

CARACTERIZAÇÃO DA VIA DAS LIPOXIGENASES EM PLANTAS DE SOJA RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS A *DIAPHORTE PHASEOLORUM* F.SP. *MERIDIONALIS*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO-DA-HASTE

MARCELO DIAS DA SILVA¹, MARIA GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA², ANNA CRISTINA LANNA³, CHRISTIANO VIEIRA PIRES⁴, NEWTON DENIZ PIOVESAN⁵, INÊS CHAMEL JOSÉ⁶, ROSA BÁRBARA¹ BATISTA, EVERALDO GONÇALVES DE BARROS⁷ E MAURILIO ALVES MOREIRA⁸.

Universidade Federal de Viçosa – 36.570-000 – Viçosa – MG

RESUMO - Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxido-redutase - EC 1.13.11.12) são dioxigenases que catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema cis, cis, 1,4 - pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes. As lipoxigenases vegetais utilizam o ácido linolênico (C18:3) ou ácido linoléico (C18:2) como substrato e estão associadas a importantes processos fisiológicos, tais como: biossíntese de compostos regulatórios, crescimento e desenvolvimento, senescência, germinação de sementes, resposta a fermento, proteína de reserva vegetativa e resistência a insetos e patógenos. Quando os tecidos da planta são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos, cujo produto inicial são os hidroperóxidos resultante da ação das lipoxigenases. Entre os vários produtos formados, têm-se a traumatina, o ácido jasmônico, os aldeídos voláteis e os oxiácidos. Para avaliar a capacidade de as plantas de soja responderem, por meio da Via das Lipoxigenases, ao ataque do fungo causador da doença cancro-da-haste - *Diaphorte phaseolorum* (Cke. e Ell) f. sp. *meridionalis* - foram realizadas a caracterização bioquímico-cinética do *pool* de lipoxigenases foliares de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e a quantificação dos produtos da Via das Lipoxigenases, utilizando-se um cultivar resistente (FT-Cristalina RCH) e um susceptível (FT-Cristalina) ao patógeno. As plantas dos dois cultivares, infectadas com o patógeno ou apenas injuriadas mecanicamente, apresentaram valores de atividade específica de lipoxigenases maiores que os respectivos controles, em diferentes valores de pH e temperatura, e o *pool* de lipoxigenases dos dois genótipos apresentou cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato analisada. Ocorreu aumento dos níveis de inibidores de proteases e aldeídos totais, os quais são produtos dessa via bioquímica. Pelos parâmetros bioquímico e cinético, há a sugestão de uma resposta das plantas de soja através das Via das Lipoxigenases.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: *Glycine max*, lipoxigenase, *Diaporthe phaseolorum*, aldeídos, inibidores de protease.

Recebido: 18/6/2001 – Aceito: 16/10/2001

1. MS em Agroquímica pela Universidade Federal de Viçosa.

2. Professora Adjunto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/ BIOAGRO, UFV - CEP:36570 - 000, Viçosa, MG
e-mail: malmeida@mail.ufv.br.

3. Doutoranda em Fisiologia Vegetal, UFV.

4. Mestrando em Agroquímica, UFV.

5. Técnico de Nível Superior, BIOAGRO/UFV.

6. Doutoranda em Tecnologia de Alimentos, UFV.

7. Professor Titular do Departamento de Biologia Geral/ BIOAGRO, UFV.

8. Professor Titular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/ BIOAGRO, UFV.

CHARACTERIZATION OF LIPOXYGENASE PATHWAY OF SOYBEAN PLANTS RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO *DIAPHORTE PHASEOLORUM* F.SP. *MERIDIONALIS*, PATHOGEN RESPONSIBLE FOR STEM CANCKER

ABSTRACT - Lipoxigenases (linoleate: oxygen oxido-reductases, EC 1.13.11.12) are a class of enzymes that catalyze the addition of molecular oxygen to 1,4 - cis,cis - pentadiene motifs of unsaturated fatty acids to form hydroperoxide products. Plant lipoxigenases use linoleic (18:2) or linolenic (18:3) acids as substrates and are involved in important physiological process such as biosynthesis of regulatory molecules, growth and development, senescence, responses to wounding, vegetative storage protein and may directly mediate host resistance to insect, fungal and bacterial pathogens. When plant tissues are damaged, by pathogens or mechanically injured, a series of lipid degradation occurs, via lipoxigenase pathway, giving rise to hydroperoxydes. Among several products formed it can be found traumatin, jasmonic acid, volatile aldehydes and oxyacids. In this work we evaluated the capacity of the soybean plant to respond to the attack of stem cancker fungi (*Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*), through the lipoxigenase pathway. Leaves from resistant (FT-Cristalina RCH) and susceptible (FT-Cristalina) cultivars were used for kinetic evaluation of lipoxigenase and biochemical quantitation of products from the lipoxigenase pathway. Plants from both cultivars, infected with the pathogen or mechanically injured, showed values of lipoxigenase specific activity higher than the controls in different pH and temperature values. The lipoxigenase pool of both cultivars showed kinetic of Michaelis-Menten within the range of substrate concentration assayed. There were an increase in protease inhibitors and of total aldehydes contents, which are products of the lipoxigenase pathway. The biochemical and kinetic parameters suggest a response of the soybean plant through the lipoxigenase pathway.

ADDITIONAL INDEX TERMS: *Glycine max*, lipoxigenase, *Diaporthe phaseolorum*, aldehydes, protease inhibitors.

INTRODUÇÃO

As lipoxigenases (LOX) são isoenzimas que estão amplamente distribuídas em plantas e animais superiores. Elas catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes e contêm ferro não-heme, que é necessário para sua atividade catalítica (Axelrod *et al.*, 1981; Mack *et al.*, 1987; Vick e Zimmerman, 1987; Bunker *et al.*, 1995).

As lipoxigenases vegetais utilizam ácido linolênico (C18:3) ou ácido linoléico (C18:2) como substrato e estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido traumático e ácido jasmônico (Anderson *et al.*, 1989; Farmer e Ryan, 1992; Bunker *et al.*, 1995), o

crescimento e desenvolvimento (Hildebrand, 1989; Siedow, 1991), senescência (Rouet-Mayer *et al.*, 1992), germinação de sementes (Park *et al.*, 1994), resposta a ferimento (Vieira *et al.*, 2001), reserva vegetativa (Tranbarger *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1995; Stephenson *et al.*, 1998) e resistência a insetos e patógenos (Bell e Mullet, 1993; Melan *et al.*, 1993; Croft *et al.*, 1993; Saravitz e Siedow, 1996; Heitz *et al.*, 1997; Bohland *et al.*, 1997; Fidantsef e Bostock, 1998; Silva, 1999).

Durante um processo de estresse, ocorrem danos físicos às células e, em razão disso, uma degradação seqüencial de lipídeos pode ser iniciada pelas lipoxigenases. Essas formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos. Dentre esses, estão a traumatina,

envolvida na resposta a ferimentos e na indução da divisão celular e formação de calos (Siedow, 1991), o ácido jasmônico, associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (Melan *et al.*, 1993), os aldeídos voláteis e oxiácidos, que causam efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos (Vaughn e Gardner, 1993), insetos e protozoários (Croft *et al.*, 1993). Esses aldeídos possivelmente agem também como um sinal químico na atração do inimigo natural do herbívoro para a planta danificada (Paré e Tumlinson, 1997).

Entre as doenças que atacam a cultura da soja, cita-se o cancro-da-haste, causado pelo fungo *Diaphorte phaseolorum* (Cke. e Ell) f. sp. *meridionalis*, que acomete as plantas provocando necrose nas folhas e avermelhamento nas hastes. Essa enfermidade causa a morte da planta entre a floração e o enchimento das vagens, podendo levar a perdas de 80 a 100%. A doença está presente em todas as áreas produtoras de soja do País e o seu controle exige integração de todas as medidas capazes de reduzir o potencial de inóculo do patógeno na lavoura, como: uso de cultivares resistentes, tratamento de semente, rotação/sucessão de culturas, manejo do solo com a incorporação dos restos culturais, escalonamento de épocas de semeadura e adubação equilibrada (EMBRAPA, 2000).

Com este trabalho objetivou-se realizar uma avaliação bioquímica e cinético-enzimática da Via das Lipoxigenases, em plantas de soja resistente (FT-Cristalina RCH) e susceptível (FT-Cristalina) ao fungo *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causador do cancro-da-haste, a fim de verificar se a planta de soja produz uma resposta ao patógeno através dessa via bioquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do cultivar comercial FT-Cristalina e uma linhagem derivada desse cultivar

FT-Cristalina RCH, resistente ao cancro-da-haste. Sementes de FT-Cristalina foram fornecidas pelo banco de germoplasma de soja do Departamento de Fitotecnia da UFV, ao passo que o cultivar FT-Cristalina RCH foi desenvolvido pelo Programa de Melhoramento de Soja, BIOAGRO/UFV, pelo método de retrocruzamento, tendo como progenitor doador da resistência o cultivar DOKO RC. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, em vasos com capacidade para 4,0 kg de solo, num total de 336 vasos contendo 3 plantas cada um.

Fonte de enzimas

Foram utilizadas folhas de soja dos cultivares FT-Cristalina e FT-Cristalina RCH, no estágio V3 de desenvolvimento (Fehr *et al.*, 1971). Os três folíolos da segunda folha trifoliolar, completamente expandidas, foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Origem e preparo do inóculo

Foi utilizado o CH 08, isolado de *D. phaseolorum*, nas inoculações. Esse foi fornecido pelo Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA – Soja) e obtido de hastes de soja do cultivar Davis, proveniente do município de Palmeiras, Paraná. O isolado foi multiplicado e cedido pelo Programa de Melhoramento de Soja do Departamento de Fitotecnia de UFV.

Inoculação das plantas

Foi realizada a inoculação com palito de dente de madeira colonizado com o micélio fúngico, de acordo com a técnica descrita por Yorinori (1995). As inoculações foram feitas introduzindo-se o palito colonizado na haste principal das plantas, acima 1,5 cm das folhas unifolioladas, no estágio V3 de desenvolvimento (Fehr *et al.*, 1971). Para constatar se a resposta seria de fato provocada pelo fungo, foram preparados dois grupos de plantas-controle: um grupo que foi inoculado apenas com o palito não colonizado pelo fungo e o outro grupo que não

recebeu nenhum tipo de tratamento. Imediatamente após inoculação e 24, 48 e 96 horas após esses tratamentos, os três folíolos da segunda folha trifoliolar, completamente expandida, foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior obtenção dos extratos foliares.

Obtenção dos extratos foliares

A fonte de uma proteína é, em geral, um tecido animal, vegetal ou, então, células microbianas. As células precisam ser rompidas e a proteína obtida em uma solução chamada de extrato bruto (Lehninger *et al.*, 1995). Assim, o preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C , de acordo com o método de Ohta *et al.* (1986), com as seguintes modificações: tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5, em substituição ao tampão fosfato 0,1 M pH 6,5, além de não ter sido utilizado Triton X-100.

Os folíolos pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido foram triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, na proporção 1:3 (p/v) e, em seguida, centrifugado a $17200 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à determinação de proteínas pelo método do ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985) e à determinação da atividade de lipoxigenases pelo método espectrofotométrico, utilizando-se linoleato de sódio como substrato (Axelrod *et al.*, 1981). Todas as análises foram realizadas com cinco repetições.

Determinação da atividade de lipoxigenases

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

Preparou-se uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido

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

Para as análises das atividades de lipoxigenases, misturaram-se 1,0 μL do extrato bruto foliar e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,0. A velocidade da reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por um período de 120 segundos. Sob as mesmas condições, procedeu-se com o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. Experiência anterior do Laboratório de Enzimologia, BIOAGRO/UFV, demonstrou que nessas condições de reação a atividade é linear com o tempo. Todas as incubações foram realizadas com cinco repetições.

Por meio de regressão linear dos valores de absorvância a 234 nm obtidos a cada 30 segundos, até 120 segundos, foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, expressas em $V(\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$, utilizando-se a seguinte equação:

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

em que:

A_{234} = absorvância a 234 nm

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

t = 120 segundos (tempo de análise).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

Atividade específica é o número de unidades de enzima por miligrama de proteína (Lehninger *et al.*, 1995). Assim, os valores de atividade específica foram obtidos dividindo-se os valores de atividade pela concentração de proteínas e foram expressos em $V(M.s^{-1}/mg)$.

Determinação da atividade de lipoxigenases em vários valores de pH

Os seguintes sistemas-tampão foram usados: ácido cítrico/fosfato dissódico (2,0-2,5); ácido cítrico/citrato de sódio (3,0-3,5); ácido acético/acetato de sódio (4,0-4,5); ácido cítrico/citrato de sódio (5,0-5,5); monofosfato/fosfato dissódico (6,0-7,0); Tris-HCl (7,5-8,5) e ácido bórico/borato de sódio (9,0-10,0), na concentração de 50 mM. As determinações das atividades de lipoxigenases nos respectivos valores de pH foram realizadas misturando-se 1,0 μ L do extrato bruto foliar e 4,0 μ L da solução-estoque de linoleato de sódio a 1,0 mL de tampão 0,05 M de cada um dos respectivos pH descritos acima. A velocidade da reação, a 234 nm, foi determinada de 30 em 30 segundos por um período de 120 segundos, a 25°C. Baseando-se nas absorvâncias obtidas, calcularam-se as velocidades de formação de hidroperóxidos do ácido linoléico, como descrito anteriormente.

Determinação da atividade de lipoxigenases em várias temperaturas

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

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

Determinação dos parâmetros cinéticos

As determinações dos parâmetros cinéticos de lipoxigenases foram realizadas utilizando-se 1,0 μ L de extrato bruto foliar, contendo cerca de 1,0 mg de proteína por mL de solução, 1 mL de tampão fosfato 50 mM pH 6,0 e linoleato de sódio como substrato, nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $4,0 \times 10^{-5}$; $8,0 \times 10^{-5}$; $16,0 \times 10^{-5}$; $32,0 \times 10^{-5}$; $64,0 \times 10^{-5}$ e 128×10^{-5} M.

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

Determinação de inibidores de proteases nos extratos foliares

Foi realizada com base na inibição da atividade da tripsina, utilizando-se D,L-BAPNA como substrato. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com o método de Kakade *et al.* (1974).

Determinação de hexanal e aldeídos totais

A determinação de hexanal foi realizada por cromatografia gasosa, segundo o método de Utumi *et al.* (1998). A determinação de aldeídos totais foi realizada pelo método colorimétrico desenvolvido por Santos *et al.* (1993), utilizando 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente de cor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH e da temperatura na atividade de lipoxigenase

Pelos resultados, verificam-se dois picos de pH mais acentuados de atividade específica de lipoxigenases, 4,0 e 6,0; para os dois cultivares, FT-Cristalina RCH e FT-Cristalina (Figura 1). Como trabalhou-se com extrato foliar contendo lipoxigenases e não com formas purificadas, sugere-se, pelos resultados que o *pool* de

lipoxigenases contém formas das isoenzimas com maiores valores de atividade a pH 4,0 e formas com maiores valores de atividade a pH 6,0, respondendo à injúria causada pelo palito e pelo patógeno; contudo, a atividade apresentou-se maior em pH 6,0 nos tratamentos. Christopher et al.

(1972), utilizando-se ácido linoléico como substrato de lipoxigenases de sementes de soja, demonstraram que a LOX 1 tem atividade máxima em pH 9,5, a LOX 2, em pH 6,5, e a LOX 3 possui máxima atividade numa ampla faixa de pH, ou seja, de pH 5,0 a 9,0.

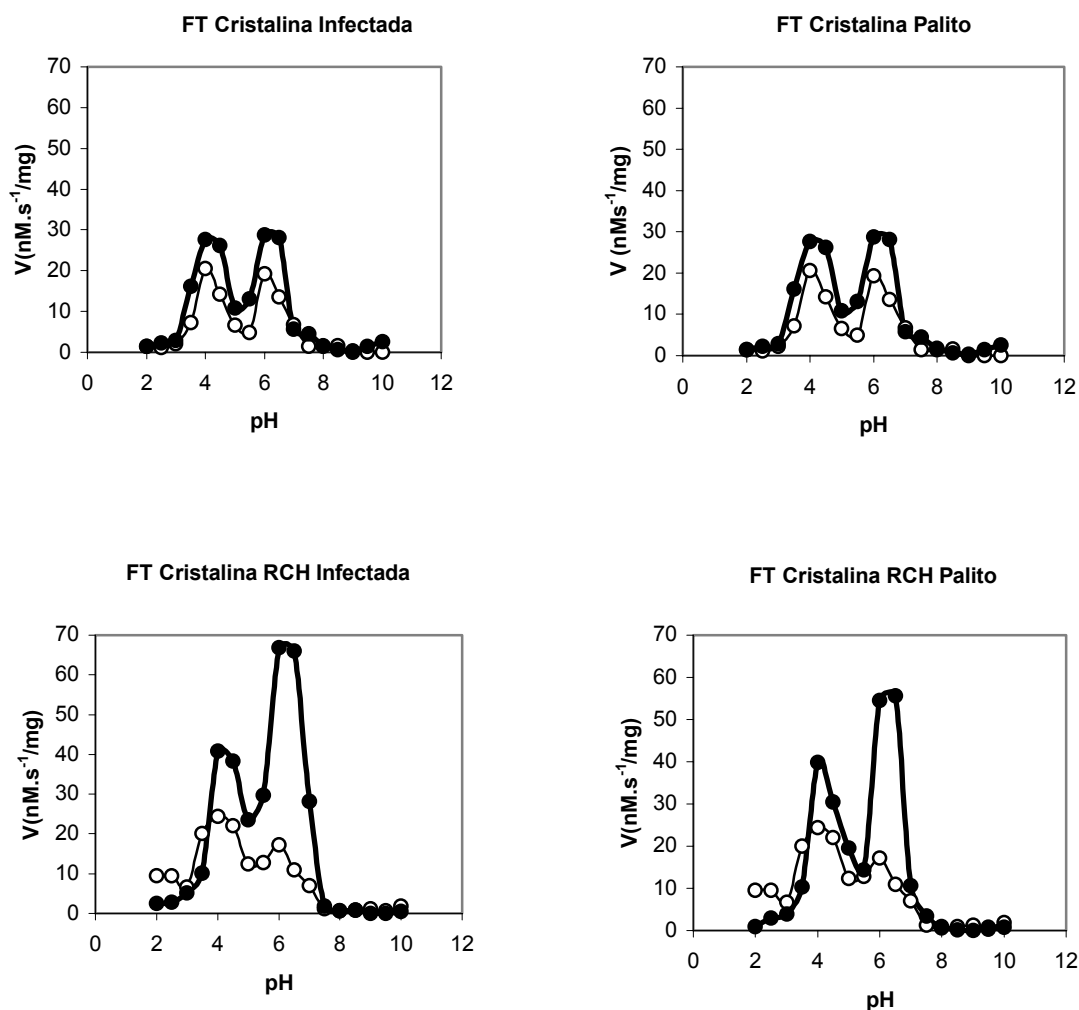


FIGURA 1 - Efeito do pH sobre a atividade específica, $V(\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ de proteína), de lipoxigenases de folhas de soja nos cultivares FT Cristalina e FT Cristalina RCH, infectadas pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25°C , nos tampões a 0,05 M, concentração de ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M, quantidade de extrato bruto, $1 \mu\text{L}$. Concentração de proteína solúvel para FT Cristalina infectada, FT Cristalina palito, FT Cristalina RCH infectada, FT Cristalina RCH palito, respectivamente: controles – 1,68; 1,79; 1,82; 1,80 mg/ml, tratamentos – 1,75; 1,80; 1,79; 1,83 mg/mL.

O fato de haver mais de um pico de atividade pode estar relacionado ao fato de que, na planta, essas enzimas encontram-se organizadas em uma grande família multigênica que pode resultar, em dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas lipoxigenases que diferem quanto à especificidade pelo substrato, parâmetros físico-químicos e cinéticos.

Estima-se que o genoma de soja contém de 10 a 12 genes que expressam lipoxigenases (Koetje e Grimes, 1992). Além disso, tem sido relatado que o nível de atividade de lipoxigenases presentes em um dado tecido pode variar como resposta fisiológica da planta a diferentes tipos de estresses.

Kato *et al.* (1993) mostraram que a expressão do gene de soja para LOX-4 aumenta em folha após a remoção do dreno reprodutivo. Bunker *et al.* (1995) observaram a indução à expressão de dois genes adicionais de lipoxigenases *lox A* e *vlx C* em folhas de soja após a remoção da vagem. Saravitz e Siedow (1996) obtiveram aumento de LOX-7 e LOX-8 após a injúria mecânica em folhas de soja. Portanto, tem sido demonstrado que a expressão de diferentes genes de lipoxigenases de soja tem sido induzida em folhas como resposta a diferentes estresses.

Os valores de atividade específica foram maiores nas plantas inoculadas com fungo e nas plantas injuriadas com o palito sem inóculo, que nos controles. De acordo com os resultados, pode-se inferir que ocorreu uma resposta da planta de soja ao ataque do patógeno e ao ferimento, mediante aumento da atividade de lipoxigenases.

Os dados apresentados estão dentro da faixa de pH ótimo descritas por outros autores: Minguez-Mosqueira *et al.* (1993), que relataram pH ótimo de lipoxigenases de pimentão em pH 5,0; Koch *et al.* (1992), que determinaram pH ótimo entre 6,4 e 7,2 em folhas de tomate inoculadas com *Pseudomonas syringae* e Lanna *et al.* (1996), que obtiveram valores de pH ótimo em 6,0 e 7,0 em folhas de soja.

O maior valor de atividade específica de lipoxigenases ocorreu a 25°C para ambos os cultivares (Figura 2). O pico a 25°C indica que não

há diferença de estabilidade térmica dentro das isoformas de lipoxigenases foliares de soja analisadas. Adicionalmente, verifica-se mais uma vez que a atividade específica foi maior em plantas inoculadas pelo patógeno e nas plantas injuriadas pelo palito, sugerindo, novamente, que ocorreu uma resposta da planta de soja pelo aumento da atividade das lipoxigenases. Esse mesmo valor de temperatura ótima foi obtido por Lanna *et al.* (1996), quando analisaram o *pool* de lipoxigenases em folhas de soja dos genótipos IAC 100 “Triplo Nulo”, IAC 100 e Cristalina, e por Vieira *et al.* (2001), analisando atividade de lipoxigenases foliares em plantas de soja submetidas a ferimento mecânico.

Parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 6,0, em tampão fosfato de sódio 50 mM e a 25°C. Esses valores de pH e temperatura foram os que apresentaram maiores valores de atividade em plantas inoculadas com o patógeno e injuriadas com o palito, ou seja, isoformas que apresentaram maiores respostas aos tratamentos. As lipoxigenases dos dois cultivares analisados apresentaram cinética de Michaelis-Menten em todos os tempos analisados, na faixa de concentração de substrato utilizada (dados não mostrados). A tabela 1 apresenta os valores de K_M _{app} (K_M aparente) e $V_{máxapp}$ ($V_{máx}$ aparente) para plantas submetidas à inoculação, à injúria e plantas sem injúria e inoculação (controle). Pode-se observar que nas plantas infectadas, tanto do cultivar FT-Cristalina como do cultivar FT-Cristalina RCH, os valores de K_M _{app} foram decrescendo com o tempo (horas) de tratamento, ou seja, diminuíram tanto nas plantas tratadas com palito quanto nas inoculadas com o fungo.

O valor numérico de K_M estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, ou seja, o K_M reflete o ambiente celular, a concentração do substrato normalmente encontrado *in vivo* pela enzima e a química da reação que está sendo catalisada. K_M é uma constante para uma dada enzima, isto é, seu valor

numérico fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes organismos, ou de diferentes tecidos do mesmo organismo, ou do mesmo tecido em diferentes estágios de desenvolvimento. Entretanto, V_{\max} não é uma constante cinética, ao passo que o K_M é; assim, a V_{\max} é um parâmetro cinético que depende da constante catalítica e da concentração da enzima pura no experimento. Assim, a constante de Michaelis indica a adequacidade relativa de substratos alternativos para uma determinada enzima, ou seja, o substrato com valor mais baixo de K_M tem uma afinidade

aparente maior para a enzima (Segel, 1975 e Lehninger *et al.*, 1995). Portanto, o decréscimo nos valores de $K_{M\ app}$ em plantas infectadas e injuriadas com o palito sugerem uma melhor adaptação do substrato ao centro ativo da enzima e, portanto, uma melhoria na eficiência da catálise das lipoxigenases. Além disso, os diferentes valores de $K_{M\ app}$ sugerem, também, alteração na composição do *pool* de lipoxigenases de plantas de soja dos dois cultivares em resposta à injúria e à infecção pelo patógeno causador do cancro-da-haste.

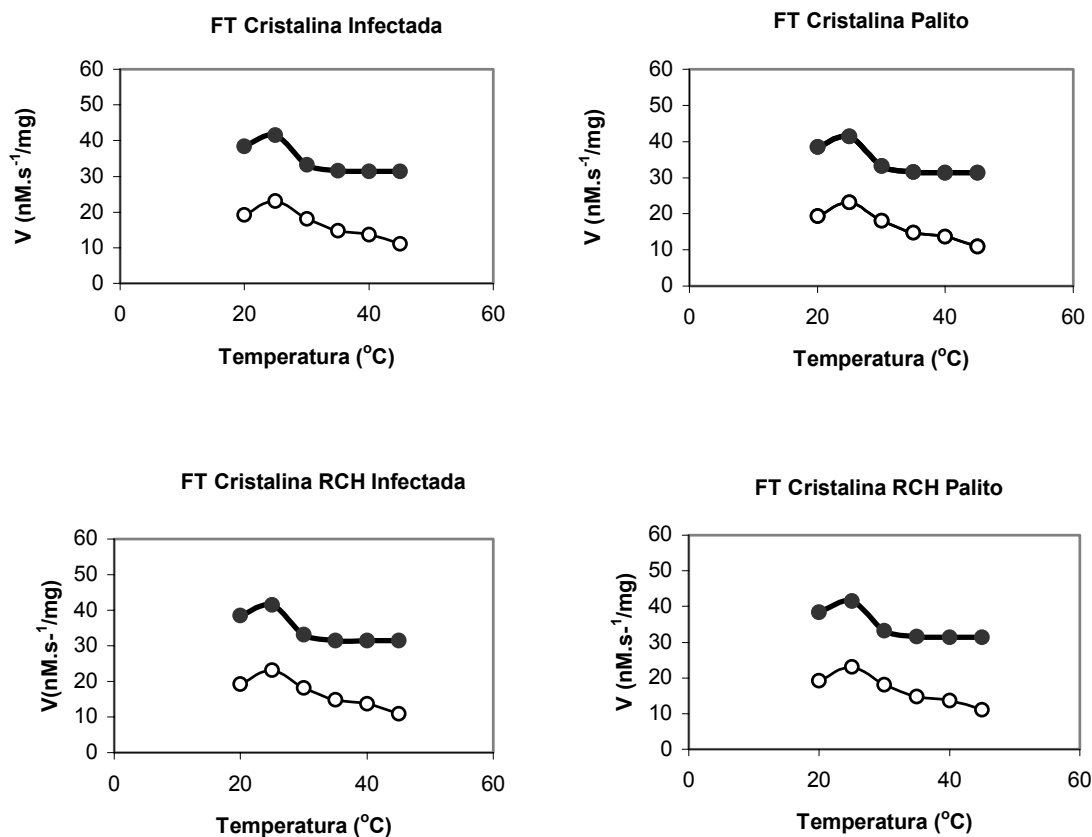


FIGURA 2 - Efeito da temperatura sobre a atividade específica, V (nM.s⁻¹/mg de proteína), de lipoxigenases de folhas de soja nos cultivares FT Cristalina e FT Cristalina RCH, infectadas pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*. Condições experimentais: enzima e substrato incubados a 25 °C, nos tampões a 0,05 M, concentração de ácido linoléico $4,0 \times 10^{-5}$ M, quantidade de extrato bruto, 1 μ L. Concentração de proteína solúvel para FT Cristalina infectada, FT Cristalina palito, FT Cristalina RCH infectada, FT Cristalina RCH palito, respectivamente: controles – 1,05; 1,10; 1,14; 1,12 mg/ml, tratamentos – 1,11; 1,15; 1,13; 1,17 mg/mL.

TABELA 1 - Parâmetros cinéticos de Lipoxigenases de folhas de soja dos cultivares FT Cristalina e FT Cristalina RCH, injuriadas pelo palito e infectadas pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*. (a)

Tempo Após Injúria (horas)	Parâmetros Cinéticos - FT Cristalina					
	Controle		Palito		Infectada	
	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)
0	260,05	145,84	280,43	151,54	258,15	155,29
24	282,37	151,83	285,56	146,42	260,00	145,44
48	278,56	168,92	263,00	120,12	163,37	52,34
96	262,23	120,05	251,17	118,21	158,52	51,55

Tempo Após Injúria (horas)	Parâmetros Cinéticos - FT Cristalina RCH					
	Controle		Palito		Infectada	
	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)	K_{mapp} (μM)	$V_{máxapp}$ ($nM.s^{-1}$)
0	378,78	214,95	355,40	177,93	320,47	177,90
24	392,42	227,96	338,61	163,37	321,92	137,76
48	380,67	170,20	203,22	80,55	198,63	73,03
96	379,92	223,46	148,15	50,35	122,97	84,66

a) Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 6,0 a 25 °C. Concentração de ácido linoléico 0,01 a 1,28 mM. Quantidade de extrato bruto 1 μL . Concentração média de proteína solúvel nos 24 extratos bruto próximo a 1,0 mg/mL.

Observa-se, ainda, uma melhoria na eficiência catalítica das lipoxigenases das plantas resistentes, FT-Cristalina RCH, uma vez que os valores de $K_{M\ app}$ foram ligeiramente menores do que na variedade FT-Cristalina, susceptíveis ao patógeno. Essa melhoria na eficiência catalítica poderá estar promovendo o aumento dos produtos da Via das Lipoxigenases, produtos esses inibidores de proteases e aldeídos que infere-se, são produzidos quando plantas são atacadas por fungos patogênicos (Vaughn e Gardner, 1993), insetos e protozoários (Croft *et al.*, 1993).

Determinação de inibidores de proteases

Como um dos produtos da Via das Lipoxigenases é o ácido jasmônico, sendo esse um sinalizador para ativação de genes que codificam inibidores de proteases, realizou-se a determinação

de inibidores de proteases, os quais foram expressos em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína (Tabela 2). Ocorreram aumentos significativos de inibidores de proteases nas plantas infectadas com o patógeno, tanto no cultivar FT Cristalina quanto no cultivar FT-Cristalina RCH. Porém, em ambos os cultivares, as plantas responderam com níveis mais altos de inibidores quando ocorreu ferimento em vez de infecção, isto é, a resposta mais pronunciada das plantas de soja foi observada no tratamento utilizando-se palito sem inóculo. Possivelmente esse efeito seja indireto, uma vez que pela Via das Lipoxigenases ocorre formação de ácido jasmônico e esse está envolvido na ativação de genes que expressam inibidores de proteases (Gardner, 1991 e Farmer e Ryan, 1992). Sugere-se, portanto, que o aumento no nível de inibidores de proteases foi causado em virtude, principalmente, da injúria

mecânica causada pelo palito. Vieira et al. (2001) obtiveram aumento dos níveis de inibidores de proteases em plantas de soja submetidas à injúria mecânica nas folhas.

Pautot et al. (1991), em estudos com expressão gênica de inibidores de proteases em tomate, citam que, contrariamente aos dados com ferimentos, a indução sistêmica de genes de inibidores de proteases é limitada durante a agressão por patógenos, porém constitui um dos componentes de resposta a esse tipo de ataque. Farmer e Ryan, (1992) também relatam aumento no nível de inibidores de proteases após submeter plantas de tomate à injúria mecânica.

Determinação dos níveis de hexanal e aldeídos totais

A Via das Lipoxigenases produz, como um dos principais produtos finais, aldeídos. Relatos têm mostrado que esses aldeídos causam efeito inibitório sobre o crescimento de patógenos. Assim, determinou-se a produção de hexanal e de aldeídos totais, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3. Os níveis de hexanal foram expressos por meio da área sob pico obtido pela cromatografia gasosa, e os níveis de aldeídos totais, expressos em absorbância a 635nm.

Em ambos os cultivares, FT-Cristalina e FT Cristalina RCH, não houve aumento significativo no conteúdo de hexanal em plantas tratadas a 5% de probabilidade. Observa-se também queda nos níveis de hexanal ao longo do tempo para as plantas-controles FT Cristalina e FT Cristalina RCH. Provavelmente, outros aldeídos, preferencialmente o hexanal, foram formados pela Via das Lipoxigenases. Segundo Croft et al. (1993), pela Via das Lipoxigenases ocorre produção de aldeídos de seis carbonos, como o trans-2-hexenal, componente característico do sabor e odor de frutos e folhas, além de outros compostos carbonílicos.

Com relação aos níveis de aldeídos totais, o cultivar FT-Cristalina apresentou diferença significativa, a 5% de probabilidade, nos tempos de 48 e 96 horas após tratamento, tanto para as plantas injuriadas com palito como para as inoculadas com o patógeno. No cultivar FT Cristalina RCH, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade entre os níveis de aldeídos totais de plantas-controle e plantas infectadas em todos os tempos analisados. Por esses resultados, sugere-se que diferentes formas de lipoxigenases estão atuando em ambos os cultivares analisados, tanto na planta infectada quanto na planta injuriada, por meio da produção de aldeídos.

TABELA 2 - Inibição de tripsina por extratos de folhas de soja dos cultivares FT Cristalina e FT Cristalina RCH, injuriadas pelo palito e infectadas pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula em cada linha e minúscula em cada coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tempo Após Injúria (horas)	Inibição de Tripsina (mg de Tripsina Inibida/g de Proteína)					
	FT Cristalina			FT Cristalina RCH		
	Controle	Palito	Infectada	Controle	Palito	Infectada
0	13,88 Db	102,65 Ac	27,35 Bb	13,64 CDa	22,79 Bc	16,65 Cb
24	5,33 Dc	10,30 Cd	6,14 Dc	12,61 Ca	68,27 Ab	17,58 Bb
48	17,54 Da	172,05 Aa	151,50 Ba	14,86 Da	173,67 Aa	48,50 Ca
96	20,74 Ca	141,89 Ab	30,97 Bb	11,07 Ea	18,86 CDc	14,55 DEb

TABELA 3 - Níveis de hexanal (área do pico) e aldeídos totais em folhas de soja dos cultivares FT Cristalina e FT Cristalina RCH, injuriadas pelo palito e infectadas pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. e Ell.) f. sp. *meridionalis*. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula em cada linha e minúscula em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tempo após Injúria (Horas)	Níveis de Hexanal ($\mu\text{V}\cdot\text{Min}^{-1}$)					
	FT Cristalina			FT Cristalina RCH		
	Controle	Palito	Infectada	Controle	Palito	Infectada
0	2412 Aa	2334 Aba	1971 Bb	2807 Aa	2468 Aa	2575 Aa
24	2026 Ab	1407 Dbc	2575 Aa	2575 Aa	2095 Bab	1919 Bb
48	1477 BCc	1183 Ec	1919 Bb	1919 Bb	1555 Bc	1212 Dec
96	1542 Cc	1688 BCb	1212 Dec	1212 Dec	1707 BCbc	1603 Cbc

Tempo após Injúria (horas)	Níveis de Aldeídos Totais (A_{635})					
	FT Cristalina			FT Cristalina RCH		
	Controle	Palito	Infectada	Controle	Palito	Infectada
0	0,9687 ABCa	0,9289 Ca	0,9395 BCc	1,0220 Aa	1,0112 Aba	1,0218Aa
24	0,9579 Bca	0,9332 Ca	0,9638 BCbc	1,0117 Aba	1,0196 Aa	0,9769 ABCa
48	0,9223 BCb	0,8791 Cb	0,9798 Ab	0,9784 Aba	1,0212 Aa	1,0005 Aa
96	0,8670 Cc	0,9519 Ba	1,0208 Aa	0,9795 ABa	0,9948 ABa	1,0117 Aa

Pelos resultados dos parâmetros bioquímico e cinéticos de lipoxigenases, assim como pelos produtos da via, verifica-se que ocorreu resposta das plantas das variedades FT Cristalina e FT Cristalina RCH, tanto nas plantas inoculadas com o patógeno quanto nas submetidas à injúria com palito sem o inóculo. Possivelmente o mecanismo de resistência ao patógeno não esteja envolvido diretamente com a Via das Lipoxigenases, uma vez que o efeito da injúria foi bastante marcante. Entretanto, os parâmetros bioquímicos e cinéticos sugerem uma resposta das plantas de soja através das Via das Lipoxigenases

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J.M.; SILATRO, S.R.; KLAUER, S.F.; FRANCESCHI, V.R. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, 62:45-52, 1989.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxigenases from soybeans. **Methods Enzymol**, 71:441-451, 1981.
- BELL, E.; MULLET, J.E. Characterization of an arabidopsis lipoxigenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiol**, 103:1133-1137, 1993.
- BOHLAND, C.; BALKENHOHL, T.; LOERS G.; FEUSSNER I.; GRAMBOW, H.J. Differential induction of lipoxigenases isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligossaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiol**, 114:679-685, 1997.

- BUNKER, T.W.; KOETJE, D.S.; STEPHENSON, L.C.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxigenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, 7:1319-1331, 1995.
- CHRISTOPHER, J.P.; PISTORIOUS, E.K.; AXELROD, B. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxigenase. **Biochem Biophys Acta**, v.284, p.54-62, 1972.
- CROFT, K.P.C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the lipoxigenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiol**, 101:13-24, 1993.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Recomendações Técnicas para a Cultura da Soja na Região Central do Brasil 2000/01**. Londrina, 2000. 245p.
- 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.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTOON, J.S. Stages development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, 11:91-93, 1971.
- FIDANTSEF, A.L.; BOSTOCK, R.M. Characterization of potato tuber lipoxigenase cDNAs and lipoxigenase expression in potato tubers and leaves. **Physiologia Plantarum**, 102:257-271, 1998.
- GARDNER, H.W. Recent investigation into the lipoxigenase pathway of plants. **Biochem Phys Acta**, 1084:221-239, 1991.
- HEITZ, T.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxigenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiol**, 114:1085-1093, 1997.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxigenases. **Physiologia Plantarum**, 76:249-253, 1989.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, 51:376-382, 1974.
- KATO, T.; SHIRANO, Y.; IWAMOTO, H.; SHIBATA, D. Soybean lipoxigenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissue: expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant Cell Physiol**, 34:1063-1072, 1993.
- KOCH, E.; MEIER, B.M.; EIBEN, H.G.; SLUSARENKO, A. A lipoxigenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonas*. **Plant Physiol**, 9:571-576, 1992.
- KOETJE, D.S.; GRIMES, H.D. Molecular characterization of *loxN*, a nitrogen-responsive lipoxigenase gene of soybeans. **Plant Physiol**, abstract 484, 99:S-81, 1992.
- LANNA, A.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxigenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxigenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 8:87-92, 1996.
- LEATHERBARROW, R.J. **Enziffiter manual**. London: Biosoft., p.13-42, 1987.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Editora Sarvier, 1995. 839p.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K.; SIEDOW, J.N. Lipoxigenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics Biolog Medi Resear**, 13:127-54, 1987.
- MELAN, M.A.; DONG, X.; ENDARA, M.E.; DAVIS, K.R.; AUSUBEL, F.M.; PETERMAN, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxigenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol**, 101:441-450, 1993.

- MINGUEZ-MOSQUEIRA, M.I.; JARENGALAN, M.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. **Phytochemistry**, 32:1103-1108, 1993.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant Cell Physiol.**, 22:911-918, 1986.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiol**, 114:1161-1167, 1997.
- PARK, T.K.; HOLLAND, M.A.; LASKEY, J.G.; POLACCO, J.C. Germination-associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, 96:109-117, 1994.
- PAUTOT, V.; HOLZER, F.M.; WALLING, L.L. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 4:284-292, 1991.
- ROUET-MAYER, M.; BUREAU, J.; LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiol**, 98:971-978, 1992.
- SANTOS, I.C.; REIS, W.J.P.; MOREIRA, M.A.; REZENDE, S.T.; ROCHA, V.S.; SEDIYAMA, C.S. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. **Revista Ceres**, 40:438-444, 1993.
- SARAVITZ, D.M.; SIEDOW, J.N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiol**, 110:287-299, 1996.
- SEGEL, I.H. Enzyme kinetics. **John Wiley e Sons**, New York, 1975. 957p.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol**, 42:145-188, 1991.
- SILVA, M.D. **Avaliação bioquímica da Via das Lipoxigenases em plantas de soja infectadas com cancro da haste**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 43p. Tese de Mestrado.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 15:76-85, 1985.
- STEPHENSON, L.C.; BUNKER, T.W.; DUBBS, W.E.; GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol**, 116:923-933, 1998.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRAND, D.F.; GRIMES, H.D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **Plant Cell**, 3:973-987, 1991.
- UTUMI, M.M.; BARROS, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; SEDIYAMO, C.S.; MOREIRA, M.A. Efeito da eliminação genética de lipoxigenases e de polipeptídeos de reserva na qualidade da proteína da soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 10:203-212, 1998.
- VAUGHN, S.F.; GARDNER, H.W. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. **J. Chem. Ecol**, 19:2337-2345, 1993.
- VICK, B.; ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. (Eds.) **The Biochemistry of Plants**. Orlando: Academic Press, 9:53-97, 1987.
- VIEIRA, A.A. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 13:5-12, 2001.
- YORINORI, J.T. Metodologia de produção de *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. **Fitopatologia Brasileira**, 20: 276-277, 1995. Suplemento.

