* **Applied Environmental Microbiology**, 57:1886-1892, 1991.
- DAMMANN, 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 Journal**, 11(4):773-782, 1997.
- DOUILLARD, R. & BERGERON, E. Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in young leaves. **Plant Science Letters**, 22:263-268, 1981.
- DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F. & ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annual Review Microbiology**, 46:497-531, 1992.
- DROILLARD, M.J.; ROUET-MAYER M.A.; BUREAU, J.M. & LAURIÈRE, C. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. **Plant Physiology**, 103:1211-1219, 1993.
- EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A.J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, 5(1):123-135, 1994.
- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, 4:129-134, 1992.
- FEUSSNER, I. & KINDL, H. A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. **FEBS Letters**, 298: 223-225, 1992.
- FEUSSNER, I.; HAUSE, B.; VOROS, K.; PARTHIER, B. & WASTERNAK, C. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). **Plant journal**, 7:949-957, 1995.
- FIDANTSEF, A.; BOSTOCK, R.M. & CHOI, D. Temporal expression of HMG-Coa reductase genes and lipoxygenase in potato leaves in response to fungal infection, methyl jasmonate, or the elicitor arachidonic acid. **Plant Physiology Supplement**, 102:113, 1993.

- FIRMIN, J.L.; WILSON, K.E.; CARLSON, R.W.; DAVIES, A.E. & DOWNIE, J.A. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an o-acetylation of *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharide nodulation factor. **Molecular Microbiology**, 10:351-360, 1993.
- FUNK, M.O.; WHITNEY, M.A.; HAUSKNECHT, E.C. & O'BRIEN, E.M. Resolution of the isoenzymes of soybean lipoxygenase using isoelectric focusing and chromafocusing. **Analytical Biochemistry**, 146:246-251, 1985.
- GALLIARD, T. & CHAN, H.W.S. Lipoxygenases. In: STUMPF, P.K. (ed). **The biochemistry of plants a comprehensive treatise**. New York, Academic Press, p.131-157, 1980.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.
- GEERTS, A.; FELTKAMP, D. & ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiology**, 105:269-277, 1994.
- GRIMES, H.D.; KOTJE, D.S. & FRANCESCHI, V.R. Expression, activity and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. **Plant Physiology**, 100:433-443, 1992.
- GRIMES, H.D.; TRANBARGER, T.J. & FRANCESCHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. **Plant physiol.**, 103:457-466, 1993.
- GROSSMAN, S.; BEN-AZIZ, A.; ASCARELLI, I. & BUDOWSKI, P. Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves. **Phytochemistry**, 11:509-514, 1972.
- GUALTIERI, G. & BISSELING, T. The evolution of nodulation. **Plant Molecular Biology**, 42:181-194, 2000.
- GRAYBURN, W.S.; SCHNEIDER, G.R.; HAMILTON-KEMP, T.R.; BOOKJANS, G.; ALI, K. & HILDEBRAND, D.F. Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. **Plant Physiology**, 95:1214-1218, 1991.
- HATANAKA, A.; KAJIWARA, T.; SEKIYA, J.; IMOTO, M. & INOUE, S. Participation and properties of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, 23:91-99, 1982.

- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.
- KATO, T.K.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, 98:324-330, 1992.
- KATO, T.K.; SHIRANO, Y.; IWAMOTO, H. & SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase L-4, a component of the 94 kilodalton storage protein in vegetative tissues – Expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiology**, 34:1063-1072, 1993.
- KIJNE, J.W. The *Rhizobium* infection process. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J.(eds.) **Biological Nitrogen Fixation**, Chapman and Hall, New York, 1992, p.349-398.
- 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 Physiology**, 97:1306-1316, 1991.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, 13:127-154, 1987.
- MACRÍ, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E. & VIANELLO, A. lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. **Biochemistry Biophysical Acta**, 1215:109-114, 1994.
- MATSUI, K.; IRIE, M.; KAJIWARA, T. & HATANAKA, A. Developmental changes in lipoxygenase activity in cotyledons of cucumber seedlings. **Plant Science**, 85:23-32, 1992.
- MELAN, M.A.; DONG, X.N.; 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 Physiology**, 101:441-450, 1993.
- NELLEN, A.; ROJAHN, B. & KINDL, H. Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. **Z. Naturforsch**, 50c:29-36, 1995.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B. & MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. **Plant Cell Physiology**, 27(5):911-918, 1986.

- PARÉ, W.P. & TUMLINSON, H.J. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, 114:1161-1167, 1997.
- PARK, T.K. & POLLACO, J.C. Distinct lipoxygenase species appear in leaves hypocotiles/radicles of germinating soybean. **Plant Physiology**, 90:285-290, 1989.
- PARTHIER, B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypothesis on their actions. **Bot. Acta**, 104:446-454, 1991.
- ROTH, L.E. & STACEY, G. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. **European Journal Cell Biology**, 49:13-23, 1989.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. **Z. Naturforsch**, 51:123-138, 1996.
- SANZ, L.C.; PÉREZ, A.G. & OLÍAS, J.M. **La lipoxigenasa em el reino vegetal**. I. Propiedades. Informacion, v. 43, fasc. 4, 1992.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, 110:287-299, 1996.
- SARGENT, L.; HUANG, S.Z.; ROLFE, B.G. & DJORDJEVIC, M.A. Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. **Applied Environmental Microbiology**, 53:1611-1619, 1987.
- SCHILSTRA, M.J.; VELDINK, G.A. & VLIEGENTHART, F.G. Kinetic analysis of the induction period in lipoxygenase catalysis. **Biochemistry**, 32:7686-7691, 1993.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; ANDREWS, P.C.; HERMODSON, M. & AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-2. **Journal Biological Chemistry**, 263:6816-6821, 1988.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: Structure and function. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 42:145-188, 1991.
- 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 Physiology**, 116:923-933, 1998.

- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRANT, 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**, 3:973-987, 1991.
- VAN KAMMEN, A. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. **Plant Molecular Biology**, 2:43-45, 1984.
- VAN RHIJN, P. & VANDERLEYDEN, J. The *rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiology Review**, 59:124-142, 1995.
- VERNOOY-GERRITSEN, M.; LEUNISSEN, J.L.M.; VELDINK, G.A. & VLIEGENTHART, J.F.G. Intracellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germination soybean seeds by indirect labeling with protein A-colloidal gold complexes. **Plant Physiology**, 76:1070-1079, 1984.
- VICK, B.A. & ZIMMERMAN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiology**, 75:458-461, 1984.
- WARDALE, D.A. & LAMBERT, E.A. Lipoxygenase from cucumber fruit: localization and properties. **Phytochemistry**, 19: 1013-1016, 1980.

## CAPÍTULO 1

### NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DE LINHAGENS DE SOJA DESPROVIDAS DAS LIPOXIGENASES DAS SEMENTES

#### 1. INTRODUÇÃO

As sementes de soja normalmente contêm três tipos de isoenzimas de lipoxigenases, denominadas LOX 1, 2 e 3 (Axelrod et al., 1981). Essas três lipoxigenases catalisam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos, os quais contêm o sistema cis,cis-1,4-pentadieno (Mack et al., 1987).

O interesse de se estudar lipoxigenases em sementes de soja está associado, em grande parte, à sua importância na determinação de características organolépticas de diversos produtos alimentícios a base de soja. Sementes de soja contêm altos níveis de lipoxigenase e de seus substratos (ácido linoléico e ácido linolênico) que levam à produção significativa de compostos carbonílicos de cadeia curta, responsáveis pelo seu sabor característico indesejável, dentre eles o hexanal é o mais proeminente (Hildebrand, 1989). Assim, a oxidação catalisada pelas lipoxigenases constitui um significativo problema na indústria de alimentos, uma vez que essas enzimas são responsáveis pela redução no consumo de produtos de soja pelo consumidor. Tratamento térmico visando a inativação de lipoxigenases, antes ou durante o processamento industrial, e extração dos compostos responsáveis pelo sabor característico das sementes de soja com solventes orgânicos em produtos derivados apresentaram-se dispendiosos e não satisfatórios (Wolf, 1975; Kinsella, 1979; Kitamura et al., 1983). A eliminação genética dessas isoenzimas reduz a produção desses compostos, permitindo que a soja tenha uma maior utilização na indústria de alimentos (Nishiba et al., 1995).

Várias linhagens triplo nulas (desprovidas das isoenzimas LOX 1, 2 e 3 na semente) derivadas de variedades elite têm sido desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UVF, que visa aumentar a sua aceitabilidade na alimentação humana. Essas linhagens triplo nulas têm sido

avaliadas para caracteres agronômicos, mas não quanto à capacidade de nodulação e fixação de N<sub>2</sub>. Tais análises se fazem necessárias, haja visto que o nitrogênio necessário para o desenvolvimento de plantas de soja é adquirido principalmente pela simbiose entre a planta e as bactérias *Bradyrhizobium* (Cattelan & Hungria, 1994; Hungria et al., 1994). O objetivo desse estudo foi comparar linhagens de soja triplo nulas com as variedades comerciais elite que lhes deram origem, quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizadas linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) selecionadas para presença/ausência de lipoxigenases nas sementes, provenientes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja, em andamento no BIOAGRO/UFV. Três experimentos foram realizados nos períodos de janeiro a março de 1999, de julho a agosto de 1999 e de outubro a dezembro de 1999.

No 1<sup>o</sup> experimento, foram utilizadas linhagens selecionadas para presença/ausência de lipoxigenases nas sementes derivadas do cruzamento de Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12 (progenitores recorrentes) com uma linhagem doadora de genes que determinam a ausência das isoenzimas de lipoxigenases das sementes (UFV TN). A efetividade do 1<sup>o</sup> cruzamento entre a linhagem UFV TN ( $l_1l_1, l_2l_2, l_3l_3$ ) e as variedades citadas ( $L_1L_1, L_2L_2, L_3L_3$ ) foi testada utilizando-se análises qualitativas de coloração não destrutivas para lipoxigenases das sementes (Suda et al., 1995). A partir do 1<sup>o</sup> retrocruzamento, os genótipos triplo heterozigotos ( $L_1l_1, L_2l_2, L_3l_3$ ) foram usados como doadores de genes. No 4<sup>o</sup> ciclo de retrocruzamento para Cristalina e no 5<sup>o</sup> ciclo de retrocruzamento para Doko RC e IAC-12, as sementes triplo heterozigotas foram selecionadas pelo método espectrofotométrico (Axelrod et al., 1981; Oliveira et al., 1998) de forma não destrutiva. As plantas  $F_1$ , provenientes dos últimos cruzamentos, autofecundaram-se em casa de vegetação. As sementes  $F_2$  obtidas foram submetidas a análises não destrutivas de detecção de lipoxigenases nas sementes por meio de análises qualitativas de coloração e testes espectrofotométricos para seleção de genótipos homozigotos dominante e recessivo para as isoenzimas de lipoxigenase, de forma a selecionar sementes de linhagens triplo nulas ( $l_1l_1, l_2l_2, l_3l_3$ ) e normais ( $L_1L_1, L_2L_2, L_3L_3$ ) em cada população.

As sementes selecionadas foram colocadas para germinar em vasos plásticos com capacidade de três litros, contendo areia previamente lavada com água. A inoculação foi feita na emergência com 1 mL de uma cultura de

*Bradyrhizobium elkanii* estirpe CPAC 15 ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) por vaso. As plantas de soja foram cultivadas em condições de casa de vegetação, uma planta por vaso, com 12 repetições para cada tratamento.

No 2º e 3º experimentos foram utilizadas sementes das linhagens triplo nulas oriundas do 6º ciclo de retrocruzamento da variedade Cristalina RCH e do 7º ciclo de retrocruzamento da variedade IAC-12, bem como sementes das respectivas variedades comerciais. A inoculação foi feita nas sementes com inoculante em pó contendo *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 587 e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 ( $10^7$  de células viáveis por grama do produto). No 2º experimento foram utilizadas duas sementes por vaso, deixando apenas uma planta por vaso, com 15 repetições para cada tratamento. No 3º experimento foram utilizadas quatro sementes por vaso, deixando apenas uma planta por vaso, com 10 repetições para cada tratamento.

Solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938), com a supressão de nitrogênio, foi fornecida para as plantas a partir do estágio  $V_1$  (Fehr & Caviness, 1977), 100 mL no 1º e 3º experimentos e 50 mL no 2º experimento duas vezes por semana. Os tratamentos controle do 2º e 3º experimentos receberam solução nutritiva completa (Hoagland & Arnon, 1938) duas vezes por semana, em volumes 50 mL e 100 mL, respectivamente. O suprimento de água foi feito sempre que necessário.

Na primeira semana de cultivo, as plantas receberam, além de macro e micronutrientes,  $7,5 \mu\text{mol/L}$  de cobalto na forma de  $\text{CoCl}_2$ .

As plantas foram colhidas no estágio  $R_3$  (Fehr & Caviness, 1977). A escolha desse estágio de desenvolvimento foi baseada no fato de que o máximo de nodulação ocorre na fase reprodutiva da cultura ( $R_2$  a  $R_5$ ), época em que a soja apresenta maior demanda pelos nutrientes e outros fatores de produção.

## **2.2. Detecção da presença de lipoxigenases em sementes de soja**

Foram utilizadas metodologias não destrutivas para detecção das lipoxigenases das sementes, tomando-se uma pequena porção do cotilédone, do lado oposto ao eixo embrionário das sementes. Análises qualitativas de coloração (Suda et al., 1995) foram utilizadas para discriminar presença/ausência de lipoxigenases nas sementes e testes espectrofotométricos (Axelrod et al., 1981; Oliveira et al., 1998) foram utilizados para discriminar sementes homozigotas triplo dominantes de sementes triplo heterozigotas. Análises qualitativas de coloração e testes espectrofotométricos foram realizados apenas para lipoxigenases 1 e 3, tendo em vista que os genes que determinam a presença das lipoxigenases 1 e 2 estão geneticamente ligados.

## **2.3. Coleta do exsudato do xilema**

A coleta do exsudato do xilema para quantificação das concentrações de ureídeos foi feita nos caules das plantas seccionados com um estilete, imediatamente acima do nó cotiledonar. A região do caule seccionada foi lavada com água destilada e enxugada com papel absorvente para evitar a contaminação do exsudato com substâncias contidas no suco das células que foram rompidas com o corte. A coleta do exsudato foi feita entre 11:00 e 13:00 horas por meio de pipeta Pasteur, por um período de 60 minutos. O material coletado foi imediatamente transferido para microtubos e mantidos a 0 °C, em banho de gelo. Após a coleta, os microtubos contendo o exsudato de cada planta foram armazenados a -80 °C.

## **2.4. Determinação de aminoácidos e ureídeos totais**

As concentrações de aminoácidos do exsudato do xilema foram determinadas por meio de reação colorimétrica com ninhidrina, a partir de uma curva padrão constituída de uma mistura dos aminoácidos glicina, glutamato, arginina e fenilalanina, em concentrações totais de até 2 mmol m<sup>-3</sup> (Rena & Masciotti, 1976). Para determinação das concentrações de ureídeos, alantoína e

ácido alantóico, foi utilizado o método proposto por Vogels & van der Drift (1970).

## **2.5. Massa seca das plantas e número de nódulos**

As raízes, os nódulos e a parte aérea foram separados. Os nódulos foram contados e em seguida as raízes, os nódulos e parte aérea foram colocadas em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada à temperatura de 70 °C, até a obtenção de massa constante.

## **2.6. Análise estatística**

Cada tratamento consistiu no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> experimento de, respectivamente, 12, 15 e 10 repetições de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a uma análise de variância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No 1º experimento foram utilizadas três linhagens triplo nulas e três linhagens normais para lipoxigenases, provenientes do cruzamento entre a linhagem UFV TN e as variedades recorrentes Cristalina RCH (4º ciclo de retrocruzamento) e Doko RC e IAC-12 (5º ciclo de retrocruzamento). Somente as linhagens contrastantes para presença de lipoxigenases nas sementes provenientes da variedade Cristalina RCH apresentaram diferenças significativas, a nível de 1% de probabilidade, quanto à massa seca da parte aérea (MSPA), à massa seca do sistema radicular (MSSR), ao número e massa seca de nódulos, à concentração de ureídeos e a nível de 5% de probabilidade, e razão entre a parte aérea e o sistema radicular (PA/SR) (Tabela 1). Todos esses parâmetros medidos foram maiores para a linhagem Cristalina triplo nula (CTN), comparada a linhagem Cristalina normal (CN). A linhagem CTN apresentou maior nodulação e fixação de nitrogênio, uma vez que a concentração de ureídeos no exsudato do xilema pode ser usado como uma estimativa da fixação biológica de nitrogênio (Herridge & Peoples, 1990; Herridge et al., 1990; Diatloff et al., 1991; Ohtake et al., 1995).

A linhagem Doko triplo nula (DTN) apresentou maior número e massa seca de nódulos do que a linhagem Doko normal (DN) (Tabela 1). Contudo, apesar desses resultados, não ocorreu aumento na concentração de ureídeos no exsudato da seiva do xilema devido, provavelmente, a uma baixa fixação de nitrogênio nesses nódulos.

A linhagem IAC-12 normal (IN) apresentou maior razão PA/SR e maior número de nódulos quando comparada à linhagem IAC-12 triplo nula (ITN) (Tabela 1).

Dos três pares de linhagens contrastantes para presença de lipoxigenases nas sementes estudadas, CN e CTN eram as que estavam em um ciclo de retrocruzamento mais atrasado. Enquanto que para CN e CTN utilizou-se a geração F<sub>2</sub> do 4º ciclo de retrocruzamento, para DN, DTN, IN e ITN utilizou-se gerações F<sub>2</sub> do 5º ciclo de retrocruzamento. Dessa maneira, para confirmar os

resultados obtidos, delineou-se um 2<sup>o</sup> experimento com linhagens triplo nulas oriundas de retrocruzamentos mais avançados. Das três linhagens triplo nulas, selecionou-se a linhagem CTN, por ter apresentado uma maior nodulação efetiva que a linhagem CN (Tabela 1) e a linhagem ITN, por ter apresentado um comportamento inverso à CTN quanto ao número de nódulos e à razão PA/SR (Tabela 1).

Nesse 2<sup>o</sup> experimento foram utilizadas linhagens CTN do 6<sup>o</sup> ciclo de retrocruzamento e ITN do 7<sup>o</sup> ciclo de retrocruzamento e, por estarem em retrocruzamentos bem avançados, pôde-se compará-las diretamente com suas

TABELA 1 – Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CPAC 15 sobre massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), razão entre MSPA e MSSR (PA/SR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), concentração de ureídeos e de aminoácidos (AAs) na seiva do xilema de linhagens IAC-12 normal (IN), IAC-12 triplo nula (ITN), Cristalina normal (CN), Cristalina triplo nula (CTN), Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), sem suprimento de nitrogênio. (Experimento 1)

Genótipo	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	MSSR (g planta <sup>-1</sup> )	PA/SR	NN	MSN (g planta <sup>-1</sup> )	Ureídeos (mol m <sup>-3</sup> )	AAs (mol m <sup>-3</sup> )
IN	1,50	0,83	1,81*	71,75*	0,10	5,44	1,54
ITN	1,29	0,78	1,64	63,58	0,09	5,52	1,60
s	0,33	0,15	0,16	9,32	0,018	0,66	0,44
CN	0,82	0,50	1,62	33,50	0,06	3,70	1,50
CTN	2,03**	0,84**	2,39**	52,38**	0,13**	5,06*	1,72
s	0,45	0,22	0,23	6,35	0,019	0,69	0,58
DN	2,68	1,00	2,67	81,20	0,15	3,66	0,64
DTN	2,96	1,09	2,32	96,90*	0,18**	3,76	1,08
s	0,52	0,19	0,21	15,23	0,017	0,47	0,27

\*, \*\* Significativo a nível de 0,05 e 0,01, respectivamente. As comparações foram feitas entre os genótipos normais e os seus respectivos genótipos triplo nulos.

respectivas variedades comerciais. Devido ao fato das plantas do 1º experimento não terem se desenvolvido muito bem, mudou-se o inoculante e foi adicionado um controle com os genótipos supridos com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) completa.

Diferente do ocorrido no 1º experimento (Tabela 1), no 2º experimento (Tabela 2), as variedades comerciais e suas respectivas linhagens triplo nulas supridas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) sem nitrogênio não apresentaram diferenças em nenhum dos parâmetros analisados.

Quando esses genótipos foram supridos com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) completa, a linhagem ITN apresentou maior MSPA, MSSR, razão PA/SR, número e massa seca de nódulos que a variedade IAC-12 (Tabela 2). Em contrapartida, a variedade Cristalina apresentou maior número de nódulos que a linhagem CTN (Tabela 2), resultado contrário ao observado no 1º experimento (Tabela 1).

Para averiguação das diferenças entre os resultados obtidos no 1º e no 2º experimento, montou-se um 3º experimento, utilizando-se o mesmo material genético e o mesmo inoculante do 2º experimento.

O comportamento dos genótipos supridos com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) sem nitrogênio foi praticamente o mesmo entre o 2º (Tabela 2) e o 3º experimento (Tabela 3) e em relação à linhagem ITN e à variedade IAC-12, também foi similar ao 1º experimento (Tabela 1). Entre os genótipos que não foram supridos com nitrogênio nesses três experimentos apenas a linhagem CTN e a linhagem CN do 1º experimento diferiram (Tabela 1). Dessa maneira, pode-se inferir que as diferenças encontradas em nodulação e em fixação de nitrogênio, são atribuídas a outras causas genéticas que não a presença/ausência de lipoxigenases nas sementes, haja visto que a linhagem CTN originou-se do 4º ciclo de retrocruzamento e que a capacidade de nodulação do rizóbio é afetada pelo cultivar (McNeil, 1982; van Rensburg & Strijdom, 1982; May & Behloul, 1983; Kosslak & Behloul, 1985).

Não foram verificadas diferenças nos resultados do 3º experimento para os genótipos que foram supridos com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) completa (Tabela 3).

Observou-se que a adição de nitrogênio, realizada no 2º e 3º experimentos, foi benéfica para a nodulação (Tabelas 2 e 3, respectivamente). Entretanto, o maior fornecimento do teor de nitrogênio disponível às plantas no 3º experimento, em relação ao 2º experimento, promoveu redução do número e massa seca de nódulos nos genótipos analisados.

TABELA 2 – Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 587 e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 sobre massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), razão entre MSPA e MSSR (PA/SR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), concentração de ureídeos e aminoácidos (AAs) na seiva do xilema das linhagens IAC-12 triplo nula (ITN), Cristalina triplo nula (CTN) e suas respectivas variedades, sem e com (+) o suprimento de nitrogênio. (Experimento 2)

Genótipo	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	MSSR (g planta <sup>-1</sup> )	PA/SR	NN	MSN (g planta <sup>-1</sup> )	Ureídeos (mol m <sup>-3</sup> )	AAs (mol m <sup>-3</sup> )
IAC-12	2,07	1,22	1,62	29,00	0,12	2,68	0,80
ITN	2,07	1,18	1,68	29,40	0,11	3,62	1,30
<i>s</i>	0,98	0,32	0,34	9,44	0,057	1,54	0,55
IAC-12+	8,36	3,59	2,32	79,20	0,37	2,16	0,76
ITN+	11,48**	4,59**	2,51*	124,33**	0,54**	2,68	0,76
<i>s</i>	1,83	0,65	0,26	30,54	0,097	0,66	0,17
Cristalina	1,62	0,95	1,67	37,13	0,10	1,50	0,84
CTN	1,89	1,07	1,69	27,93	0,10	1,50	2,04
<i>s</i>	0,73	0,26	0,23	13,32	0,049	0,43	1,02
Cristalina+	10,35	3,79	2,74	130,67**	0,49	1,54	1,02
CTN+	10,93	4,02	2,72	93,53	0,46	1,60	1,02
<i>s</i>	1,62	0,50	0,26	34,62	0,105	0,38	0,37

\*, \*\* Significativo a nível de 0,05 e 0,01, respectivamente. As comparações foram feitas entre os genótipos normais e os seus respectivos genótipos triplo nulos.

TABELA 3 – Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 587 e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 sobre massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), razão entre MSPA e MSSR (PA/SR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), concentração de ureídeos e aminoácidos (AAs) na seiva do xilema das linhagens IAC-12 triplo nula (ITN), Cristalina triplo nula (CTN) e suas respectivas variedades, sem e com (+) o suprimento de nitrogênio. (Experimento 3)

Genótipo	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	MSSR (g planta <sup>-1</sup> )	PA/SR	NN	MSN (g planta <sup>-1</sup> )	Ureídeo s (mol m <sup>-3</sup> )	AAs (mol m <sup>-3</sup> )
IAC-12	1,62	0,88	1,84*	52,40	0,09	2,67	8,66
ITN	1,41	0,83	1,72	53,60	0,08	2,38	8,67
<i>s</i>	0,24	0,14	0,11	9,38	0,014	0,81	2,40
IAC-12+	6,67	3,05	2,19	68,50	0,15	1,49	0,88
ITN+	6,39	2,94	2,17	77,60	0,14	1,85	1,19
<i>s</i>	1,34	0,57	0,22	16,71	0,035	0,50	0,45
Cristalina	1,66	0,93	1,78	67,00**	0,10**	1,68	4,22
CTN	1,32	0,75	1,74	45,20	0,06	1,34	3,34
<i>s</i>	0,40	0,20	0,16	11,27	0,021	0,36	1,12
Cristalina+	8,42	3,55	2,36	100,70	0,22	4,77	3,23
CTN+	8,21	3,37	2,43	92,20	0,17	4,23	2,89
<i>s</i>	1,57	0,54	0,21	31,49	0,065	1,48	0,50

\*, \*\* Significativo a nível de 0,05 e 0,01, respectivamente. As comparações foram feitas entre os genótipos normais e os seus respectivos genótipos triplo nulos.

Sabe-se que baixas concentrações de nitrogênio combinado estimula o crescimento da planta sem inibir o crescimento e atividade dos nódulos (Caba et al., 1990; Ceccato et al., 1998). Plantas com melhor desenvolvimento aumentam a disponibilidade de fotoassimilados, permitindo a formação de um maior número de nódulos (Barbera & Harper, 1993; Hamaguchi et al., 1993; Francisco & Harper, 1995). Contudo, em maiores concentrações de nitrogênio combinado ocorre redução do número e massa seca de nódulos (Heichel & Vance, 1979; Evans, 1982; McNeil, 1982; Kossalak & Behloul, 1985; Sheokand et al., 1998).

Segundo Sheokand et al. (1998) a inibição da nodulação e fixação de nitrogênio na presença de maiores concentrações de nitrogênio combinado é devido à senescência prematura de nódulos resultante da degradação estrutural do tecido central do nódulo, juntamente com o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com o rápido declínio da concentração de leghemoglobinas.

A formação de um nódulo fixador de nitrogênio completamente desenvolvido é o resultado de muitos eventos consecutivos envolvendo reconhecimento, curvatura do pêlo radicular, formação da via de infecção, penetração das bactérias nos pêlos radiculares, indução da divisão de células corticais e mudanças morfogenéticas acopladas com liberação das bactérias e formação do bacterióide dentro das células hospedeiras (Mylona et al., 1995). A maioria desses passos são controlados por ambos, hospedeiro e bactéria e estão sujeitos a vários pontos de controle que por sua vez são influenciados por diversos fatores ambientais (McNeil, 1982; Somasegaran & Bohlool, 1990; McDermott et al., 1991; Thies et al., 1992). Essa complexidade na interação hospedeiro/rizóbio poderia explicar os resultados contraditórios encontrados de um experimento para outro.

Os resultados desse estudo sugerem que as isoenzimas de lipoxigenases das sementes não foram fatores determinantes da formação de nódulos, bem como na fixação de nitrogênio que ocorre nos nódulos.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Várias linhagens triplo nulas (desprovidas das isoenzimas LOX 1, 2 e 3 na semente) derivadas de variedades elite têm sido desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UVF, que visa aumentar a sua aceitabilidade na alimentação humana. Essas linhagens triplo nulas têm sido avaliadas para caracteres agronômicos, contudo, ainda não tinham sido avaliadas quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Tais análises se fazem necessárias, haja visto que o nitrogênio requerido para o desenvolvimento de plantas de soja é quase completamente suprido pela bactéria *Bradyrhizobium* por meio do estabelecimento de relação simbiótica.

Foram montados três experimentos, em épocas diferentes, para comparar linhagens de soja triplo nulas e as variedades comerciais elite que lhes deram origem quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.

No 1º experimento foram utilizadas linhagens derivadas de três variedades, Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12 (progenitores masculinos recorrentes) com uma linhagem doadora de genes que determinam a ausência das isoenzimas de lipoxigenases das sementes (UFV TN). As linhagens triplo nulas e normais foram obtidas da autofecundação da geração F<sub>1</sub> provenientes do 4º ciclo de retrocruzamento para Cristalina e do 5º ciclo de retrocruzamento para Doko RC e IAC-12. As plantas foram supridas com solução nutritiva com supressão de nitrogênio.

No 2º e 3º experimentos foram utilizadas sementes das linhagens triplo nulas oriundas do 6º ciclo de retrocruzamento da variedade Cristalina RCH e do 7º ciclo de retrocruzamento da variedade IAC-12, bem como sementes das respectivas variedades comerciais. As plantas foram supridas com solução nutritiva completa para os tratamentos controle e sem nitrogênio para os outros tratamentos.

No 1º experimento, somente a linhagem Cristalina triplo nula apresentou-se melhor que a linhagem Cristalina normal quanto à massa seca da parte aérea, à massa seca do sistema radicular, à razão entre a parte aérea e o sistema radicular,

ao número e massa seca de nódulos, à concentração de ureídeos, que, dessa forma, apresentou uma maior nodulação e fixação de nitrogênio, uma vez que a concentração de ureídeos no exsudato do xilema pode ser usado como uma estimativa da fixação biológica de nitrogênio.

Diferente do ocorrido no 1º experimento, no 2º experimento, as variedades comerciais e suas respectivas linhagens triplo nulas, nos tratamentos sem suprimento de nitrogênio, não apresentaram diferenças em nenhum dos parâmetros analisados. Quando essas linhagens foram supridas com solução nutritiva com nitrogênio, a linhagem IAC-12 triplo nula apresentou-se melhor que a variedade IAC-12 para quase todos os parâmetros analisados, com exceção de concentração de ureídeos e de aminoácidos.

No 3º experimento, somente a variedade Cristalina, no tratamento sem suprimento de nitrogênio, apresentou maior número e massa seca de nódulos que a linhagem Cristalina triplo nula.

Os resultados desse estudo sugerem que as isoenzimas de lipoxigenases das sementes não foram fatores determinantes da formação de nódulos, bem como na fixação de nitrogênio que ocorre nos nódulos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAASKO, S.L. Lipooxygenase from soybean. **Methods Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- BARBERA, A.C. & HARPER, J.E. Interaction of shoot and root on nodulation control of grafted soybean (*Glycine max* L. Merr.) and mung bean (*Vigna radiata* L.). **Riv. di Agron.**, 27:445-450, 1993.
- CABA, J.M.; LLUCH, C.; HERVÁS, A. & LIGERO, F. Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. **Physiologia Plantarum**, 79:531-539, 1990.
- CATTELAN, A.J. & HUNGRIA, M. Nitrogen nutrition and inoculation. *In* Tropical Soybean – Improvement and Production. Ed. FAO. p.201-215. FAO, Rome, 1994.
- CECCATO, V.M.; GOMES, J.E.; SARRIÉS, G.A.; MOON, D.H. & TSAI, S.M. Effects of host plant origin on nodulin activities and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, 204:79-87, 1998.
- DIATLOFF, A.; REDDEN, R.J. & HERRIDGE, D.F. Correlation between xylem ureide levels and nodulation in field-grown *Phaseolus vulgaris*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 31:679-682, 1991.
- EVANS, J. Response of soybean-*Rhizobium* symbiosis to mineral nitrogen. **Plant and Soil**, 66:439-442, 1982.
- FRANCISCO, P.B. & HARPER, J.E. Autoregulation of soybean nodulation: delayed inoculation increases nodule number. **Physiologia Plantarum**, 93:411-420, 1995.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service and Agriculture and Home Economics Experiment Station. Special Report, 80. Yowa State University, Ames. 11p. 1977.
- HAMAGUCHI, H.; KOKUBUN, M. & AKAO, S. Shoot control of nodulation is modified by the root in the supernodulating mutant En6500 and its wild-type parent cultivar Enrei. **Soil Science Plant Nutrition**, 38:771-774, 1993.
- HEICHEL, G.H. & VANCE, C.P. Nitrate-N and *Rhizobium* strain roles in alfalfa seedling nodulation and growth. **Crop Science**, 19:512-518, 1979.
- HERRIDGE, D.F.; BERGERSEN, F.J. & PEOPLES, M.B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural <sup>15</sup>N abundance methods. **Plant Physiology**, 93:708-716, 1990.

- HERRIDGE, D.F. & PEOPLES, M.B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by  $^{15}\text{N}$  methods. **Plant Physiology**, 93:495-503, 1990.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin** N° 347, 1938, p.39.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. *In* **Microrganismos de Importância Agrícola**. Eds. R.S. Araujo and M. Hungria. EMBRAPA-SPI, Brasília, Brazil, 1994. p.9-89.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 56:242-258, 1979.
- KITAMURA, K.; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N. & NIELSON, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science**, 23:924-927, 1983.
- KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. **Applied Environmental Microbiology**, 49:1128-1133, 1985.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, 13:127-154, 1987.
- MAY, S.N. & BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). **Applied Environmental Microbiology**, 45:960-965, 1983.
- MCDERMOTT, T.R.; GRAHAM, P.H. & FERREY, M.L. Competitiveness of indigenous populations of *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 as determined using a root-tip marking procedure in growth pouches. **Plant and Soil**, 135:245-250, 1991.
- MCNEIL, D.L. Variations in ability of *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybeans and maintain fixation in the presence of nitrate. **Applied Environmental Microbiology**, 44:647-652, 1982.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K. & BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **Plant Cell**, 7:869-885, 1995.

- NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; HAJIKA, M.; IGITA, K. & SUDA, I. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 43:738-741, 1995.
- OHTAKE, N.; NISHIWAKI, T.; MIZUKOSHI, K.; MINAGAWA, R.; TAKAHASHI, Y.; CHINUSHI, T. & OHYAMA, T. Amino acid composition in xylem sap of soybean related to the evaluation of N<sub>2</sub> fixation by the relative ureide method. **Soil Science Plant Nutrition**, 41(1):95-102, 1995.
- OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; MORAIS, R.M.A.; ROCHEBOIS, G.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identification of the three classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Review Biotechnology Techniques**, 12(1):71-74, 1998.
- RENA, A.B. & MASCIOTTI, G.Z. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, 23:288-301, 1976.
- SHEOKAND, S.; BARBER, S. & SWARAJ, K. Nodule structure and functioning in *Cicer arietinum* as affected by nitrate. **Biologia Plantarum**, 41(3):435-443, 1998.
- SOMASEGARAN, P. & BOHLOOL, B.B. Singlestrain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean, and dry bean. **Applied Environmental Microbiology**, 56:3298-3303, 1990.
- SUDA, I.; HAJIKI, M.; NISHIBI, Y.; FURURTA, S. & KAZUNORI, I. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:742-747, 1995.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B. & SINGLETON, P.W. Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced strains. **Canadian Journal Microbiology**, 38:493-500, 1992.
- VAN RENSBURG, H.J. & STRIJDOM, B.W. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. **Applied Environmental Microbiology**, 44:98-106, 1982.
- VOGELS, G.D. & VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxilate derivatives. **Analytical Biochemistry**, 33:143-157, 1970.
- WOLF, W.J. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23:136-141, 1975.

## CAPÍTULO 2

### ATIVIDADE DE LIPOXIGENASES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA RAIZ E DO NÓDULO DE PLANTAS DE SOJA

#### 1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxirredutase, EC 1.13.11.12) são dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular a compostos polinsaturados, os quais contêm o sistema cis,cis-1,4-pentadieno (Mack et al., 1987).

Lipoxigenases são encontradas tanto no reino vegetal quanto no reino animal. Em plantas, os substratos mais comuns para lipoxigenases são os ácidos linoléico e linolênico, que são os principais ácidos graxos polinsaturados de fosfolipídeos da membrana vegetal (Hildebrand et al., 1988).

A síntese de lipoxigenases nos diferentes tecidos é variável e dependente do estágio de desenvolvimento das plantas e das condições do ambiente (Pinsky et al., 1971). Em soja, lipoxigenases estão organizadas em uma grande família multigênica com, pelo menos, oito genes altamente conservados (Bunker et al., 1995). As lipoxigenases de sementes e de folhas de soja têm sido mais estudadas, contudo, as lipoxigenases de raízes e de nódulos não têm sido bem caracterizadas (Hildebrand et al., 1988).

As sementes de soja normalmente contêm três tipos de isoenzimas de lipoxigenases, denominadas LOX 1, 2 e 3 (Axelrod et al., 1981). Essas enzimas são responsáveis pelo sabor característico da soja, reduzindo a aceitabilidade dos produtos de soja pelo consumidor (Nishiba et al., 1995). Linhagens triplo nulas (desprovidas das isoenzimas LOX 1, 2 e 3 na semente, derivadas de variedades elite foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade de Soja do BIOAGRO/UFV, que visa aumentar a aceitabilidade dos produtos de soja na alimentação humana.

Lipoxigenases, possivelmente, estão envolvidas em todos os estágios de crescimento e desenvolvimento vegetal (Hildebrand, 1989; Parthier, 1991;

Siedow, 1991; Koda, 1992). Alguns dos processos fisiológicos nos quais lipoxigenases poderiam estar envolvidas incluem resposta a injúria (Bell & Mullet, 1993; Geerts et al., 1994; Saravitz & Siedow, 1996), ao ataque de patógenos (Prusky et al., 1985; Keppler & Novacky, 1987; Ohta et al., 1990; Koch et al., 1992; Croft et al., 1993; Melan et al., 1993; Peng et al., 1994; Yamamoto & Tani, 1995), germinação de sementes (Kato et al., 1992), amadurecimento de frutos (Ferrie et al., 1994), senescência (Paliyath & Droillard, 1992; Rouet-Mayer et al., 1992) e como proteínas de reserva vegetativa (Tranbarger et al., 1991; Grimes et al., 1993; Bunker et al., 1995). Essa heterogeneidade de papéis fisiológicos atribuídos às lipoxigenases vegetais, provavelmente, é devida ao seu envolvimento na biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios tais como jasmonatos e aldeídos de seis átomos de carbono (Vick & Zimmerman, 1987; Hildebrand, 1989; Gardner, 1991; Song & Brash, 1991).

Lipoxigenases têm sido encontradas em nódulos de *Vicia faba* (Perlick et al., 1996), *Pisum sativum* (Gardner et al., 1996), *Lotus japonicus* (Szczyglowski et al., 1997) e *Phaseolus vulgaris* (Porta et al., 1999), sugerindo que essas enzimas teriam papel importante na interação simbiótica entre rizóbio e plantas leguminosas. Contudo, pouco tem sido relatado quanto à presença de lipoxigenases em raízes e em nódulos de plantas de soja e se a eliminação genética das lipoxigenases de sementes de soja afeta a síntese de lipoxigenases nas raízes e nos nódulos. Dessa forma, esse trabalho teve o objetivo de determinar a atividade de lipoxigenases em raízes e em nódulos de linhagens de soja selecionadas para a presença/ausência das lipoxigenases das sementes, durante o processo de nodulação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizadas linhagens selecionadas para presença/ausência de lipoxigenases das sementes provenientes do Germoplasma do Programa de Melhoramento de Soja do BIOAGRO/UFV. Essas linhagens foram derivadas da variedade Doko RC no 5<sup>o</sup> ciclo de retrocruzamento (progenitor recorrente) com uma linhagem doadora de genes que determinam a ausência das isoenzimas de lipoxigenases das sementes (UFV TN). As sementes F<sub>2</sub> obtidas desse cruzamento foram submetidas a análises não destrutivas de detecção de lipoxigenases, por meio de análises qualitativas de coloração e de testes espectrofotométricos (Axelrod et al., 1981; Oliveira et al., 1998; Suda et al., 1995) para seleção de genótipos homocigotos dominante e recessivo para as isoenzimas de lipoxigenase, de forma a selecionar sementes de linhagem Doko triplo nula (DTN; l<sub>1</sub>l<sub>1</sub>, l<sub>2</sub>l<sub>2</sub>, l<sub>3</sub>l<sub>3</sub>) e de linhagem Doko normal (DN; L<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>L<sub>3</sub>).

As sementes selecionadas foram esterilizadas com álcool 70% por um minuto e com água oxigenada 6% por 5 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas abundantemente com água autoclavada e colocadas para germinar em vasos plásticos com capacidade de 3 litros (uma semente por vaso), contendo areia previamente lavada com água e autoclavada. Plantas DN e DTN foram inoculadas, quando emergiram na superfície da areia, com 1 mL de uma cultura de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CPAC 15 (10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>). Plantas DN e DTN, sem inoculação, foram incluídas como controle. As plantas de soja foram cultivadas de janeiro a março de 1999, em condições de casa de vegetação.

As raízes foram coletadas nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e os nódulos foram coletados nos tempos 10, 15 e 25 dias após emergência, de cinco plantas de cada linhagem, inoculadas e não inoculadas. Em seguida, as raízes e os nódulos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, até que fossem utilizados para a extração de proteínas.

A partir do estágio V<sub>1</sub> (Fehr & Caviness, 1977) foram fornecidos 100 mL de solução nutritiva completa segundo Hoagland & Arnon (1938) para as plantas

não inoculadas e sem nitrogênio para as plantas inoculadas, duas vezes por semana. O suprimento de água foi feito sempre que necessário.

Na primeira semana de cultivo, as plantas inoculadas receberam, além de macro e micronutrientes, 7,5  $\mu$ moles/L de cobalto na forma de  $\text{CoCl}_2$ .

## **2.2. Obtenção de extratos radiculares e nodulares**

O preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C, de acordo com o método de Ohta et al. (1986), acrescido das seguintes modificações: tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L em substituição ao 0,1 mol/L.

As raízes e nódulos pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido foram triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 8,2, na proporção de 1:3 (p/v) para raízes e 1:12 (p/v) para nódulos, e, em seguida, transferido para tubos de centrífuga e centrifugado a 15.000 g, durante 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido às determinações de proteínas e de atividade da LOX.

## **2.3. Determinação de proteínas totais no extrato bruto**

As determinações de proteínas foram realizadas pelo método do ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), com a albumina sérica bovina como padrão, na concentração de 2,0 mg/mL. Para preparo do reagente A, dissolveram-se 1 g de bicinconinato de sódio, 160 mg de tartarato de sódio, 1,8 g de carbonato de sódio, 400 mg de hidróxido de sódio e 950 mg de bicarbonato de sódio em 100 mL de água deionizada, e o pH foi ajustado para 11,3. Para o preparo do reagente B, dissolveram-se 4 g de sulfato de cobre em 100 mL de água deionizada. Para as determinações, em triplicata, a 50  $\mu$ L da amostra foi adicionado 1 mL do reagente de trabalho (50 partes do reagente A e uma parte do reagente B). A solução foi agitada e colocada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância lida a 562 nm.

## 2.4. Determinação da atividade de lipoxigenases

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

Preparou-se uma solução-estoque com de ácido linoléico 10 mmoles/L, como se segue: a um frasco erlenmeyer, envolvido por papel alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de Tween 20. Em seguida, homogeneizou-se a solução, succionando com uma pipeta automática, evitando-se a formação de bolhas. Para o clareamento da solução foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio 0,5 mol/L. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL revestido por papel alumínio, completado o volume para 25 mL com água deionizada fervida. A solução-estoque do ácido linoléico foi dividida em alíquotas de 1 mL, em microtubos envolvidos em papel-alumínio, e armazenadas a -20 °C. Para a análise da atividade de lipoxigenases, misturaram-se 1 µL do extrato bruto e 4 µL da solução-estoque de ácido linoléico em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, a 25 °C em pH 6,0. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por um período de 2,5 minutos. Sob as mesmas condições, procedeu-se com o branco, que consistiu apenas de substrato e tampão. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. A partir dos valores de absorvância obtidos em 234 nm, foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, utilizando-se a seguinte equação:

$$V = \frac{A_{234}}{\epsilon l t} \quad (1)$$

em que

$A_{234}$  = absorvância a 234 nm;

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

$t$  = 120 segundos (tempo de incubação);

$l$  = espessura da cubeta (1,0 cm).

## 2.5. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes temperaturas

A taxa de oxidação do ácido linoléico catalisada pela ação das lipoxigenases foi determinada nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C.

As reações foram feitas utilizando-se 1 mL de tampão fosfato 50 mmoles/L pH 6,0; 4 µL ácido linoléico 10 mmoles/L como substrato e 1 µL de extratos radiculares e nodulares de soja. As absorvâncias das soluções a 234 nm foram utilizadas para a determinação da atividade de lipoxigenases utilizando-se a equação 1.

## 2.6. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes valores de pH

Nesses experimentos foram utilizados os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 mol/L:

TAMPÃO	Faixa de pH
ácido cítrico/fosfato dissódio	1,5-2,5
ácido cítrico/citrato de sódio	3,0-3,5
ácido acético/acetato de sódio	4,0-4,5
ácido cítrico/acetato de sódio	5,0-5,5
mono fosfato/fosfato dissódio	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
ácido bórico/borato de sódio	9,0-10,0

O perfil pH-atividade de lipoxigenase foi determinado da seguinte maneira: misturaram-se 1 µL do extrato bruto radicular ou nodular e 4 µL da solução estoque de ácido linoléico, em 1 mL de tampão 0,05 mol/L de cada um dos valores de pH descritos acima. 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 partir das absorvâncias obtidas, calculou-se as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico utilizando-se a equação 1 e em

seguida construiu-se um gráfico, alocando-se na ordenada as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico dividido pela concentração de proteína em mg e na abscissa os valores de pH testados.

## **2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja**

A atividade de lipoxigenases foi determinada conforme anteriormente descrito, em pH 6,0, utilizando-se ácido linoléico com substrato, nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-5}$ ;  $2,0 \times 10^{-5}$ ;  $4,0 \times 10^{-5}$ ;  $8,0 \times 10^{-5}$ ;  $16,0 \times 10^{-5}$ ;  $32,0 \times 10^{-5}$ ;  $64,0 \times 10^{-5}$  e  $128,0 \times 10^{-5}$  mmoles/L.

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

## **2.8. Análise de lipoxigenases por eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”**

Os extratos de proteína total foram preparados a partir de raízes nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência (DAE) e de nódulos nos tempos 10, 15 e 25 DAE. Extratos de raízes e nódulos foram obtidos por trituração desses materiais, congelados em nitrogênio líquido, em almofariz com Tris-HCl 50 mmoles/L, pH 8,2 (SIGMA). Após centrifugação a 15.000 g por 30 minutos, fez-se determinações de proteínas do sobrenadante. Amostras de extratos nodulares contendo 25 µg de proteína e de raízes contendo 30 µg de proteína foram aplicadas no gel. Em cada gel foram colocadas, como controle, amostras de proteínas de sementes da variedade Doko e do genótipo DTN (25 µg no gel onde foram aplicadas as amostras de nódulos e 10 µg no de raízes).

Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foi realizada como descrito por Laemmli (1970), com uma concentração do gel separador de 9%. O extrato protéico foi incubado por três minutos, a 100° C, em tampão da amostra [Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 8,0, SDS 0,2%, uréia 5 moles/L, azul-de-bromofenol 0,25% e 2-mercaptoetanol 5% (v/v)] antes de ser aplicado no gel. A eletroforese

foi conduzida por aproximadamente 3 horas, a 100 V, no tampão de corrida (Tris-HCl 0,075 mol/L, glicina 0,576 mol/L e SDS 0,3%).

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o “Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell” (BIORAD), de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (uma hora a 100 V e a 4 °C), a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] por uma hora, à temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo - IgG de galinha, contra as lipoxigenases de sementes de soja, diluído 1:500 em TBS-T, por uma a duas horas sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T três vezes, por 10 minutos cada, e, em seguida, incubada com o anticorpo contra IgG conjugado à fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000 em TBS-T, por aproximadamente duas horas. A membrana foi lavada por mais três vezes, por 10 minutos cada, com TBS-T e, subseqüentemente, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,8, NaCl 0,1 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L) por cinco minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se uma solução contendo 11 µL de NBT (azul-nitro-tetrazolium, GIBCO/BRL), 8,25 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL) em 10 mL de tampão da enzima. Após aparecimento das bandas, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com H<sub>2</sub>O para interromper a reação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes temperaturas

A Figura 1 apresenta a atividade específica de lipoxigenases de raiz e de nódulos, sobre o substrato ácido linoléico a pH 6,0, em diferentes valores de temperatura, para plantas da variedade Doko, 25 dias após emergência. Observou-se atividade de lipoxigenases levemente mais acentuada a 25 °C na raiz e nos nódulos. Dessa forma, utilizou-se a temperatura de 25 °C para as avaliações de atividade de lipoxigenases.

Lanna et al. (1996) e Vieira (1999), trabalhando com lipoxigenases foliares dos genótipos da variedade IAC-100 e de genótipos triplo nulos, verificaram que a temperatura ótima de atuação foi de 25 °C, similar à temperatura obtida.

#### 3.2. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja em diferentes valores de pH

A Figura 2 apresenta o perfil pH-atividade de lipoxigenases sobre a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico no sistema radicular de plantas das linhagens DN, DTN, inoculadas e não inoculadas, coletadas 25 dias após emergência das plantas. Raízes de DN e de DTN possuem perfis de pH-atividade bastante semelhantes, sugerindo a existência de um mesmo “pool” de lipoxigenases em ambos os genótipos. As raízes de DN e de DTN inoculadas (DNI e DTNI, respectivamente) apresentaram perfis de pH semelhantes e coincidentes, sugerindo a existência de um mesmo “pool” das isoenzimas de lipoxigenases nas raízes desses genótipos em simbiose. Comparando as linhagens DN e DTN não inoculados em relação aos seus respectivos genótipos inoculados, ou seja, DNI e DTNI, verifica-se que ambos tiveram o aparecimento de atividade em pH 3,5 (Figura 2). Esses dados sugerem que após a inoculação com a cultura de *Bradyrhizobium elkanii* ocorreu o aparecimento de nova(s) forma(s) de lipoxigenase(s).

Os nódulos das linhagens DN e DTN, 25 dias após emergência, apresentaram um perfil de pH-atividade semelhantes e coincidentes (Figura 3), sugerindo a existência de um mesmo “pool” de lipoxigenases com as mesmas isoenzimas sendo expressas equivalentemente nos nódulos dessas linhagens. Os nódulos apresentaram um pico de atividade em pH 7,5 (Figura 3), ausente em raiz (Figura 2), por outro lado, a raiz apresentou um pico de atividade em pH 2,0 (Figura 2) ausente nos nódulos (Figura 3). Esses resultados sugerem formas distintas de lipoxigenases sendo expressas nas raízes em relação aos nódulos no estágio de desenvolvimento estudado.

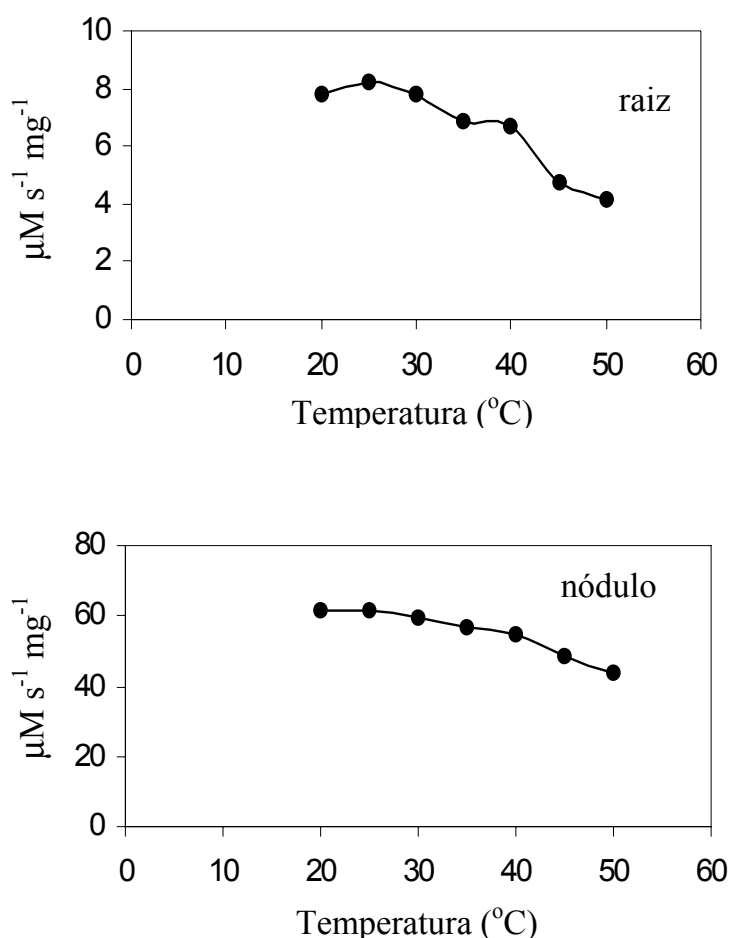


FIGURA 1 – Atividade específica de lipoxigenases da variedade Doko, 25 dias após emergência, em diferentes valores de temperatura.

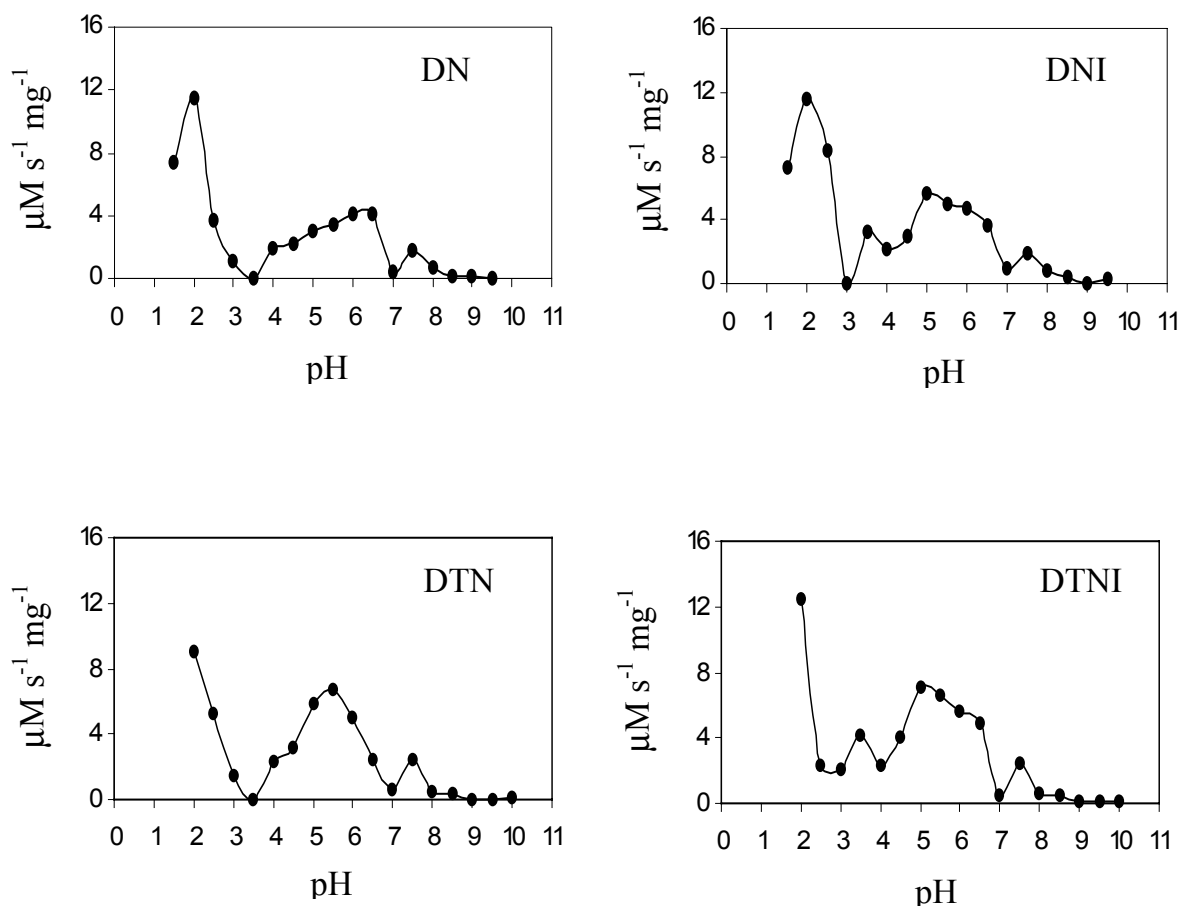


FIGURA 2 – Atividade específica de lipoxigenase em raízes de plantas de soja das linhagens Doko normal (DN), Doko normal inoculada (DNI) e Doko triplo nula (DTN) e Doko triplo nula inoculada (DTNI), 25 dias após emergência, em diferentes valores de pH.

Com a finalidade de confirmar os perfis de pH encontrados em raízes e em nódulos das linhagens DN e DTN, foi analisado o perfil de pH versus atividade de lipoxigenases de plantas inoculadas da variedade IAC-12, 60 dias após emergência (Figura 4). O perfil de pH para raiz da variedade IAC-12 (Figura 4) foi semelhante aos perfis de pH para raiz das linhagens DN e DTN (Figura 2) e no caso de nódulos da variedade IAC-12 (Figura 4), o perfil de pH foi semelhante e coincidente aos perfis de pH para nódulos das linhagens DN e DTN (Figura 3).

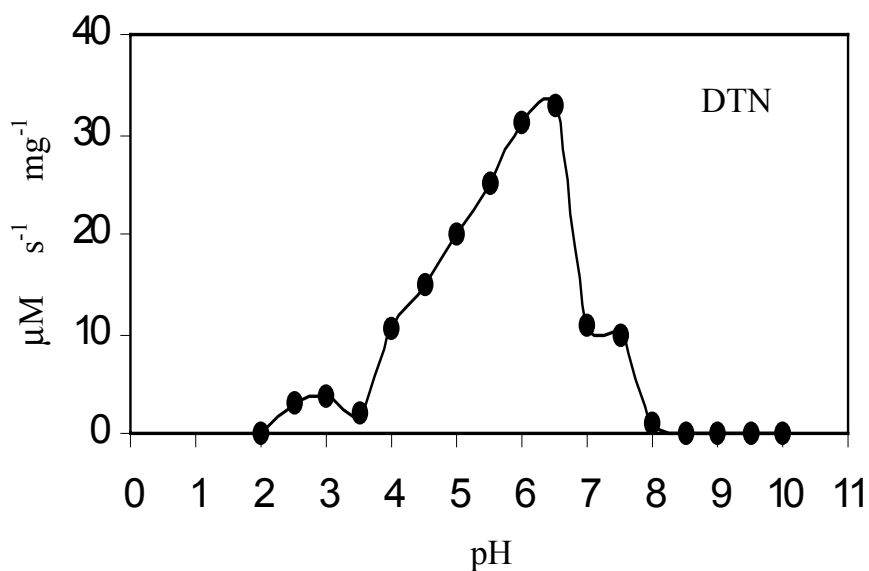
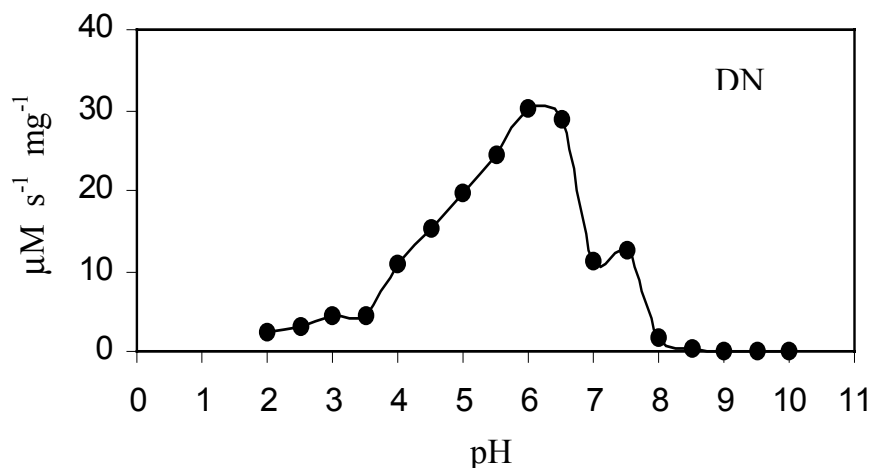


FIGURA 3 – Atividade específica de lipoxigenases em nódulos de plantas de soja das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), 25 dias após emergência, em diferentes valores de pH.

Considerando os perfis de pH para raiz (Figuras 2 e 4), esses resultados confirmam os resultados encontrados por Peterman & Siedow (1985) e Altschuler et al. (1989) os quais observaram atividade de lipoxigenase em raízes de soja em pH 6,8 e não em pH 9,0. Esses resultados diferem daqueles obtidos em raízes de plântulas de abóbora que apresentaram um pico em pH 8,0 (Matsui et al., 1988) e com raízes de plantas de feijão, que apresentaram um pico em pH 9,0 (Eiben & Slusarenko, 1994). Esses resultados sugerem que o “pool” de lipoxigenases presente em raiz é característico para cada espécie avaliada.

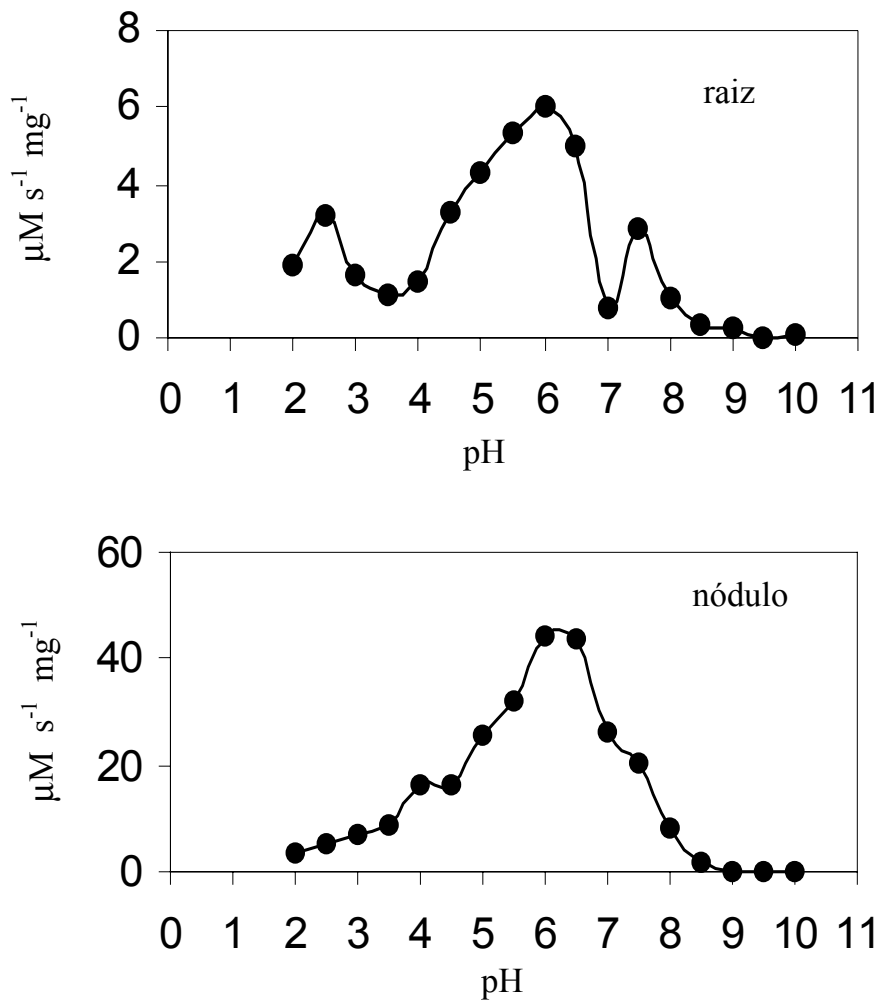


FIGURA 4 – Atividade específica de lipoxigenase de raízes e nódulos de plantas da variedade IAC-12, 60 dias após emergência, em diferentes valores de pH.

O pico de atividade de lipoxigenase em pH 2,0 foi observado em todos os perfis de pH analisados em raiz das linhagens DN e DTN (Figura 2). Esse pico não foi observado em nódulos desses genótipos (Figura 3), nem em folhas dos genótipos IAC-100 N e IAC-100 TN (Vieira, 1999). Contudo, foi observado um pico em pH 2,5, menos pronunciado, em outra variedade de soja, IAC-12, 60 dias

após emergência (Figura 4) e em raízes de plântulas de abóbora com seis dias de idade (Matsui et al., 1988), confirmando que em raízes ocorrem isoenzimas de lipoxigenase que podem atuar em valores de pH muito baixos.

Os nódulos apresentaram os mesmos perfis de pH-atividade para os genótipos DN e DTN, 25 dias após emergência (Figura 3) e para a variedade IAC-12 (Figura 4), 60 dias após emergência, indicando que uma mesma isoenzima de lipoxigenase ou um mesmo “pool” de lipoxigenases é expresso em nódulos nesses diferentes genótipos. Nódulos de plantas de feijão com três meses de idade mostraram atividade em pH 7,0 e não em pH 9,0 (Eiben & Slusarenko, 1994), similar aos resultados obtidos.

Apesar de raízes de plantas de soja das linhagens DN e DTN apresentarem o maior pico de atividade de lipoxigenase em pH 2,0, as outras avaliações de atividade de lipoxigenase foram feitas em pH 6,0 por ter apresentado os menores valores de desvios padrões.

### **3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ aparente ( $K_{M\ app}$ ) e $V_{m\áx.}$ aparente ( $V_{m\áx.\ app}$ ) de lipoxigenases radiculares e nodulares de plantas de soja**

Os gráficos de Michaelis-Menten da atividade de lipoxigenase utilizando o ácido linoléico como substrato, a pH 6,0, de raízes e de nódulos das linhagens DN e DTN, 10 dias após emergência (DAE) estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Nessas figuras estão inseridos os gráficos de duplo recíproco (Lineweaver-Burk).

As lipoxigenases radiculares e nodulares das duas linhagens, inoculadas e não inoculadas, seguem cinética de Michaelis-Menten, demonstrando curva hiperbólica de velocidade versus concentração de substrato, nas concentrações de substrato utilizadas nos experimentos para todos os tempos estudados.

Os valores de  $K_{M\ app}$  e  $V_{m\áx.\ app}$  da lipoxigenase radicular, em pH 6,0, de plantas de soja das DN e DTN, inoculadas e não inoculadas, coletadas após 0, 2, 6, 10, 15 e 25 DAE estão apresentados na Tabela 1 e da lipoxigenase nodular coletadas após 10, 15 e 25 DAE estão apresentados na Tabela 2.

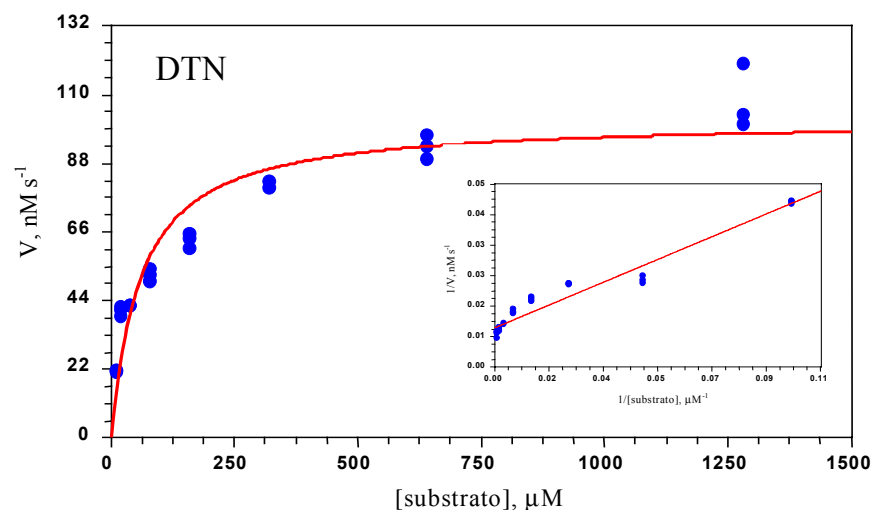
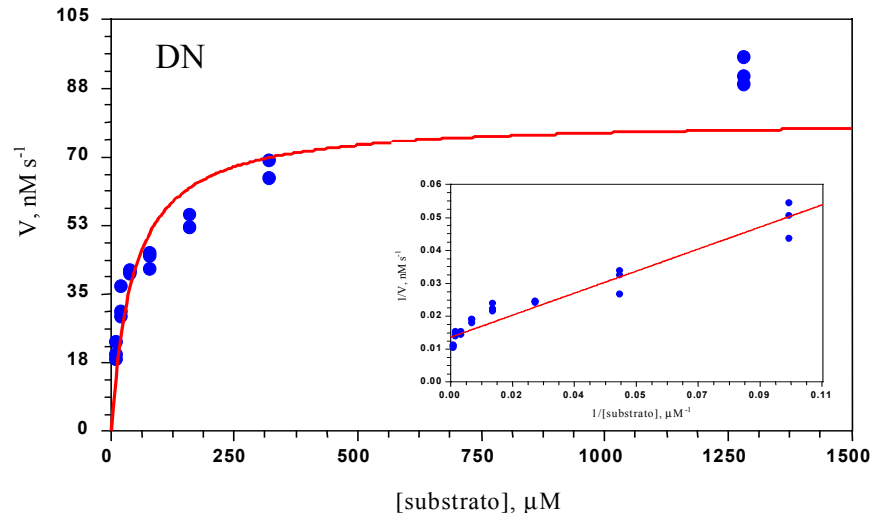


FIGURA 5 – Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada por lipoxigenase de raízes de plantas das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), coletadas 10 dias após emergência. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

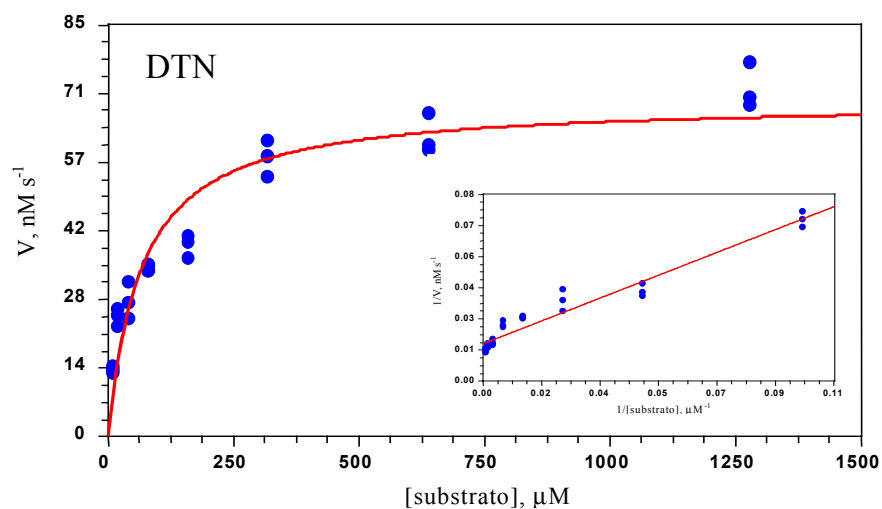
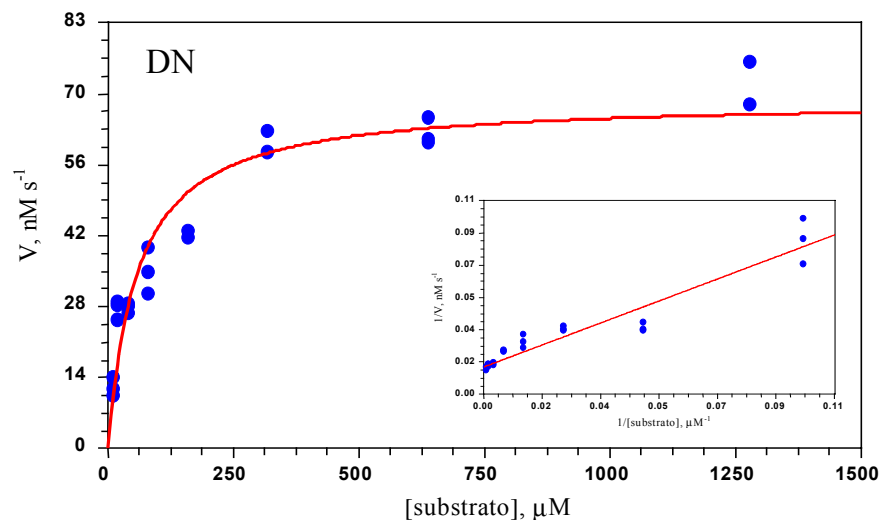


FIGURA 6 – Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada por lipoxigenase de nódulos de plantas das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), coletadas 10 dias após emergência. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

TABELA 1 – Parâmetros cinéticos,  $K_M$  aparente ( $K_{M\text{ app}}$ ) e velocidade máxima aparente ( $V_{\text{máx. app}}$ ) de lipoxigenase sobre o ácido linoléico determinados em extratos de raízes das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), inoculadas e não inoculadas, coletadas após 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência (DAE)

Tempo (DAE)	DN		DNI		DTN		DTNI	
	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )
0	46,97	70,66	54,57	91,95	31,19	64,50	22,31	71,70
2	59,83	103,53	63,13	60,39	46,38	60,24	39,25	58,15
6	68,69	75,29	159,18	86,30	41,12	66,74	41,61	97,45
10	44,49	79,93	120,71	49,85	58,38	101,88	55,48	58,68
15	103,98	43,75	56,95	41,43	104,60	49,15	74,13	60,44
25	48,40	27,52	44,27	24,70	163,97	35,37	113,53	37,93

TABELA 2 – Parâmetros cinéticos,  $K_M$  aparente ( $K_{M\text{ app}}$ ) e velocidade máxima aparente ( $V_{\text{máx. app}}$ ) de lipoxigenase sobre o ácido linoléico determinados em extratos de nódulos das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN) coletadas após 10, 15 e 25 dias após emergência (DAE)

Tempo (DAE)	DN		DTN	
	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )	$K_{M\text{ app}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx. app}}$ ( $\text{nM s}^{-1}$ )
10	57,40	68,43	65,73	69,26
15	49,96	82,06	74,05	85,14
25	43,07	160,59	67,44	225,66

Os valores de  $K_{M\text{ app}}$  para raiz de DN foram similares a DTN até 15 DAE (Tabela 1). Entretanto o valor de  $K_{M\text{ app}}$  para raiz continuou a aumentar para DTN aos 25 DAE (Tabela 1). DN e DTN apresentaram a mesma tendência de aumento dos valores de  $K_{M\text{ app}}$  para raiz, com o aumento dos dias após emergência, o que significa predominância de formas de lipoxigenase com menor afinidade pelo substrato utilizado, à medida que as raízes ficaram mais velhas. Esses resultados ratificam que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afeta a expressão de lipoxigenase da raiz.

Observou-se que o valor de  $K_{M\text{ app}}$  para raiz de DN permanece constante até 10 DAE, aumenta aos 15 DAE e volta aos valores iniciais aos 25 DAE (Tabela 1). Quando as plantas dessa linhagem foram inoculadas, verificou-se um aumento dos valores de  $K_{M\text{ app}}$  aos 6 e 10 DAE, voltando aos valores iniciais à partir de 15 DAE (Tabela 1). DTN e DTN inoculada apresentaram a mesma tendência nos valores de  $K_{M\text{ app}}$  para raiz, mantendo-se valores similares até 10 DAE e aumentando a partir dos 15 DAE, a diferença entre eles foi que as plantas não inoculadas tiveram um aumento mais acentuado nos valores de  $K_{M\text{ app}}$  a partir dos 15 DAE (Tabela 1). Esses resultados mostram que ocorre variação no “pool” de lipoxigenases nas raízes dessas linhagens no período estudado, mas que, provavelmente, essa variação não estaria ligada à inoculação, pois foi observada variação no “pool” de lipoxigenases para as linhagens inoculadas e não inoculadas.

Os valores de  $K_{M\text{ app}}$  para nódulos foram similares para as duas linhagens e para os três tempos analisados (Tabela 2), indicando que o “pool” de lipoxigenases expresso nesse órgão é o mesmo para os dois genótipos e para os três períodos analisados, esse resultado reforça os dados encontrados com o perfil de pH para nódulos de DN e DTN (Figura 3), no qual estas duas linhagens apresentaram o mesmo perfil de pH.

### **3.4. Atividade de lipoxigenases radiculares e nodulares em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de soja**

A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens inoculadas, DNI e DTNI, declinou do tempo 0 dia após emergência (DAE) para o tempo 25 DAE (Figura 7). O declínio da atividade de lipoxigenase dessas linhagens não inoculadas foi a partir de 2 DAE (Figura 7). Contudo, o declínio foi mais acentuado para essas linhagens inoculadas e não inoculadas, a partir de 15 DAE (Figura 7). Esses resultados confirmam os resultados obtidos por Eiben & Slusarenko (1994) com raízes de plantas de feijão, cuja atividade de lipoxigenase medida a pH 7,0 apresentou um pico aos 7 dias após germinação e declinou até níveis não detectáveis aos três meses de idade. Essa maior atividade de lipoxigenase no início de formação de raízes sugere que essa enzima estaria envolvida no crescimento e no desenvolvimento desse órgão. O envolvimento de lipoxigenases no crescimento e no desenvolvimento de vários órgãos vegetais tem sido sugerido (Hildebrand, 1989; Parthier, 1991; Siedow, 1991; Koda, 1992).

As linhagens inoculadas, DN e DTN, apresentaram maior atividade de lipoxigenase nas raízes aos 0 DAE (Figura 7), o que coincidiu com o 3<sup>o</sup> dia após a inoculação com *Bradyrhizobium elkanii*, tempo suficiente para a bactéria entrar em contato com o sistema radicular (Gage et al., 1996), sugerindo que esse aumento de atividade de lipoxigenase seja uma resposta de defesa da planta à bactéria, pois a expressão de lipoxigenase pode ser estimulada por ataque de patógenos (Prusky et al., 1985; Keppler & Novacky, 1987; Ohta et al., 1990; Koch et al., 1992; Croft et al., 1993; Melan et al., 1993; Peng et al., 1994; Yamamoto & Tani, 1995). A partir daí houve declínio de atividade para essas linhagens até 25 DAE. Esse declínio de atividade nas linhagens inoculadas, similar ao ocorrido nas linhagens não inoculadas, provavelmente, seja devido ao hospedeiro apresentar uma resposta de defesa fraca e transitória na interação leguminosa-rizóbio (Hirsch & Kapulnik, 1998).

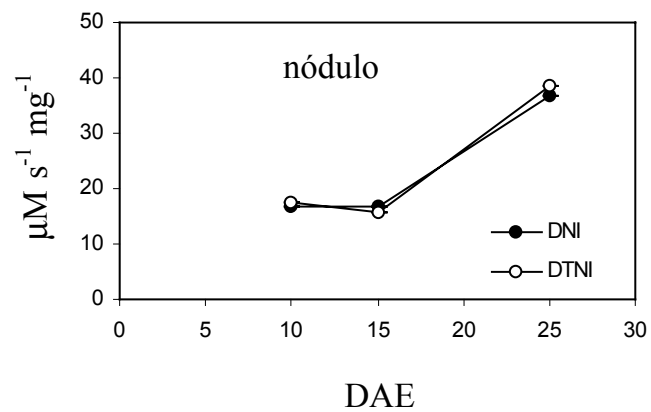
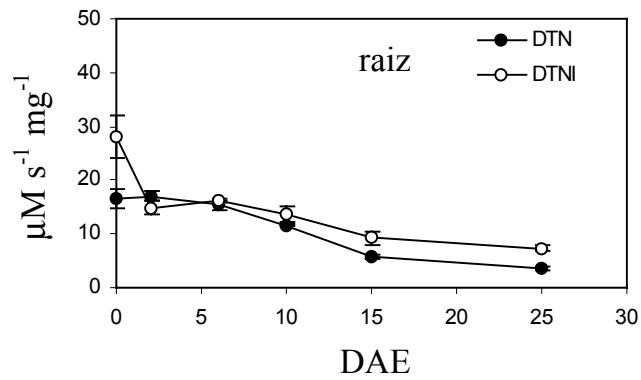
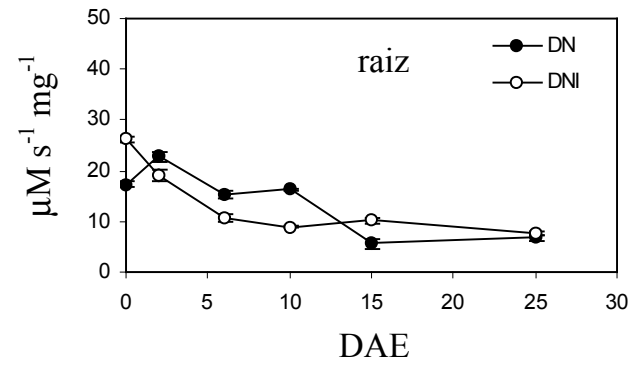


FIGURA 7 – Atividade de lipoxygenase em raízes e em nódulos de plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento. DN = linhagem Doko normal, DTN = linhagem Doko triplo nula, DNI e DTNI = inoculadas, 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência (DAE).

Os primeiros nódulos radiculares foram visíveis a partir de 10 DAE. A atividade de lipoxigenase nos nódulos apresentou-se constante entre 10 e 15 DAE e aumentou acentuadamente entre 15 e 25 DAE (Figura 7).

A alta atividade de lipoxigenase desde o início de formação dos nódulos reforça a hipótese que essa enzima estaria envolvida com crescimento e desenvolvimento também nesse órgão. Em nódulos de ervilha (Gardner et al., 1996) e de *Vicia faba* (Perlick et al., 1996) verificou-se maior concentração de lipoxigenases nos ápices dos nódulos em regiões adjacentes à regiões meristemáticas, mostrando a importância dessa enzima para regiões dos nódulos que estão em pleno crescimento e desenvolvimento.

O acentuado aumento da atividade de lipoxigenase nos nódulos aos 25 DAE (Figura 7) em um estágio de desenvolvimento no qual os nódulos apresentam baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio, sugere que lipoxigenase de nódulo também estaria envolvida com partição e armazenamento de nitrogênio. Lipoxigenases com funções na partição e no armazenamento de nitrogênio em folhas de soja tem sido amplamente proposto (Tranbarger et al., 1991; Grimes et al., 1993; Bunker et al., 1995). A hipótese de lipoxigenase funcionar como proteína de armazenamento temporário em nódulos de soja é reforçada pelos dados obtidos por Gardner et al. (1996) que verificaram em nódulos de plantas de ervilha uma maior concentração de lipoxigenase em uma camada de células parenquimatosas associadas com os tecidos vasculares de nódulos, localização similar às lipoxigenases envolvidas no armazenamento de nitrogênio em folhas de soja (Tranbarger et al., 1991).

### **3.5. "Immunoblotting" de lipoxigenases radiculares e nodulares em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de soja**

Anticorpos anti-lipoxigenases foram usados para detectar antígenos em “western blots” de extratos de raiz inoculada, de nódulo e de raiz não inoculada das linhagens DN e DTN com a finalidade de analisar a dinâmica de lipoxigenase durante a biogênese do nódulo. Foram utilizadas sementes das linhagens DN e DTN como controles positivo e negativo, respectivamente. Nenhum antígeno foi detectado em semente de DTN. Bandas imuno-reativas múltiplas foram visíveis em semente de DN, em raiz e em nódulo (Figura 8). Sementes de soja apresentam três isoenzimas, LOX 1, 2 e 3, com pesos moleculares de 94.038, 97.053 e 96.857, respectivamente, sendo visualizadas nesse “western blot” em dois grupos de mobilidade. Raiz e nódulo apresentaram, pelo menos, dois grupos de mobilidade (Figura 8), similares aos de semente, dessa forma, com grupos de mobilidade de aproximadamente 94 e 97 KDa. Bandas imuno-reativas múltiplas também foram detectadas em nódulos de ervilha (Gardner et al., 1996).

Observou-se que a intensidade das bandas imuno-reativas em raiz das linhagens DN e DTN, inoculadas e não inoculadas, de modo geral, é maior aos 2 e 6 DAE e reduz a partir de 10 DAE (Figura 8), diferindo dos resultados observados com atividade de lipoxigenases em raiz (Figura 7). Isto sugere que lipoxigenases em raiz poderia ter algum controle pós-traducional. Em nódulo dessas linhagens, a intensidade das bandas imuno-reativas apresenta-se bem maior aos 25 DAE (Figura 8), confirmando os resultados observados com atividade de lipoxigenases nesse órgão (Figura 7). Esse resultado sugere que as variações de atividade de lipoxigenases em nódulo são, principalmente, devidas às variações na concentração dessa proteína nesse órgão.

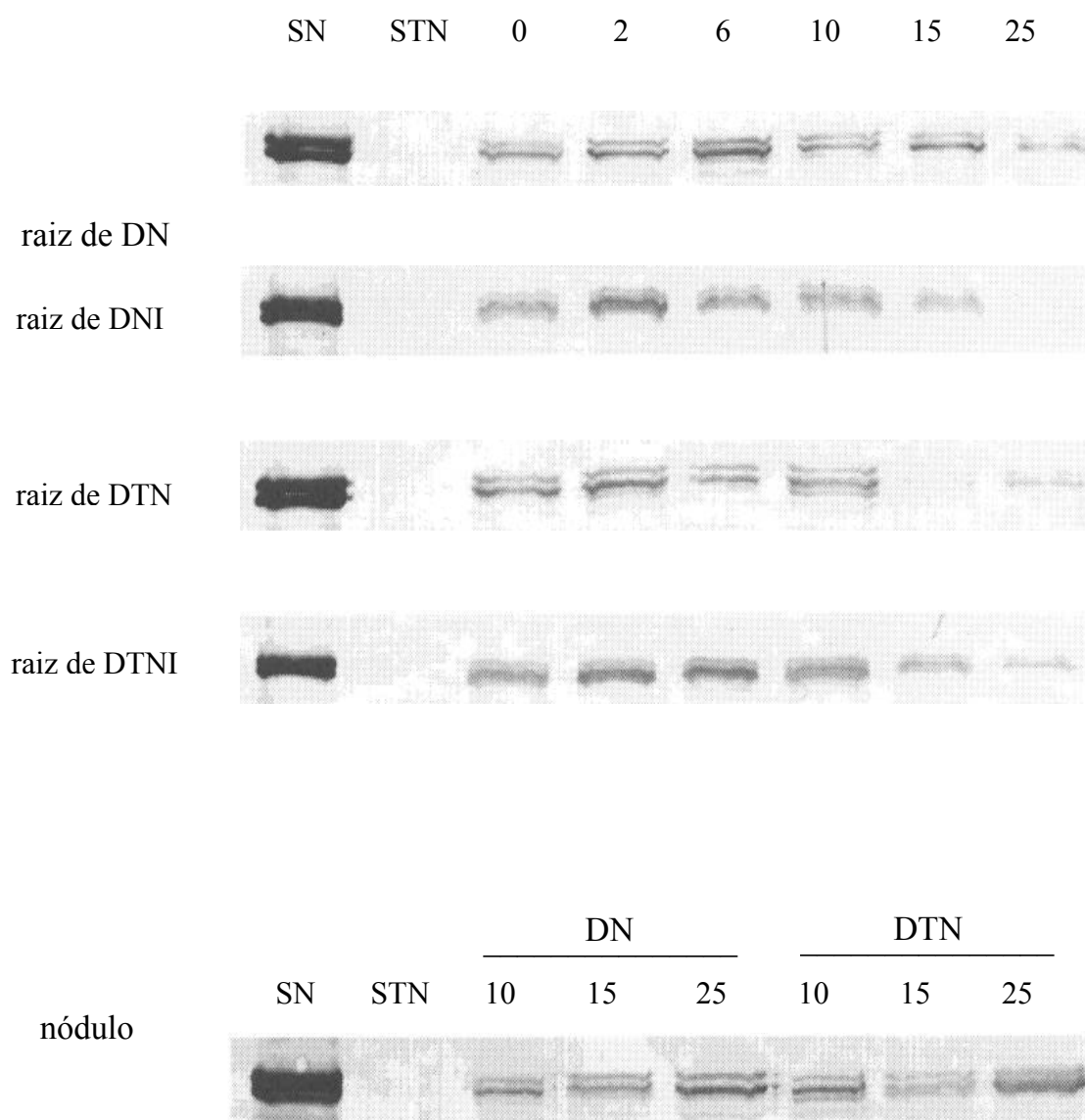


FIGURA 8 – “Immunoblotting” de lipoxigenases extraídas de raiz e de nódulos de soja em diferentes estádios de desenvolvimento. Para raiz foram usadas plantas das linhagens Doko normal (DN) e Doko triplo nula (DTN), inoculadas e não inoculadas, 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência (DAE). Foram aplicadas 30 µg de proteína para cada linha e 10 µg de proteína dos controles, sementes das linhagens DN (SN) e DTN (STN). Para nódulo foram usadas plantas das mesmas linhagens, 10, 15 e 25 DAE e foram aplicadas 25 µg de proteína, inclusive para os controles SN e STN.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se plantas das linhagens Doko normal e Doko triplo nula (desprovidas das lipoxigenases da semente), inoculadas e não inoculadas, avaliou-se os valores de  $K_{M\ app}$ , atividade e "immunoblotting" de lipoxigenases de raiz, nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e de nódulo nos tempos 10, 15 e 25 dias após emergência. Os valores de  $K_{M\ app}$  para raiz de Doko normal e Doko triplo nula apresentaram a mesma tendência de aumento no período estudado, indicando que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou a expressão dos genes para lipoxigenases da raiz. Os valores de  $K_{M\ app}$  para nódulo foram similares para Doko normal e Doko triplo nula e para os três tempos analisados, sugerindo que "pool" de lipoxigenases expresso nesse órgão é o mesmo nessas duas linhagens no período estudado.

A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, declinou com o passar do tempo. Essa maior atividade de lipoxigenases no início de formação de raiz, sugere o envolvimento dessa enzima no crescimento e desenvolvimento desse órgão. Contudo, para nódulos ocorreu um aumento acentuado de atividade de lipoxigenase aos 25 dias após emergência em um estágio de desenvolvimento, no qual tem-se baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio nesse órgão, sugerindo que as lipoxigenases expressas no nódulo estão envolvidas com o armazenamento de nitrogênio, similar ao que tem sido proposto para lipoxigenases em folhas de soja.

Raiz e nódulo apresentaram, pelo menos, dois grupos de mobilidade para lipoxigenases nos "immunoblottings", similares aos de semente, com aproximadamente 94 e 97 KDa. A intensidade das bandas imuno-reativas em raiz difere dos resultados observados com atividade de lipoxigenase nesse tecido, sugerindo que essas lipoxigenases poderiam ter algum controle pós-traducional. No nódulo, a intensidade das bandas imuno-reativas confirmam os resultados obtidos com atividade de lipoxigenase, sugerindo que as variações de atividade dessa enzima nesse órgão são, principalmente, devido às variações na concentração dessa enzima.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAASKO, S.L. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- ALTSCHULER, M.; GRAYBURN, W.S.; COLLINS, G.B. & HILDEBRAND, D.F. Developmental expression of lipoxygenases in soybeans. **Plant Science**, 63:151-158, 1989.
- BELL E. & MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, 103:1133-1137, 1993.
- 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 vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid levels remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995
- CROFT, K.P.C.; JUTTNER, F. & SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L. leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica*. **Plant Physiology**, 101:13-14, 1993.
- EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A.J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, 5(1):123-135, 1994.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service and Agriculture and Home Economics Experiment Station. Special Report, 80. Yowa State University, Ames. 11p. 1977.
- FERRIE, B.J.; BEAUDOIN, N.; BURKHART, W.; BOWSER, C.G. & ROTHSTEIN S.J. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. **Plant Physiology**, 106:109-118, 1994.
- GAGE, D.J.; BOBO, T. & LONG, S.R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, 178: 7159-7166, 1996.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.

- GARDNER, C.D.; SHERRIER, D.J.; KARDAILSKY, I.V. & BREWIN, N.J. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: Identification of lipoxygenase in the lumen of infections threads. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:282-289, 1996.
- GEERTS, A.; FELTKAMP, D. & ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiology**, 105:269-277, 1994.
- GRIMES, H.D.; TRANBARGER, T.J. & FRANCESCHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. **Plant physiology**, 103:457-466, 1993.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.
- HILDEBRAND, D.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S. & BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, 7:201-219, 1988.
- HIRSCH, A.M. & KAPULNIK, Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, 23:205-212, 1998.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin** N° 347, 1938, p.32.
- KATO, T.K.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, 98:324-330, 1992.
- KEPPLER, L.D. & NOVACKY, A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reactions. **Physiology Molecular Plant Biology**, 30:233-245, 1987.
- KOCH, E.; MEIER, B.M.; EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic pseudomonas. **Plant Physiology**, 99:571-576, 1992.
- KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **Int. Ver. Cytol.**, 135:155-199, 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**, 8(2):87-92, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- LEATHERBARROW, R. J. **Enzfitter manual**. Biosoft. London, p.13-42, 1987.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, 13:127-154, 1987.
- MATSUI, K.; KAJIWARA, T.; HAYASHI, K. & HATANAKA, A. Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. **Agricultural Biological Chemistry**, 52(12):3219-3221, 1988.
- MELAN, M.A.; DONG, X.N.; 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 Physiology**, 101:441-450, 1993.
- NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; HAJIKA, M.; IGITA, K. & SUDA, I. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:738-741, 1995.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B. & MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. **Plant Cell Physiology**, 27(5):911-18, 1986.
- OHTA, H.; SHIDA, K.; PENG, Y.L.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J.; AIBARA, S. & MORITA, Y. The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. **Plant Cell Physiology**, 31:1117-1122, 1990.
- OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; MORAIS, R.M.A.; ROCHEBOIS, G.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identification of the three classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Review Biotechnology Techniques**, 12(1):71-74, 1998.
- PALIYATH, G. & DROILLARD, M.J. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, 30:789-812, 1992.

- PARTHIER, B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. **Bot. Acta**, 104:446-454, 1991.
- PENG, Y.L.; SHIRANO, Y.; OHTA, H.; HIBINO, T.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. A novel lipoxygenase from rice – primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. **Journal of Biological Chemistry**, 269:3755-3761, 1994.
- PERLICK, A.M.; ALBUS, U.; STAVIDRIS, T.; FRUHLING, M.; KUSTER, H. & PUHLER, A. The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:860-863, 1996.
- PETERMAN, T.K. & SIEDOW, J.N. Immunological comparison of lipoxygenase isozymes-1 and -2 with soybean seedling lipoxygenases. **Archives Biochemistry Biophysics**, 238:476-483, 1985.
- PINSKY, A.; GROSSMAN, S. & TROP, M. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, 36:571-572, 1971.
- PORTA, H.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; CAMPOS, F.; COLMENERO-FLORES, J.M.; COLORADO, J.M.; CARMONA, M.J.; COVARRUBIAS, A.A. & ROCHA-SOSA, M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant Cell Physiology**, 40(8):850-858, 1999.
- PRUSKY, D.; KOBILER, I.; JACOBY, B.; SIMS, J.J. & MIDLAND, S.L. Inhibitors of avocado lipoxygenase; their possible relationship with the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, 27:269-279, 1985.
- ROUET-MAYER, M.A.; BUREAU, J.M. & LAURIERE, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiology**, 98:971-978, 1992.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, 110:287-299, 1996.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: Structure and function. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 42:145-188, 1991.

- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARDNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OOLSON, B.J. & KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, 150:76-85, 1985.
- SONG, W.C. & BRASH, A.R. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. **Science**, 253:781-784, 1991.
- SUDA, I.; HAJIKI, M.; NISHIBI, Y.; FURURTA, S. & KAZUNORI, I. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:742-747, 1995.
- SZCZYGLOWSKI, K.; HAMBURGER, D.; KAPRANOV, P. & BRUIJN, F.J. Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. **Plant Physiology**, 114:1335-1346, 1997.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRANT, 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**, 3:973-987, 1991.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E.(eds.) **The Biochemistry of Plants**. v. 9, Orlando:Academic Press,1987. p.53-97.
- VIEIRA, A.A. **Caracterização das vias das lipoxigenases de folhas de soja submetidas a fermento**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999. 60p. Tese de Mestrado.
- YAMAMOTO, H. & TANI, T. Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to *Puccinia coronata avenae*. **Journal Phytopathology**, 116:329-337, 1995.

## CAPÍTULO 3

### ISOLAMENTO DE UM cDNA PARCIAL DE LIPOXIGENASE DE NÓDULOS DE SOJA

#### 1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno. Em vegetais, produtos das vias das lipoxigenases estão envolvidos na biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios como jasmonatos e aldeídos (Vick & Zimmerman, 1987; Hildebrand, 1989; Gardner, 1991; Song & Brash, 1991).

Vários clones de cDNA ou genômicos de lipoxigenases têm sido isolados em diferentes espécies vegetais demonstrando uma expressão órgão-específica diferencial (Melan et al., 1993; Eiben & Slusarenko, 1994; Royo et al., 1996; Saravitz & Siedow, 1996). Em soja, lipoxigenases estão organizadas em uma grande família multigênica, consistindo de, pelo menos, oito genes altamente conservados (Bunker et al., 1995). Três desses membros (LOX 1, LOX 2 e LOX 3) estão associados à semente (Shibata et al., 1987; Shibata et al., 1988; Yenofsky et al., 1988) e os outros cinco membros denominados VLX A, B, C, D e E (Bunker et al., 1995), estão associados a diferentes tecidos vegetativos. Os membros da família multigênica *vlx* para soja tiveram suas seqüências de cDNA ou genômicas, parciais ou completas, identificadas por vários grupos (Bell & Mullet, 1991; Shibata et al., 1991; Kato et al., 1992; Kato et al., 1993; Park et al., 1994; Bunker et al., 1995; Bunker & Grimes, 1996; Saravitz & Siedow, 1996).

Lipoxigenases têm sido encontradas em nódulos de *Vicia faba* (Perlick et al., 1996), *Pisum sativum* (Gardner et al., 1996), *Lotus japonicus* (Szczyglowski et al., 1997) e *Phaseolus vulgaris* (Porta et al., 1999). Um cDNA completo, codificando uma lipoxigenase (VfLOX1) foi obtido em uma biblioteca de cDNA de nódulos de *Vicia faba*, apresentando forte expressão nos nódulos e fraca expressão nas raízes. Os transcritos de VfLOX1 foram localizados fora dos

tecidos infectados, no parênquima do nódulo e ao redor do estelo radicular (Perlick et al., 1996). Antígenos de lipoxigenase foram encontrados no lúmen da via de infecção de plantas de ervilha (Gardner et al., 1996), no parênquima de nódulos e nas células não infectadas de plantas de feijão (Porta et al., 1999). Esses trabalhos sugerem que lipoxigenases têm papel importante nos nódulos.

Esse trabalho teve como objetivo isolar um clone de cDNA constituinte da família multigênica de lipoxigenase a partir de RNA de nódulos de soja, como trabalho inicial no entedimento de possíveis funções de lipoxigenase nesse órgão.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizadas plantas de soja da variedade Doko. As sementes foram esterilizadas com álcool 70% por um minuto, com água oxigenada 6% por 5 minutos, lavadas abundantemente com água autoclavada e colocadas para germinar em vasos plásticos com capacidade de 3 litros (uma semente por vaso), contendo areia previamente lavada com água autoclavada. As plantas foram inoculadas na emergência, com 1 mL de uma cultura de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CPAC 15 ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) e cultivadas em condições de casa de vegetação.

A partir do estágio V<sub>1</sub> (Fehr & Caviness, 1977) foram fornecidos 100 mL de solução nutritiva sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1938), duas vezes por semana. O suprimento de água foi feito sempre que necessário.

Na primeira semana de cultivo, as plantas inoculadas receberam, além de macro e micronutrientes, 7,5 µmoles/L de cobalto na forma de CoCl<sub>2</sub>.

Raízes e nódulos foram coletados aos 25 dias após emergência, congelados em nitrogênio líquido logo após a sua coleta e armazenados a -80 °C, até que fossem utilizados para a extração de RNA.

### 2.2. Isolamento de RNA total

Todas as etapas para isolamento do RNA foram conduzidas a 4 °C, sendo todas as soluções usadas tratadas com um inibidor de RNase, o dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%, a 37 °C, por três horas, e, em seguida, autoclavadas.

Cerca de 200 mg de raízes e nódulos da variedade de soja Doko, 25 dias após emergência, foram triturados em nitrogênio líquido. A cada amostra foram adicionados 500 µL de tampão de extração (citrato de sódio 25 mmoles/L, pH 7,0; isotiocianato de guanidina 4 moles/L; lauril sarcosine de sódio 1,5%; e β-mercaptoetanol 100 mmoles/L) e 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico

(24:24:1) (Wadsworth et al., 1988). A amostra foi vigorosamente agitada em vórtex, por 15 segundos. As fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação a 16.000 g, por cinco minutos. A fase aquosa foi re-extraída com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1) por mais duas vezes. A fase aquosa foi adicionada de 400 µL de LiCl 6 mmoles/L e incubada no gelo por, no mínimo, 60 minutos. O RNA foi coletado por centrifugação a 16.000 g por 10 minutos e o precipitado, ressuspensão em 1 mL de LiCl 3 moles/L, sendo, então, centrifugado por 10 minutos a 4 °C. Essa fase de lavagem foi repetida mais duas vezes, nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspensão em 400 µL de acetato de potássio 2% e o RNA, re-precipitado pela adição de 1 mL de etanol e incubação por 12 horas, a -20 °C. O RNA foi separado por centrifugação a 16.000 g por 15 minutos, lavado em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80 °C até o seu uso. A integridade do RNA isolado foi avaliada por eletroforese em géis de agarose 1,8% contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo.

### **2.3. RT-PCR**

As amostras de RNA total de raízes e nódulos da variedade Doko, 25 dias após emergência, foram usadas nas reações de RT-PCR. As amostras, antes de serem amplificadas, foram tratadas com “RQ1 RNase-free Dnase” (Promega), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão “RQ1 Rnase-free Dnase” 1X (Tris-HCl 40 mmoles/L, pH 8,0; MgSO<sub>4</sub> 10 mmoles/L e CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) por 30 minutos a 37 °C, extraídas com igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1), re-extraída com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e precipitadas pela adição de acetato de sódio e etanol. O RNA foi incubado a -20 °C por, no mínimo, 12 horas e, depois, coletado por centrifugação a 16.000 g por 30 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado à temperatura ambiente e ressuspensão em água.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada, usando-se o “SuperScript Kit Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” (Life Technologies),

de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (2,5 µg) foram incubadas com 0,5 µg de oligo (dT)<sub>12-18</sub> a 70 °C por 10 minutos e, em seguida, incubadas no gelo. Logo após, foram adicionados às amostras tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mmoles/L, pH 8,4 e KCl 50 mmoles/L), MgCl<sub>2</sub> 5 mmoles/L, os quatro dNTP 0,5 mmol/L cada e DTT (ditiotreitól) 5 mmoles/L, as quais foram incubadas a 42 °C por 5 minutos. Em seguida foram adicionadas 200 U da enzima “SuperScript II Rnase H - Reverse Transcriptase” (Life Technologies), sendo as amostras incubadas por mais 50 minutos a 42 °C. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de Rnase H (Life Technologies) a 37 °C, por 20 minutos. Para cada amostra, foi feito um controle negativo, que continha todos os reagentes, menos a Transcriptase Reversa.

As reações de síntese da segunda fita e de amplificação foram conduzidas no termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94 °C, por um minuto, seguido de 35 ciclos (a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por um minuto e 72 °C por dois minutos) e período adicional de polimerização a 72 °C por sete minutos. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,4 pmol de “primers” específicos para lipoxigenases, F – 5’-CCTGCAACAGAAGGTGTTGA-3’ e R – 5’-TGGCCAAGGTAGACCTCATC-3’, 2,5 µL da reação de síntese da primeira fita, KCl 50 mmoles/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L e Tris-HCl 10 mmoles/L, pH 8,3. Nessa etapa foi feita uma reação controle, usando-se os “primers” de actina 3 de soja (Shah et al., 1982), F – 5’-CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG-3’ e R – 5’-GGAATCTCTCTGCCCAATTGTTG-3’, com as finalidades de verificar a contaminação com DNA genômico e normalizar as concentrações de cDNA-molde. Na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação, com os “primers” de actina 3 de soja, produz um fragmento de 520 pb, ao passo que na presença de cDNA se observa a presença de um fragmento de 440 pb, devido à presença de um intron de 80 pb.

Os “primers” específicos para lipoxigenases de soja para síntese da segunda fita do RT-PCR foram desenhados pelo programa “Primer3 Input Program” (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), a partir de uma região altamente conservada entre os vários membros da família gênica de lipoxigenase expressos em folhas de soja, *vlxC*, com provável função de reserva vegetativa (acesso U26457; Bunker et al., 1995), depositada no “GenBank”, usando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados por meio de luz ultravioleta.

#### **2.4. Clonagem molecular**

O vetor usado nas clonagens de fragmentos com extremidades abruptas foi o pGEM-T, usando-se o “pGEM-T Easy Kit” (Promega).

As reações de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foram feitas usando-se a enzima T4 DNA Ligase (Life Technologies) em volume final de 10-15  $\mu$ L, de acordo com as técnicas de clonagem descritas por Sambrook et al. (1989) e Ausubel et al. (1998). As reações de ligação foram conduzidas em Tris-HCl 50 mmoles/L, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mmoles/L; ATP 1mmol/L; DTT 1mmol/L; PEG 8.000 5%; o fragmento a ser clonado e o vetor, na proporção 3:1; e T4 DNA Ligase. A reação foi incubada a 4 °C, por 24 horas.

As células competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram preparadas de acordo com Inoue et al. (1990). Essas células foram crescidas em meio SOB (bactotripton 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mmoles/L; KCl 2,5 mmoles/L; MgCl<sub>2</sub> 10 mmoles/L; e MgSO<sub>4</sub> 10 mmoles/L, pH 7,0) até atingirem uma OD<sub>600</sub> de 0,6, sendo posteriormente incubadas a 0 °C, por 10 minutos, e concentradas por centrifugação a 2.500 g por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em meio TB {PIPES (piperazina-N,N'-bis [2-ácido etanossulfônico] 10 mmoles/L; MnCl<sub>2</sub> 55 mmoles/L; CaCl<sub>2</sub> 15 mmoles/L; e KCl 250 mmoles/L, pH 6,7} e incubadas por mais 10 minutos a 0 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 2.500 g

por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas, novamente em meio TB e DMSO (dimetilsulfóxido de sódio), a uma concentração final de 7%. As células foram novamente incubadas a 0 °C por 10 minutos e, em seguida, aliquotadas e armazenadas a -80 °C, até seu uso.

Para as transformações, a 100 µL de células competentes foram adicionados 10 a 15 µL da reação de ligase, sendo a suspensão mantida a 0 °C por 30 minutos. Após choque térmico de dois minutos a 42 °C, 900 µL de meio SOB foram adicionados, prolongando-se a incubação por mais uma hora a 37 °C. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio SOB e espalhadas em placas contendo meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e IPTG (isopropiltio-β-galactosídeo), para a seleção dos clones transformantes e recombinantes. As colônias brancas foram tocadas levemente com a ponta de uma ponteira P10, inoculadas em uma placa de referência e incubadas em uma solução contendo todos os componentes necessários para amplificar o inserto. Cada reação continha tampão PCR 1X, cada um dos dNTPs a 2,5 mmol/L, “M13 Forward Primer” (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e “M13 Reverse Primer” (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'), cada um a 10 pmol e 1 U da enzima *AmpliTaq* DNA Polimerase (PE Applied Biosystems), em um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94 °C, por 10 minutos, seguidas de 30 ciclos (a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto) e um período adicional de polimerização a 72 °C por sete minutos. A placa de referência foi incubada a 37 °C, por 16 horas, e os fragmentos resultantes da PCR foram separados em um gel de agarose a 1%. As colônias que continham o inserto de interesse foram crescidas em 2ml de meio LB contendo ampicilina. O DNA plasmidial, isolado das bactérias transformadas, foi digerido com a enzima de restrição Eco RI e separado por eletroforese em um gel de agarose a 1%, para novo diagnóstico dos clones. As colônias

recombinantes foram armazenadas em 40% de glicerol a -80 °C, para caracterizações adicionais.

## **2.5. Isolamento de DNA plasmidial**

O isolamento do DNA plasmidial, em pequena escala, foi feito por purificação em colunas contidas no “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen Inc.), para sequenciamento. Nesse procedimento, inicialmente, as células foram rompidas pelo método de lise alcalina na presença de RNase H (100 µg/mL), sendo o volume das soluções ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. Após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi isolado do sobrenadante, usando-se a resina pré-empacotada QIAprep Spin e Qiagen tipo 100 (Qiagen Inc.), conforme recomendações do fabricante.

## **2.6. Sequenciamento do DNA**

O DNA foi seqüenciado, usando-se o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” adequado para o sequenciamento de DNA, usando-se o “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer”, PE Applied Biosystems. As reações de sequenciamento se baseiam na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) descrita por Sanger et al. (1977).

As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando-se o termociclador da PE Applied Biosystems, modelo 9.600, programado para um período inicial de desnaturação a 96 °C, por dois minutos, seguido de 30 ciclos (96 °C por 30 segundos, 50 °C por 20 segundos e 60 °C por quatro minutos). As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 8µL de “mix” – fornecido no “Kit” de sequenciamento – 10 pmoles de um “primer” e 200 a 500 ng do DNA a ser seqüenciado. Os produtos de extensão produzidos na reação de sequenciamento foram purificados pela adição de 80 µL de isopropanol 75% e pela incubação à temperatura ambiente, por 15 minutos. Os fragmentos foram coletados por centrifugação a

16.000 g por 20 minutos. O precipitado foi lavado com 250 µL de isopropanol 75%, centrifugado por cinco minutos e secado à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 15 µL de “Template Supression Reagent” (PE Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por cinco minutos e mantidos no gelo até a sua aplicação. Os produtos da extensão foram separados por eletroforese capilar, utilizando-se como matriz o polímero POP6 (PE Applied Biosystems), e a fluorescência coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (PE Applied Biosystems). Os dados foram automaticamente convertidos em seqüências de deoxinucleotídios.

As seqüências geradas foram montadas em contíguos, alinhadas e analisadas, usando-se o programa DNASTAR (DNASTAR Inc.). A busca por similaridades com outras seqüências depositadas no “*GenBank*” foi feita, usando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois “primers” foram delineados a partir de um gene de lipoxigenase expresso em folhas de soja com provável função de reserva vegetativa *v1xC*, acesso U26457 (Bunker et al., 1995). O delineamento dos “primers” foi feito em uma região do gene de *v1xC* altamente conservada entre os vários membros da família mutigênica de lipoxigenase. Esses “primers” foram usados para amplificar prováveis fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko, aos 25 dias após emergência. Esses “primers” amplificaram dois fragmentos de PCR a partir do cDNA de raiz, um de aproximadamente 400 pb e outro de aproximadamente 900 pb, e um fragmento de PCR a partir do cDNA de nódulo, de aproximadamente 400 pb (Figura 1). Essa amplificação diferencial indica que está sendo expressa, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não está sendo expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, o fragmento de PCR de aproximadamente 400 pb proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb (Figura 2). A seqüência de aminoácidos deduzida desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou uma identidade de 80% com a proteína LOX1 de feijão (Eiben & Slusarenko, 1994) e de 79% com a proteína PvLOX2 de feijão (Porta et al., 1999). Essa alta identidade comprova que GmLOXN é proveniente de um gene de lipoxigenase. A comparação da seqüência de aminoácidos derivada de GmLOXN com a seqüência de aminoácidos de lipoxigenases de soja, revelou uma identidade de 71% com LOX 2 (Shibata et al., 1988) e de 69% com *v1xC* (Bunker et al., 1995). As diferenças de identidades entre GmLOXN e as seqüências de aminoácidos de outras lipoxigenases expressas em soja, indicam que GmLOXN faz parte de um novo gene. A maior identidade de GmLOXN com lipoxigenases expressas em nódulo, foi de 79% para feijão (Porta et al., 1999), seguida de 68% para ervilha (Gardner et al., 1996) e de 66% para *Vicia faba* (Perlick et al., 1996).

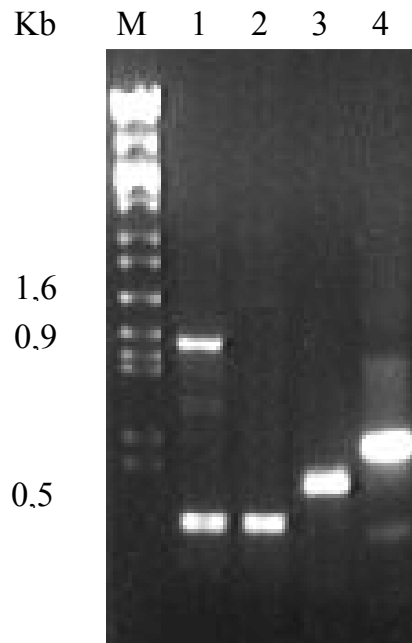


FIGURA 1 – RT-PCR de raiz e de nódulo da variedade de soja Doko. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: 1- raiz; 2 e 3- nódulo; 4- DNA genômico. Em 1 e 2 foi usado “primer” para lipoxigenase e em 3 e 4 foi usado “primer” de actina. M indica o marcador de peso molecular, DNA de  $\lambda$  digerido com *EcoR* I e *Hind* III. Os números à esquerda correspondem ao tamanho das bandas em Kb.

A identidade de 69% de GmLOXN com *vlxC*, uma lipoxigenase com sugerida função de armazenamento temporário de nitrogênio (Bunker et al., 1995) e o fato desse tipo de proteína acumular em soja em resposta a fertilização com nitrogênio (Tranbarger et al., 1991; Grimes et al., 1993; Bunker et al., 1995; Stephenson et al., 1998), sugerem a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que esteja envolvido no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, haja visto que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.

CCTGCAACAGAAGGTGTTGA	GAAGGGTCACGGTGACTTGAAAGACAAGCC	50
ATGGTGGCCTAAGTTGAACACTCTTCAAGATCTGATTCACATTTGCTGCAT		100
TATTATATGGACTGCTTCAGCACTCCATGCAGCTGTGAATTTCCGGACAATA		150
CCCTTATGGCGGTTTCATCCTAAATCGTCCAACCTCTAACCAGAAGATTGCT		200
CCCAGAGCCAGGAACCAAAGAATATGGTGAACCTTACCAGTAATCATCAAA		250
AGGCTTATTTGAGAACAATTACAGGAAAGACTGAGGCCCTTGTGGACCTA		300
ACAGTGATAGAGATATTGTCAAGGCATGCTTCTGATGAGGTCTACCTTGG		350
CCA		353

FIGURA 2 – Seqüência de nucleotídios do clone de cDNA parcial de lipoxigenase. As seqüências marcadas em vermelho correspondem aos sítios de pareamento dos “primers” usados na reação de PCR.

Para melhor entendimento das funções de lipoxigenases em nódulos radiculares torna-se necessária a identificação dos genes de lipoxigenases expressos nesse órgão. Esse trabalho identificou um clone de cDNA parcial de lipoxigenase com 353 pb, GmLOXN, expresso em nódulo.

GmLOXN pode ser utilizado em trabalhos futuros, como sonda na seleção de clones completos de lipoxigenases em biblioteca de cDNA proveniente de nódulo e de raiz. Com o sequenciamento dos clones completos poder-se-á fazer uma melhor comparação com as seqüências de lipoxigenases depositadas no “*GenBank*”, bem como delinear “primers” específicos para cada gene de lipoxigenase expresso no nódulo e na raiz, gerando sondas específicas, de maneira a permitir a identificação da expressão individualizada desses genes durante o desenvolvimento desses órgãos. As sondas obtidas também poderiam ser utilizadas no preparo de anticorpos peptídeo-específicos e serem utilizados em imunolocalização. O conjunto dessas informações permitirá um melhor entendimento das funções de lipoxigenases do nódulo e da raiz.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se dois "primers" específicos para amplificar prováveis fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko, aos 25 dias após emergência, obteve-se dois fragmentos de PCR a partir do cDNA de raiz, um de aproximadamente 400 pb e outro de aproximadamente 900 pb, e um fragmento de PCR a partir do cDNA de nódulo, de aproximadamente 400 pb. Essa amplificação diferencial sugere que está sendo expressa, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não está sendo expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, o fragmento de PCR de aproximadamente 400 pb proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb. A seqüência de aminoácidos desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou que GmLOXN faz parte de um novo gene de lipoxigenase expresso em soja.

A identidade de 69% de GmLOXN com *vlxC*, uma lipoxigenase com função provável de armazenamento temporário de nitrogênio e o fato desse tipo de proteína acumular-se em soja em resposta a fertilização com nitrogênio, sugerem a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que está envolvido no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, uma vez que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEM, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25:3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G. & SMITH, K.S. **Currents protocols in molecular biology in CD-ROM**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- BELL, E. & MULLET, J.E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Molecular and General Genetics**, 230:456-462, 1991.
- BUNKER, T.W. & GRIMES, H.D. Nucleotide sequence of *v1xB*, a vegetative lipoxygenase from soybean (Accession no. U50075). **Plant Physiology**, 111:348, 1996
- 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 vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid levels remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995
- EIBEN, H.G. & SLUSARENKO, A.J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, 5(1):123-135, 1994.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service and Agriculture and Home Economics Experiment Station. Special Report, 80. Yowa State University, Ames. 11p. 1977.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.
- GARDNER, C.D.; SHERRIER, D.J.; KARDAILSKY, I.V. & BREWIN, N.J. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: Identification of lipoxygenase in the lumen of infections threads **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:282-289, 1996.
- GRIMES, H.D.; TRANBARGER, T.J. & FRANCESHI, V.R. Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxigenase in soybeans. **Plant physiology**, 103:457-466, 1993.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.

- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin** N° 347, 1938, p.32.
- INOUE, H.; NOJIMA, H. & OKAYMA, K. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96:23-28, 1990.
- KATO, T.K.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, 98:324-330, 1992.
- KATO, T.K.; SHIRANO, Y.; IWAMOTO, H. & SHIBATA, D. Soybean lipoxygenase L-4, a component of the 94 kilodalton storage protein in vegetative tissues: Expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl. **Plant Cell Physiology**, 34:1063-1072, 1993.
- MELAN, M.A.; DONG, X.N.; 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 Physiology**, 101:441-450, 1993.
- PERLICK, A.M.; ALBUS, U.; STAVIDRIS, T.; FRUHLING, M.; KUSTER, H. & PUHLER, A. The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:860-863, 1996.
- PARK, T.K.; HOLLAND, M.A.; LASKEY, J.G. & POLACCO, J.C. Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, 96:109-117, 1994.
- PORTA, H.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; CAMPOS, F.; COLMENERO-FLORES, J.M.; COLORADO, J.M.; CARMONA, M.J.; COVARRUBIAS, A.A. & ROCHA-SOSA, M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant Cell Physiology**, 40(8):850-858, 1999.
- ROYO, J.; VANCANNEYT, G.; PEREZ A.G.; SANZ, C.; STORMANN, K.; ROSAHL, S. & SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound regulated expression patterns. **Journal Biological Chemistry**, 271:21012-21019, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 74:5463-5467, 1977.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, 110:287-299, 1996.
- SHAH, D.M.; HIGHTOWER, R.C. & MEAGHER, R.B. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 79:1022-1026, 1982.
- SHIBATA, D.; KATO, T. & TANAKA, K. Nucleotide sequences of a soybean lipoxygenase gene and the short intergenic region between an upstream lipoxygenase gene. **Plant Molecular Biology**, 16:353-359, 1991.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; ANDREWS, P.C.; HERMODSON, M. & AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-2. **Journal Biological Chemistry**, 263:6816-6821, 1988.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; HERMODSON, M.; YAZDANPARAST, R. & AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. **Journal Biological Chemistry**, 262:10080-10085, 1987.
- SONG, W.C. & BRASH, A.R. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. **Science**, 253:781-784, 1991.
- 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 Physiology**, 116:923-933, 1998.
- SZCZYGLOWSKI, K.; HAMBURGER, D.; KAPRANOV, P. & BRUIJN, F.J. Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. **Plant Physiology**, 114:1335-1346, 1997.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRANT, 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**, 3:973-987, 1991.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E.(eds.) **The Biochemistry of Plants**. v. 9, Orlando:Academic Press, 1987. p.53-97.

WADSWORTH, G.J.; REDINHBAUGH, M.G. & SCANDALIOS, J.G. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA blot analysis. **Analytical Biochemistry**, 172:297-283, 1988.

YENOFKY, R.L.; FINE, M. & LIU, C. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. **Molecular and General Genetics**, 211:215-222, 1988.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Várias linhagens de soja desprovidas das isoenzimas LOX 1, 2 e 3 na semente (triplo nulas) derivadas de variedades elite têm sido desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UVF, que visa aumentar a sua aceitabilidade na alimentação humana. Essas linhagens triplo nulas têm sido avaliadas para caracteres agronômicos, contudo, ainda não tinham sido avaliadas quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Tais análises são necessárias, haja visto que o nitrogênio requerido para o desenvolvimento de plantas de soja é quase completamente suprido pela bactéria *Bradyrhizobium* por meio do estabelecimento de relação simbiótica.

Foram montados três experimentos, em épocas diferentes, para comparar três linhagens de soja triplo nulas e as variedades Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12 que lhes deram origem, quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.

Os resultados desse estudo indicam que as isoenzimas de lipoxigenases das sementes não foram fatores determinantes da formação de nódulos, bem como na fixação de nitrogênio que ocorre nos nódulos.

Utilizando-se plantas das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, avaliou-se os valores de  $K_{M\ app}$ , atividade e "immunoblotting" de lipoxigenases de raiz nos tempos 0, 2, 6, 10, 15 e 25 dias após emergência e de nódulo nos tempos 10, 15 e 25 dias após emergência. Os valores de  $K_{M\ app}$  para raiz de Doko normal e de Doko triplo nula apresentaram a mesma tendência de aumento no período estudado, indicando que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou a expressão das lipoxigenases da raiz. Os valores de  $K_{M\ app}$  para nódulo foram similares para Doko normal e Doko triplo nula e para os três tempos analisados, sugerindo que o "pool" de lipoxigenases expresso nesse órgão é o mesmo nessas duas linhagens no período estudado.

A atividade de lipoxigenases nas raízes das linhagens Doko normal e Doko triplo nula, inoculadas e não inoculadas, declinou com o passar do tempo.

Essa maior atividade de lipoxigenases no início de formação da raiz, sugere o envolvimento dessa enzima no crescimento e desenvolvimento desse órgão. Contudo, para nódulo ocorreu um aumento acentuado de atividade de lipoxigenase aos 25 dias após emergência em um estágio de desenvolvimento no qual tem-se baixa taxa de crescimento e alta taxa de fixação de nitrogênio nesse órgão, sugerindo que as lipoxigenases expressas no nódulo estariam envolvidas com armazenamento de nitrogênio, similar ao que tem sido proposto para lipoxigenases de folhas de soja.

Raiz e nódulo apresentaram, pelo menos, dois grupos de mobilidade para lipoxigenases nos "immunoblottings", similares aos de semente, com aproximadamente 94 e 97 KDa. A intensidade das bandas imuno-reativas em raiz e em nódulo dos genótipos estudados confirmaram os resultados obtidos com atividade de lipoxigenase, sugerindo que as variações de atividade dessa enzima nesses órgãos foram, principalmente, devido à variações na concentração dessa enzima.

Utilizando-se dois "primers" específicos para amplificar fragmentos de PCR de lipoxigenase, a partir de cDNA de nódulo e de raiz de plantas de soja da variedade Doko obteve-se uma amplificação diferencial nesses dois órgãos, que indicou a expressão de, pelo menos, uma forma distinta de lipoxigenase na raiz, que não é expressa no nódulo.

Com o objetivo de inferir prováveis funções de lipoxigenase presente no nódulo, um fragmento de PCR proveniente de nódulo foi clonado e seqüenciado, resultando em uma seqüência de 353 pb. A seqüência de aminoácidos desse clone de cDNA, GmLOXN, quando comparada com seqüências de aminoácidos depositadas no "*GenBank*" revelou fazer parte de um novo gene de lipoxigenase expresso em soja.

A identidade de 69% de GmLOXN com *v1xC*, uma lipoxigenase com função de armazenamento temporário de nitrogênio em folhas, acrescido do fato desse tipo de proteína acumular-se em resposta a fertilização com nitrogênio, sugere a possibilidade de GmLOXN fazer parte de um gene que esteja envolvido

no armazenamento temporário de nitrogênio em nódulos, haja visto que nesse órgão tem-se grande disponibilidade de nitrogênio.