

FUNÇÃO FISIOLÓGICA DE LIPOXIGENASES DE FOLHAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ATAQUE DE LAGARTA (*ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER.)

F.B. Silva¹, M.G. de A. Oliveira², R.B. Batista¹, C.V. Pires¹, L.P. Xavier¹,
N.D. Piovesan¹, J.A. de Oliveira¹, I.C. José¹, M.A. Moreira¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar se a “Via das Lipoxigenases” está envolvida no mecanismo de resposta da planta de soja ao ataque por lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner – inseto mastigador). Para isto, foi realizada a caracterização bioquímica e cinética do *pool* de lipoxigenases, cultivar IAC-100 (presença de lipoxigenases na semente) e genótipo IAC-100 TN (ausência de lipoxigenases na semente), bem como a determinação dos produtos finais da via. Os valores de K_{Mapp} decresceram até 48 horas, após a remoção do inseto, e os níveis de inibidores de proteases, aldeídos totais e hexanal, produtos finais da via, aumentaram. Esses dados sugerem alterações do *pool* das lipoxigenases e ativação dessas isoenzimas, em resposta ao ataque de lagarta-da-soja. Adicionalmente, foi verificado que a remoção genética de lipoxigenases das sementes não influenciou na expressão dessas isoenzimas em folhas.

PALAVRAS-CHAVE: Soja, “Via das Lipoxigenases”, inibidores de proteases, mecanismo de defesa.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF SOYBEAN LEAVES LIPOXYGENASES SUBMITTED TO ATTACK BY VELVET CATERPILLAR (*ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER.). The objective of this work was to investigate the role of the “Lipoxygenases Pathway” in the mechanisms of response of the soybean plant subjected to attack of velvet caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner - chewing insect). For this, the biochemical and kinetic characterization of the lipoxygenases pool was undertaken, cultivar IAC-100 (normal soybean cultivar) and the genotype IAC-100 TN (absence of seed lipoxygenase), as well as the determination of the final products of that pathway. The values of K_{Mapp} decreased up to 48 hours, after the removal of the insect, and the levels of proteases inhibitors, total aldehydes and hexanal, final products of the pathway, increased. Those data suggest alterations of the pool of the lipoxygenases and activation of those isozymes, in response to the attack of velvetbean caterpillar. In addition, it was verified that the genetic removal of lipoxygenases from the seeds has not changed the expression of these isozymes in the leaves which act on the defense mechanism of the soybean plant.

KEY WORDS: Soybean, “Lipoxygenase Pathway”, inhibitors proteases, defense mechanisms.

INTRODUÇÃO

A soja constitui um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país, sendo cultivada praticamente em todo o território nacional. Com a ampliação da área de soja plantada, problemas como perdas decorrentes do ataque de insetos-praga tendem a se agravar. Dentre aqueles que trazem consequências econômicas mais significativas na soja

destacam-se a lagarta-da-soja (desfolhadora) e os percevejos (sugadores).

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga desfolhadora bastante problemática em culturas brasileiras. Mesmo em baixas densidades populacionais, este inseto causa grandes danos à lavoura de soja, que vai desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A lagarta-da-soja é um inseto mastigador e se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida,

²Autor para correspondência: Inst. de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: malmeida@mail.ufv.br

ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. Quando se alimentam, além de remover nutrientes, as lagartas injetam toxinas na planta.

No sistema de interação planta-inseto, as plantas têm utilizado diversos mecanismos de defesa, os quais incluem a "Via das Lipoxigenases", relacionada com o aumento da expressão diferencial de genes de defesa da planta ao ataque de insetos, principalmente àqueles que expressam para inibidores de proteases. HILDER *et al.* (1987) sugerem o envolvimento de inibidores de proteases na proteção de plantas contra predação de Lepidoptera.

Lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoreductase, EC 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, produzindo hidroperóxidos de ácidos graxos (HILDEBRAND *et al.*, 1988). Os hidroperóxidos são seqüencialmente metabolizados e formam várias substâncias com atividades fisiológicas pronunciadas (KOCK *et al.*, 1992), as quais incluem aldeídos (CROFT *et al.*, 1993; PARÉ & TUMLINSON, 1997) e ácido jasmônico. Este último está envolvido na indução dos genes que expressam para

inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; CREELMAN *et al.*, 1992).

Aumento na expressão de lipoxigenases tem sido detectado, em plantas, durante ou após uma variedade de estresses, incluindo ataque por insetos (HILDEBRAND *et al.*, 1989), infecção por patógenos (MELAN *et al.*, 1993), ferimento mecânico (VIEIRA *et al.*, 2001) e em processos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento, senescência, armazenamento temporário de nitrogênio e biossíntese de moléculas regulatórias (HILDEBRAND *et al.*, 1989; CREELMAN & MULLET, 1997; FEUSSNER *et al.*, 1995).

As lipoxigenases de sementes de soja afetam as propriedades e a qualidade de produtos alimentícios derivados, particularmente, pela participação na formação de compostos responsáveis pelo sabor indesejável, característico desses produtos. A eliminação genética de lipoxigenases de sementes de soja é, sem dúvida, uma das melhores alternativas para a eliminação do sabor característico da soja, desde que esta manipulação genética não altere a composição e, em conseqüência, as funções fisiológicas das lipoxigenases presentes nas folhas; tendo em vista sua participação nos mecanismos de defesa da planta a insetos e patógenos. Assim, foi utilizada uma cultivar (IAC-

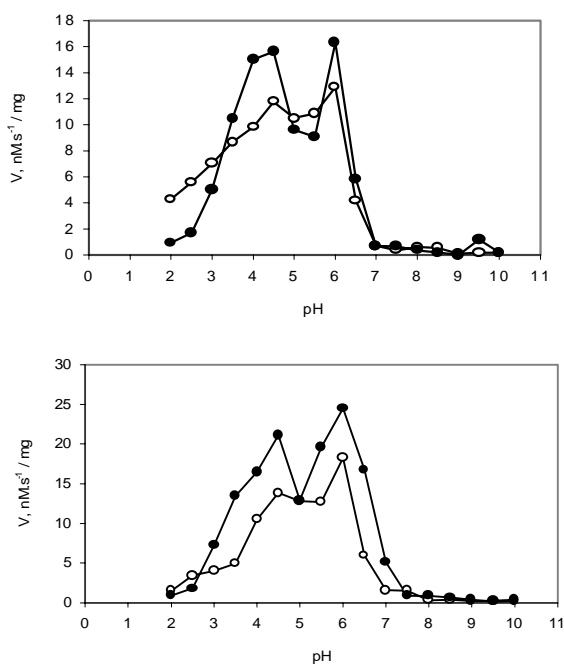


Fig. 1 – Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da cultivar IAC-100 (A) e do genótipo IAC-100 TN (B). Foliolos da primeira folha trifoliolar coletados 48 horas após remoção do inseto, a vários valores de pH. (●—●) representa a atividade específica do pool de lipoxigenases foliares das plantas atacadas por lagarta-da-soja. (○—○) representa a atividade específica do pool de lipoxigenases foliares das plantas controle.

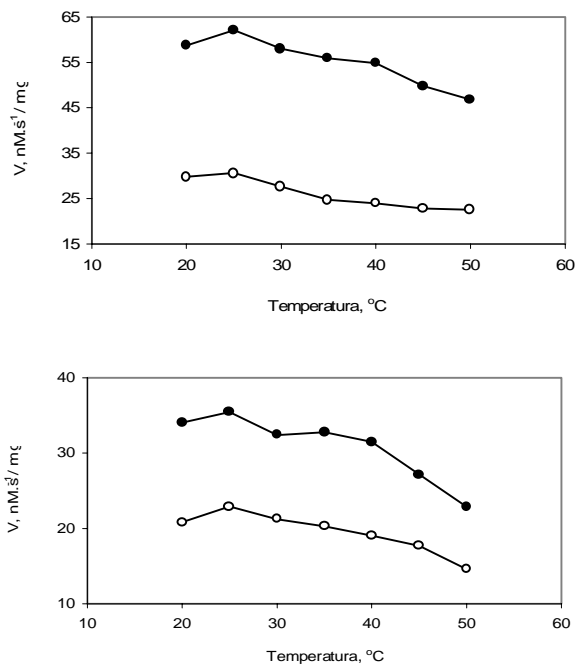


Fig. 2 – Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja da cultivar IAC-100 (A) e do genótipo IAC-100 TN (B). Foliolos da primeira folha trifoliolar coletados 48 horas após a retirada do inseto, a vários valores de temperatura. (●—●) representa a atividade específica do pool de lipoxigenases foliares das plantas atacadas por lagarta-da-soja. (○—○) representa a atividade específica do pool de lipoxigenases foliares das plantas controle.

100), contendo as três lipoxigenases nas sementes e a isolinha IAC-100 TN, modificada geneticamente, apresentando ausência completa das lipoxigenases das sementes.

A caracterização bioquímica e cinética das isoenzimas lipoxigenases, após ataque por lagarta-da-soja, em especial daquelas presentes em folhas, pode auxiliar na elucidação das funções bioquímico-genética e fisiológica dessas isoenzimas no sistema de defesa de plantas a insetos e na regulação do metabolismo vegetal pela "Via das Lipoxigenases".

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max*(L.) Merrill) da cultivar IAC-100, com lipoxigenases nas sementes e do genótipo sem lipoxigenases nas sementes (IAC-100 TN). O genótipo IAC-100 TN, desenvolvido pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, é uma linhagem avançada obtida a partir da cultivar IAC-100 que se encontra no primeiro ciclo de retrocruzamentos. A alta similaridade genética entre IAC-100 e IAC-100 TN foi confirmada por meio de análise de DNA, utilizando-se marcadores moleculares do tipo RAPD "Random Amplified

Polymorphic DNA" e, também, através de características fenotípicas. As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 4,0 kg de solo, sob condições de casa de vegetação.

A fonte de enzimas foi a primeira folha trifoliolar de plantas de soja no estágio vegetativo V3 de desenvolvimento (FEHR & CAVINESS, 1977). Os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C .

As plantas foram colocadas em gaiolas de filó e submetidas a uma população de lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). Após 6, 12 e 24 horas de ataque, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados para posterior obtenção de extratos foliares. Após estes tempos, as lagartas foram retiradas das plantas e o mesmo procedimento de coleta foi efetuado nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas após a retirada dos insetos.

O preparo do extrato bruto foliar nos testes e respectivos controles foi realizado de acordo com o método de OTHA *et al.* (1986). A determinação de proteínas totais, no extrato bruto, foi realizada de acordo com o método de SMITH *et al.* (1985).

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por AXELROD *et al.* (1981). O método baseia-se no aumento

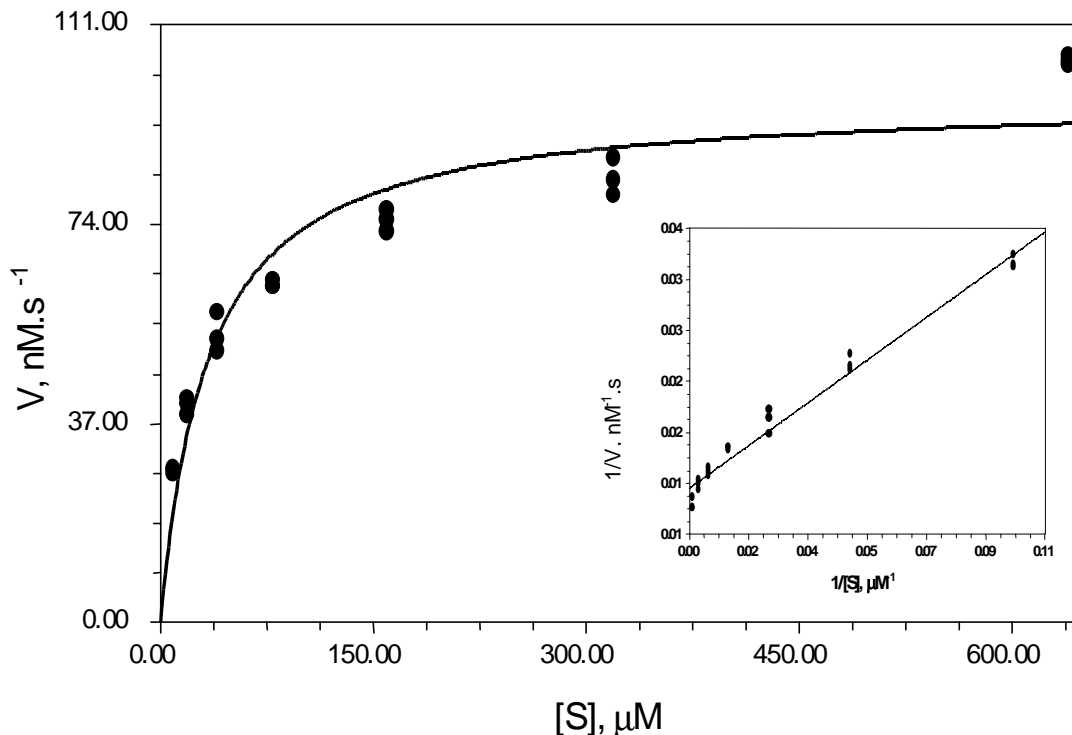


Fig. 3 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas controles da cultivar IAC-100, folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 horas após a retirada do inseto (lagarta-da-soja). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,0, a 25°C . Concentração do ácido linoléico $0,01\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0,64\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Quantidade de extrato bruto: 1mL. Concentração de proteína total no extrato bruto: $1,13\text{mg}/\text{mL}$. A linha contínua foi traçada baseada em dados teóricos utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_{Mapp} e $V_{\text{max app}}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

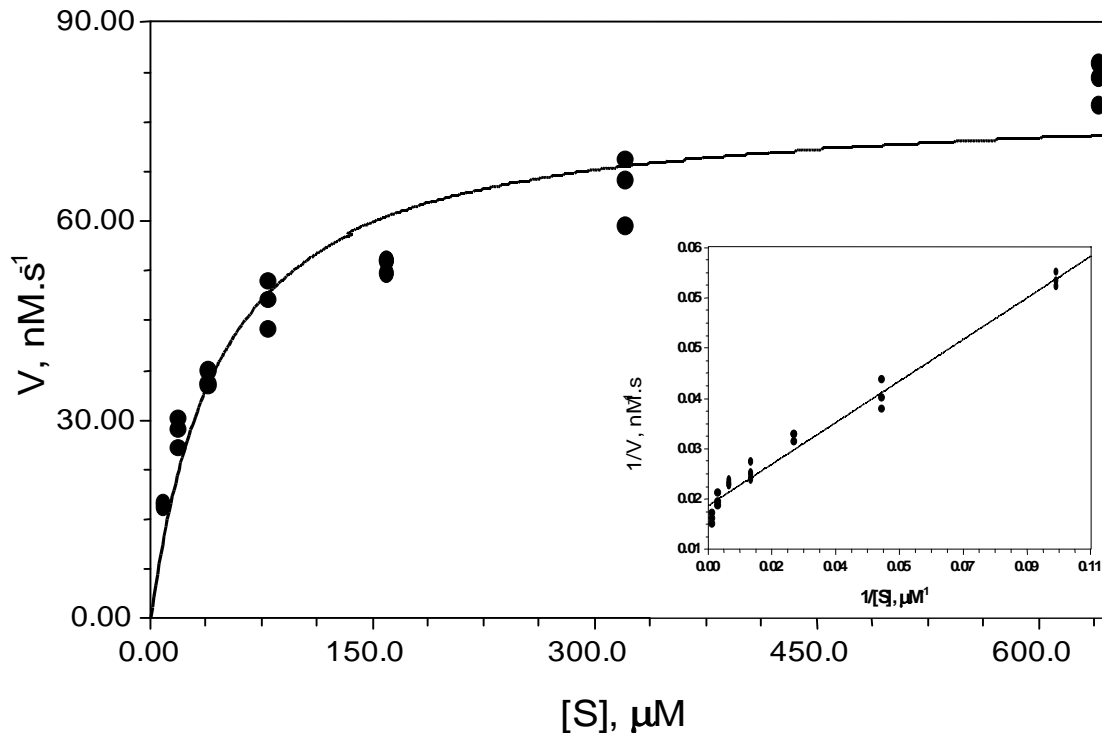


Fig. 4 - Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelas lipoxigenases de folhas de plantas controles do genótipo IAC-100 TN, folíolos da primeira folha trifoliolar no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 horas após a retirada do inseto (lagarta-da-soja) - controle (folíolos da primeira folha trifoliolar). Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0, a 25 °C. Concentração do ácido linoléico 0,01 mmol.L⁻¹ a 0,64 mmol.L⁻¹. Quantidade de extrato bruto: 1mL. Concentração de proteína total no extrato bruto: 1,13 mg/mL. A linha contínua foi traçada baseada em dados teóricos utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de K_{Mapp} e $V_{max app}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk

da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Para determinação do pH, ótimo os seguintes sistemas-tampão foram usados: ácido cítrico/fosfato dissódico (pH 2,0-2,5); ácido cítrico/citrato de sódio (pH 3,0-3,5); ácido acético/acetato de sódio (pH 4,0-4,5); ácido cítrico/citrato de sódio (pH 5,0-5,5); monofosfato/fosfato dissódico (pH 6,0-7,0); Tris-HCl (pH 7,5-8,5) e ácido bórico/borato de sódio (pH 9,0-10,0), na concentração de 50 mmol.L⁻¹. A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por um período de 2,5 minutos, a 25 °C.

Para determinação da temperatura ótima, foi utilizado banho-maria bem como espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C.

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

A determinação de inibidores de proteases foi realizada baseada na inibição da atividade da tripsina utilizando-se D,L-BAPNA como substrato. Os resul-

tados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína de acordo com o método de KAKADE *et al.* (1974).

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

Os valores de pH ótimo, para o pool de lipoxigenases foliares, foram 4,5 e 6,0, para os dois genótipos analisados e seus respectivos controles (Fig. 1). No perfil de pH, a atividade específica de lipoxigenases apresentou-se maior nas plantas submetidas ao ataque por lagarta da soja, sugerindo ocorrer ativação das lipoxigenases foliares como consequência do estresse. Esses resultados estão de acordo com KATO *et al.* (1993); LANNA *et al.* (1996) e VIEIRA *et al.* (2001), cujos estudos foram realizados com soja. Em outras culturas também pode-se verificar que a faixa de pH ótimo

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos do pool de lipoxigenases de plantas de soja, obtidos a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar, coletados 6, 12 e 24 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	K_{Mapp} (mmol.L ⁻¹)	$V_{máx\ app}$ (nmol.L ⁻¹ .s ⁻¹)	K_{Mapp} (mmol.L ⁻¹)	$V_{máx\ app}$ (nmol.L ⁻¹ .s ⁻¹)
	122,47 (Controle)	227,70 (Controle)	116,74 (Controle)	112,22 (Controle)
Em presença do inseto				
6	105,7150	217,4070	118,1620	280,6000
12	101,1060	134,6990	112,5050	167,6710
24	94,0622	228,6910	92,4810	176,5040
Após remoção do inseto				
6	66,3952	121,6390	65,2444	106,1270
12	46,9640	115,8350	48,5869	116,3663
24	46,8881	81,1135	45,0425	77,1612
48	31,5046	95,6214	32,9958	68,1459

Tabela 2 – Inibição de tripsina por inibidores de proteases, obtidos a partir do extrato bruto dos folíolos da primeira folha trifoliolar coletados 6, 12 e 24 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	Inibição triptica (mg tripsina inibida.g ⁻¹ de proteína)			
	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	lagarta	Controle	lagarta
Em presença do inseto				
6	8,35 ± 0,85	24,71 ± 0,87	3,38 ± 0,25	43,01 ± 7,42
12	32,19 ± 12,37	48,94 ± 1,37	10,53 ± 3,84	40,18 ± 10,58
24	27,97 ± 2,99	30,47 ± 0,52	13,59 ± 4,94	17,57 ± 0,62
Após remoção do inseto				
6	12,14 ± 3,08	95,26 ± 3,01	13,26 ± 2,80	16,15 ± 2,63
12	32,35 ± 4,79	87,67 ± 0,035	14,48 ± 0,95	16,90 ± 3,01
24	57,69 ± 15,13	91,06 ± 2,16	4,36 ± 1,15	20,44 ± 0,97
48	76,20 ± 6,91	156,81 ± 9,77	48,42 ± 1,32	97,23 ± 0,53

^{IV}valores são a média das análises de três repetições ± desvio padrão.

é muito semelhante: REDGEL *et al.* (1995) em sementes de ervilha, pH ótimo 6,8; AVDIUSHKO *et al.* (1994) em pepino, pH ótimo 5,0; MINGUES-MOSQUEIRA *et al.* (1993) em pimentão, pH ótimo 6,5; KOCK *et al.* (1992) em folhas de tomate inoculadas com *Pseudomonas*, pH ótimo entre 6,4 e 7,2; LEONI *et al.* (1985) em sementes de girassol, pH ótimo 6,2; e GALLIARD & PHILLIPS (1971) em tubérculos de batata, pH 5,5–6,0.

Opico de atividade de lipoxigenase mais acentuado foi observado a 25 °C para os dois genótipos e seus respectivos controles (Fig. 2). Além disso, os valores de atividade específica apresentaram-se maiores nas plantas atacadas pela lagarta quando comparados aos valores obtidos nas plantas controle. Esses resultados novamente sugerem que um dos mecanismos

de resposta da planta de soja ao ataque da lagarta seja a ativação da “Via das Lipoxigenases”.

Os dados estão de acordo com os resultados obtidos por LANNA *et al.* (1996) para lipoxigenases foliares de soja no estágio V4 de desenvolvimento dos genótipos IAC-100, UFV-TN e Cristalina e também com os dados obtidos por VIEIRA *et al.* (2001) para lipoxigenases foliares de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, de plantas da cultivar IAC-100 e da linhagem IAC-100 TN, submetidas a fermento mecânico, onde apresentaram pico de atividade a 25 °C.

Ambos os genótipos apresentaram gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que o *pool* de lipoxigenases de folhas de soja, submetidas ao ataque da lagarta-da-soja, seguem a cinética

Tabela 3 – Níveis de hexanal em plantas de soja, obtidos a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar coletados 6, 12 e 24 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	Níveis de hexanal ($\mu\text{volts}\cdot\text{min}^{-1}$)			
	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	lagarta	Controle	lagarta
Em presença do inseto				
6	1266,00 \pm 50,58	1282,33 \pm 177,12	577,00 \pm 84,97	628,00 \pm 90,47
12	1349,67 \pm 115,13	1458,00 \pm 138,74	550,67 \pm 40,66	746,33 \pm 174,62
24	1235,67 \pm 91,95	1366,67 \pm 180,55	597,00 \pm 90,88	834,00 \pm 108,22
Após remoção do inseto				
6	1359,67 \pm 89,38	1520,00 \pm 89,34	590,26 \pm 114,95	772,33 \pm 166,61
12	1367,00 \pm 21,65	1687,67 \pm 186,23	728,33 \pm 27,63	932,00 \pm 68,63
24	1106,67 \pm 122,58	1362,00 \pm 33,15	578,00 \pm 154,44	584,00 \pm 89,23
48	1109,00 \pm 33,51	1500,00 \pm 118,19	605,00 \pm 60,41	784,67 \pm 46,45

¹Valores são a média das análises de três repetições \pm desvio padrão.

Quantidade de folhas liofilizadas: 50,0 mg. Tampão de Extração: Fosfato De Sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0.

Tabela 4 – Níveis de aldeídos totais em plantas de soja, obtidos a partir dos folíolos da primeira folha trifoliolar coletados 6, 12 e 24 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	Níveis de aldeídos totais (A_{635})			
	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	lagarta	Controle	lagarta
Em presença do inseto				
6	0,77 \pm 0,06	0,78 \pm 0,05	0,89 \pm 0,01	0,88 \pm 0,02
12	0,75 \pm 0,05	0,85 \pm 0,02	0,83 \pm 0,01	0,89 \pm 0,03
24	0,77 \pm 0,04	0,91 \pm 0,07	0,91 \pm 0,01	0,86 \pm 0,02
Após remoção do inseto				
6	0,78 \pm 0,01	0,97 \pm 0,005	0,85 \pm 0,01	0,76 \pm 0,03
12	0,84 \pm 0,01	0,80 \pm 0,03	0,97 \pm 0,01	0,84 \pm 0,02
24	0,88 \pm 0,01	0,87 \pm 0,05	0,99 \pm 0,01	0,79 \pm 0,01
48	0,83 \pm 0,01	0,87 \pm 0,005	1,02 \pm 0,02	0,85 \pm 0,02

¹Valores são a média das análises de três repetições \pm desvio padrão.

Solução de extração: etanol 2%. Quantidade de Extrato: 50 μL .

de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada (Figs. 3 e 4). Os valores de K_{Mapp} determinados a 6, 12 e 24 horas em presença do inseto, apresentaram-se menores do que os respectivos controles; além disso, os valores de K_{Mapp} decresceram, para ambos os genótipos, com o tempo de ataque do inseto à planta (Tabela 1). Esses resultados indicam uma mudança no *pool* de isoenzimas lipoxigenases quando as plantas são atacada pelas lagartas, aumentando a eficiência catalítica através da diminuição nos valores de K_{Mapp} , consequentemente, respondendo mais acentuadamente ao estresse.

Após a retirada do inseto da planta de soja, os valores de K_{Mapp} das lipoxigenases continuaram diminuindo, em ambos os genótipos. Os dados sugerem que a planta continuou respondendo ao ataque de lagarta-da-soja, através da “Via das Lipoxigenases”, até 48 horas após remoção do inseto.

A pequena diferença nos valores de K_{Mapp} entre os dois genótipos indica que a remoção genética das lipoxigenases de sementes, com o propósito de aumentar a aceitabilidade da soja na dieta alimentar, não alterou a expressão das lipoxigenases foliares.

Vários trabalhos têm demonstrado que plantas de soja respondem a diferentes estresses bióticos e abióticos, incluindo ataque de insetos, com aumento da atividade de lipoxigenases e da síntese de inibidores de proteases em suas folhas. Esses resultados também foram observados nesse experimento, em que ocorreu aumento da produção de inibidores de proteases, nos dois genótipos e em todos os tempos analisados, tanto durante a presença do inseto na planta quanto após a sua remoção (Tabela 2).

Esses resultados, juntamente com os dados de parâmetro cinético, indicam ativação da “Via das Lipoxigenases”, provavelmente, através do aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e concomitante ação da hidroperóxido ciclase. Esta catalisa a formação do ácido 12-oxo-fitodienóico e, posteriormente, ácido jasmônico, tendo como substrato hidroperóxido de ácidos graxos, produzidos pela ação das lipoxigenases. O ácido jasmônico é considerado um regulador do crescimento e está envolvido na transdução de sinais em resposta ao estresse vegetal. Especificamente, ele interage com um receptor na membrana plasmática para ativar a expressão de genes que codificam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992).

Resultados similares foram encontrados por GREEN & RYAN (1972), os quais mostraram que ferimentos em folhas de batata ou folhas de tomate pelo *Leptinotarsa decemlineata* ou suas larvas, induzem a um rápido acúmulo de inibidores de proteases por todos os tecidos aéreos da plantas. TAYLOR & LEE (1997) também sugerem que os inibidores de proteases atuam na proteção de plantas contra Lepidoptera. Assim, inibidores de proteases em plantas mostram afetar o desenvolvimento de vários herbívoros (PEÑA-CORTÉS *et al.*, 1993; JONGSMA *et al.*, 1994; HILDER *et al.*, 1987)

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a hipótese de que o acúmulo de inibidores de proteases em resposta ao ataque de herbívoros seja, provavelmente, um mecanismo de resposta da planta a inseto.

Como um dos caminhos da “Via das Lipoxigenases” pode produzir aldeídos, foi realizada a determinação dos níveis de hexanal e aldeídos totais, pela ação da hidroperóxido liase. Nos dois genótipos estudados, ocorreu aumento pouco pronunciado nos níveis de hexanal e aldeídos totais em todos os tempos analisados (Tabela 3 e 4). Os resultados sugerem que a planta de soja, em resposta ao ataque de lagarta-da-soja, ative a “Via das Lipoxigenases” e, após a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos, o metabolismo segue preferencialmente o caminho da hidroperóxido ciclase, com produção de ácido jasmônico e subsequente ativação e expressão de

genes que codificam inibidores de proteases, do que o caminho da hidroperóxido liase com produção de aldeídos. Adicionalmente observa-se que a remoção genética de lipoxigenases das sementes não influenciou na expressão dessas isoenzimas em folhas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVDIUSHIKO, S.A.; YE, X.S.; KUE, J.; HILDEBRAND, D.F. Lipoxigenase is an abundant protein in cucumber exudates. *Planta*, v.193, p.349-357, 1994.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxigenases from soybeans. *Methods Enzymol.*, v.71, p.441-451, 1981.
- CREELMAN, R.A., BELL, E.; MULLET, J. E. Involvement lipoxigenase like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.*, v.99, p.1258-1260, 1992.
- CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Annu. Rev Plant Mol. Biol.*, v.48, p.355-381, 1997.
- 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 Physio.*, v.101, p.13-24, 1993.
- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the syntesis of wounding inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, v.4, p.129-134, 1992.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. *Iowa State Univ. Coop. Ext. Serv. Spec. Rep.*, n. 80, p.1-11, 1977.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C.; KINDL, H.; KÜHN, H. Lipoxigenase-catalized oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.11849-11853, 1995.
- GALLIARD, T. & PHILLIPS, D.R. Lipoxigenases from potato tubers. Partial purification and properties of na enzyme that specifically oxygenates the 9-positon of linoleic acid. *Biochemistry J.*, v.124, p.431-438, 1971.
- GREEN, T.R. & RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, v.175, p.776-777, 1972.
- HILDEBRAND, D.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S.; BOOKJANS, G. Plant lipoxigenase: occurrence, properties and possible functions. *Curr. Top. Plants Biochem. Physiol.*, v.7, p.201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D.F.; RODRIGUES, J.G.; LEGG C.S.; BROWN, G.C.; BOOKJANS, G. The effects of wounding and mite infestation on soybean leaf lipoxigenase levels. *Z. Naturforsch.*, v.44c, p.655-659, 1989.

- HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, v.300, p.160-163, 1987.
- JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; VISSER, B.; STIEKEMA, W. J. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta*, v.195, p.29-35, 1994.
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.*, v.51, p.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*, Kyoto, v.34, n.7, p.1063-1072, 1993.
- KOCK, E.; MEIER, B.; EIBEN, H.-G.; SLUSARENKO, A. A lipoxigenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiol.*, v.99, p.571-576, 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. *Braz. Plant Physiol.*, v.8, n.2, p.87-92, 1996.
- LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxigenase in germinating sunflower seeds. *Food Sci.*, v.50, p.88-92, 1985.
- LEATHERBARROW, R. J. *Enziffiter manual*. Biosof: London, 1987. p. 13-42.
- MELAN, M. A.; DONG, X.; ENDARA, M. E.; DAVIS, K. R.; AUSUBEL, F. M.; PETTERMAN, T. K. An Arabidopsis thaliana lipoxigenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, v.101, p.441-450, 1993.
- MINGUEZ-MOSQUEIRA, M. I.; JAREN-GALAN, M.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Lipoxigenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry*, v.32, p.1103-1108, 1993.
- OHTA, H., IDA, S., MIKAMI, B., MORITA, Y. Changes in lipoxigenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiol.*, v.22, p.911-918, 1986.
- PARÉ, P. W. & TUMLINSON, J. H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.*, v.114, p.1161-1167, 1997.
- PEÑA-CORTÉS, H.; ALBRECHT, T.; PRAT, S.; WEILER, E. W.; WILLMITZER, L. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, v.191, p.123-128, 1993.
- REDGEL, D.; SCHEWE, T.; KUEHN, H. Comparative characteristics of lipoxigenase isoenzymes from green pea seeds. *Biochemistry*, v.60, n.6, p.715-721, 1995.
- 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. *Rev. Ceres*, Viçosa, v.40, n.231, p.438-444, 1993.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.15, p.76-85, 1985.
- TAYLOR, M. A. J. & LEE, M. J. Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.235, p.606-609, 1997.
- UTUMI, M. M.; BARROS, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Efeito de eliminação genética de lipoxigenases e de polipeptídeos de reserva na qualidade da proteína de soja. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, v.10, n.3, p.203-212, 1998.
- VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSÉ, I. C.; PIOVESAN, N. D.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Biochemical evaluation of lipoxigenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* Brasília, v.13, n.1, p.5-12, 2001.

Recebido em 2/11/01

Aceito em 16/1/02