



ARTIGO ORIGINAL

## Resposta da soja, com e sem supressão de lipoxigenases, às injúrias mecânicas e do percevejo-marrom

### *Soybean response, with and without lipoxygenases suppression, to mechanical injuries of the brown stink bug*

Eduardo Góes Cordeiro<sup>1</sup>  
Carolina Rocha da Silva<sup>1</sup>  
Gláucia Cordeiro<sup>1</sup>  
Camila Rocha da Silva<sup>2</sup>  
Neilier Rodrigues da Silva Junior<sup>1</sup>  
Maria Goreti de Almeida Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa – UFV, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa – UFV, Rodovia MG-230, Km 7, Zona Rural, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil

\*Autor correspondente:  
E-mail: malmeida@ufv.br

#### PALAVRAS-CHAVE

Interação inseto x planta  
Genótipo  
Defesa

#### KEYWORDS

Interaction insect x plant  
Genotype  
Defense

**RESUMO:** O efeito da eliminação genética das lipoxigenases em plantas de soja visando reduzir o “*beany flavor*” foi verificada na indução de defesa, tanto à infestação do herbívoro *E. heros* quanto à injúria mecânica, por meio da comparação com plantas com genótipo regular. A atividade enzimática do “*pool*” de lipoxigenases no genótipo regular foi maior nas plantas com injúrias mecânicas nos grãos, em comparação ao controle sem injúrias após 8 h. Já no genótipo triplo nulo, a atividade da enzima foi menor nas plantas infestadas. Os resultados indicam a importância da presença das isoenzimas de lipoxigenases na resposta da soja às injúrias biológicas e mecânicas, e adicionalmente, na sinalização de injúrias sistêmicas, pode indicar maior suscetibilidade da soja à infestação por herbívoros.

**ABSTRACT:** The effect of the genetic elimination of lipoxygenases in soybean plants aiming to reduce *beany flavor* was verified in the induction of defense, when the plant is infested with *E. heros* herbivore or mechanically injured by comparison with plants with regular genotype. The enzymatic activity of the lipoxygenase pool in the regular genotype was higher in plants with mechanical injuries in the grains, if compared to the control without injuries after 8 hours. In the triple null genotype, the enzyme activity was lower in plants infested with the herbivore. The results indicate the importance of the lipoxygenase isoenzymes presence in soybean response to herbivore attack and mechanical injury, and, additionally, the importance of the enzyme presence in signaling systemic injuries, which may be the reason soybeans are more susceptible to herbivore infestation.

## 1 Introdução

A interação entre herbívoros e patógenos com suas plantas hospedeiras mostra que o processo bioquímico de defesa acontece após as injúrias provocadas pela alimentação (Chen, 2008). Este processo leva ao rompimento lipídico das células vegetais e ativa a síntese de compostos que atuam no mecanismo de defesa de plantas a fitófagos (Kessler & Baldwin, 2001). A membrana que sofre o rompimento é rica em ácidos graxos, que servem como substrato para as lipoxigenases (LOX), uma classe de enzimas responsável pela síntese de compostos de defesa direta, como inibidores de proteases (IP) (Maffei et al., 2007).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é utilizada na alimentação animal e humana como fonte de óleo e proteína de alta qualidade (Harada e Xia, 2004). Contudo, devido ao “*beany flavor*”, existe uma limitação na aceitação comercial para uso na alimentação humana. Visando melhorar a qualidade e a utilização dos produtos da soja, foi realizada a eliminação genética de três isoenzimas de lipoxigenases responsáveis pelo “*beany flavor*”. Martins et al. (2002) demonstraram que a eliminação das lipoxigenases não altera as características agrônômicas da planta, permitindo assim sua produção e comercialização.

A soja é alvo de herbívoros durante todo o seu desenvolvimento e uma das principais pragas encontradas no Brasil é o percevejo-marrom da soja, *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae), que se alimenta de suas folhas e grãos, causando murcha e má formação das vagens (Lourenção et al., 2010).

Com o silenciamento dos genes que expressam a lipoxigenases no grão, surgiu o questionamento sobre qual efeito essa eliminação pode causar na interação entre a soja e o herbívoro. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se a ausência de lipoxigenases afeta a indução e a síntese de compostos de defesa direta, como os inibidores de proteases, em resposta à infestação do percevejo *E. heros* e à injúria mecânica nos grãos e folhas de soja, usando dois genótipos desta: o regular (sem supressão de lipoxigenase) e o triplo nulo (com supressão de lipoxigenase).

## 2 Material e Métodos

As variedades utilizadas como material genético foram o genótipo triplo nulo TN 105 AP (com supressão de LOX) e o genótipo regular 053032 PTA 2 + 6 (sem supressão de LOX). Os dois cultivares de soja foram conduzidos até o estádio R5 (estádio reprodutivo 5), momento em que ocorre o enchimento das vagens nas plantas e adequado para a realização dos testes devido ao hábito alimentar de *E. heros*.

As plantas de soja foram cultivadas em casa de vegetação, localizada na Universidade Federal de Viçosa. Foram semeadas em vasos com capacidade de 4kg de solo, contendo duas sementes por vaso. No estágio V3 ocorreu o desbaste de uma das plantas, mantendo apenas uma por vaso.

A criação do percevejo *E. heros* seguiu a metodologia descrita por Borges et al. (2006). Os insetos foram mantidos em condições de temperatura ( $\pm 26^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo (12 h) e umidade ( $\pm 80\%$ ) controlada em sala climatizada.

A dieta natural dos insetos foi composta de amendoim cru (*Arachis hypogaea*), grão seco de soja (*G. max*), semente de girassol (*Helianthus annuus*) e vagem de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os ovos obtidos foram colocados em placa de Petri (9 cm) contendo meia vagem de feijão. Após a eclosão dos ovos, os percevejos

imaturos foram alimentados com vagem de feijão até atingir o segundo instar, e após este estágio a dieta foi enriquecida com um grão de soja, um de amendoim e um de girassol. Ao atingirem o quarto instar, eles foram transferidos para gaiolas plásticas para completar seu desenvolvimento até a fase adulta.

Os adultos foram acondicionados em gaiolas confeccionadas em recipientes plásticos (8 L) contendo papel filtro no fundo e com orifícios na tampa, cobertos com organza. Na borda de cada tampa foi depositada uma camada de vaselina para impedir a fuga dos insetos. Os grãos de soja, amendoim e girassol foram colados em cartelas de papel (15 x 15 cm) com cola branca não tóxica. Fixaram-se, nas paredes da gaiola, duas cartelas com os grãos na proporção 1:1:1 e dois cachos com vagens de feijão (cinco vagens), oferecidos *ad libitum*. Um pote com água e algodão foi colocado no fundo da gaiola para manter a umidade e servir de fonte de água. Os ovos foram coletados a cada dois dias, retomando os procedimentos iniciais.

Os ensaios na casa de vegetação foram realizados seguindo um delineamento inteiramente casualizado estabelecido na forma de um fatorial 2 x 4 x 3, no qual o primeiro fator foi o genótipo da soja (regular e triplo nulo); o segundo, o tipo de injúria na planta (injúria com o herbívoro *E. heros*, injúria mecânica nos grãos, injúria mecânica nas folhas e controle sem injúria); e o terceiro, o órgão vegetal coletado para análises (vagem, grão e folha).

Os tratamentos foram realizados das seguintes maneiras: a) duas ninfas de quarto instar foram isoladas nas vagens do quinto nó da planta utilizando sacos feitos de tecido organza; b) cinco perfurações foram feitas em todas as vagens com o auxílio de um alfinete entomológico; c) cinco perfurações foram feitas em cada folíolo com auxílio de um alfinete entomológico; e d) controle sem injúria.

As amostras foram coletadas 0, 8, e 24 h depois de realizadas as injúrias, segundo a metodologia proposta por Fortunato et al. (2007). As amostras foram independentes para cada tratamento e período. Três repetições foram utilizadas para cada tratamento.

As amostras de folhas e vagens foram compostas pelos trifólios presentes no quinto nó da planta, sendo acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido. Os envelopes foram posteriormente armazenados em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para análises enzimáticas e de inibidores de proteases.

Para a obtenção dos extratos enzimáticos de grão, vagem e folha, foi preparado o extrato bruto a  $4^\circ\text{C}$  de acordo com o método de Ohta et al. (1986). Os grãos foram separados das vagens com o auxílio de um estilete durante a coleta das amostras. Foram pesados 300 mg do material (grão, vagem ou folha), congelado em nitrogênio líquido e macerado em almofariz. O pó obtido foi ressuspenso em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção 1:3 (P/V), e, em seguida, filtrado com o auxílio de uma seringa e uma gaze. O material foi centrifugado a 16.000 g por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para todos os ensaios bioquímicos.

As atividades de lipoxigenases e de inibição de proteases foi obtida pela diferença encontrada entre os tempos avaliados, após o tempo zero.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, foram adicionados a um tubo de ensaio 1,0  $\mu\text{L}$  do extrato bruto e 4,0  $\mu\text{L}$  da solução estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,5. A velocidade da reação foi

determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por um período de 2,5 minutos. Procedeu-se sob as mesmas condições com o branco, que era constituído da mesma quantidade de substrato e tampão. As análises foram feitas e triplicadas para cada uma das três repetições de cada tratamento.

A determinação de inibidores de proteases foi feita com base na inibição da atividade da tripsina, utilizando-se 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). A atividade triptica foi determinada através do seguinte procedimento analítico: foram adicionados a um tubo de ensaio 100  $\mu$ L do extrato bruto, 500  $\mu$ L de tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50  $\mu$ L de solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro tubo de ensaio, 600  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50  $\mu$ L da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M. Essas misturas contidas em ambos os tubos foram incubadas por cinco minutos a 25°C. Após o tempo de incubação, 500  $\mu$ L de cada mistura foi retirado e adicionado em outro tubo contendo 500  $\mu$ L de solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas para cada uma das três repetições.

Para verificar a resposta das plantas foi realizada uma análise de variância em fatorial (ANOVA) com dois e três fatores. Identificada a existência de pelo menos uma diferença entre duas médias, foi executado o teste de média Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001). O teste utilizado para a correlação entre a variável atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida foi a Correlação de Pearson no software SigmaPlot 11.0.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Resultados

Os resultados obtidos do extrato de grão/genótipo regular mostraram que a atividade específica de LOX em função do tempo apresentou diferença significativa ( $F_{2,35} = 59,408$ ;  $p < 0,001$ ). A quantidade de tripsina inibida foi diferente

significativamente para os fatores, tipo de injúria ( $F_{3,35} = 11,656$ ;  $p < 0,001$ ), tempo ( $F_{2,35} = 12,980$ ;  $p < 0,001$ ) e para a interação entre eles ( $F_{6,35} = 6,694$ ;  $p < 0,001$ ).

Nas amostras controle, injuriadas com o *E. heros* e injuriadas mecanicamente nos grãos e folhas foi observado um aumento significativo da atividade de LOX após 8 h. Sendo que, nas plantas tratadas com injúrias nos grãos, a atividade de LOX foi maior que a observada para as plantas sem injúrias (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). No período de 24 h foi observado uma redução na atividade de LOX e esta não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1).

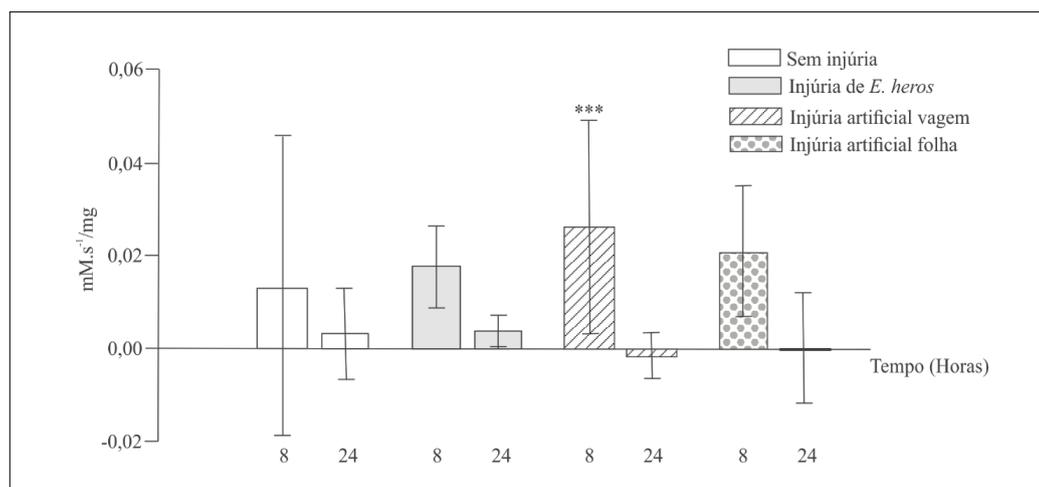
A quantidade de tripsina inibida não foi diferente em função do tempo, no tratamento sem injúrias ( $p > 0,05$ ). Nos tratamentos em que as plantas foram infestadas com *E. heros* e com injúria nos grãos, houve redução significativa no tempo 24 h em relação ao tempo zero horas ( $p < 0,001$ ). Plantas com injúrias nas folhas apresentaram aumento na quantidade de tripsina inibida 24 h após aplicação das injúrias ( $p = 0,031$ ).

A quantidade de tripsina inibida nas plantas, com injúrias nas folhas, foi maior do que a observada na amostra controle para os tempos oito e 24 h (\*\*;  $p < 0,01$  e \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Também foi maior do que plantas infestadas com *E. heros* e com injúrias nos grãos, após 24 h (Figura 2).

A análise de correlação entre a atividade específica de LOX e a quantidade de tripsina inibida não foi significativa para nenhum dos pares testados (coeficiente de correlação = 0,260;  $p = 0,126$ ).

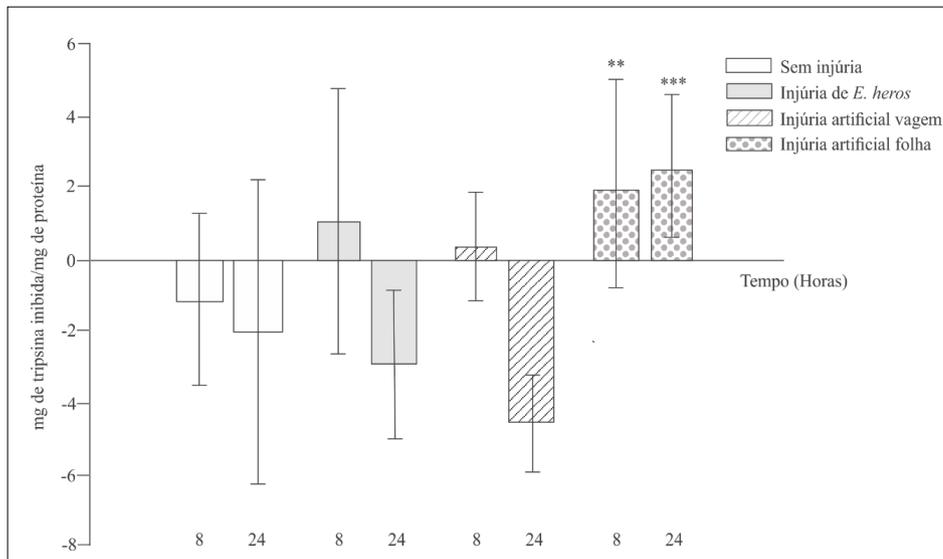
Os resultados obtidos do extrato de grão/genótipo triplo nulo mostraram que a atividade específica de LOX em função do tempo apresentou diferença significativa ( $F_{1,23} = 74,836$ ;  $p < 0,001$ ). Para a quantidade de tripsina inibida também foi observada diferença significativa em função dos diferentes tratamentos, do tempo ( $F_{1,23} = 77,456$ ;  $p < 0,001$ ) e da interação entre os dois fatores ( $F_{3,23} = 11,605$ ;  $p < 0,001$ ).

Nas amostras controle, injuriadas com o *E. heros* e injuriadas mecanicamente nos grãos e nas folhas, foi observado um aumento na atividade específica de LOX após o período de 8 h. A atividade de LOX nas plantas com *E. heros* (\*\*;  $p < 0,01$ ) foi menor que a atividade de LOX de plantas sem injúrias. Não houve diferença entre os demais tratamentos (Figura 3).



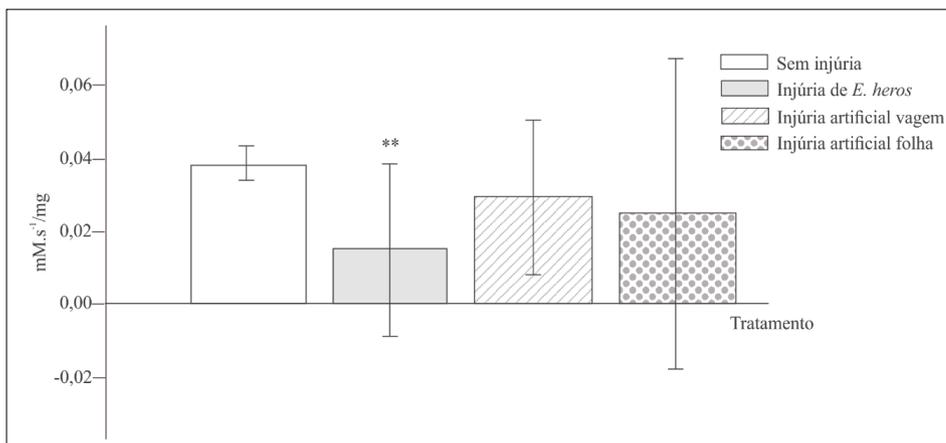
**Figura 1.** Atividade específica de LOX ( $\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ ) em grãos de soja do genótipo regular em dois períodos de tempo (8 e 24 h).

**Figure 1.** Specific activity of LOX ( $\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ ) in soybean grains of the regular genotype in two time periods (8 and 24 h).



**Figura 2.** Quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina inibida/mg de proteína) em grãos de soja do genótipo regular.

**Figure 2.** Amount of inhibited trypsin (mg of inhibited trypsin/mg protein) in soybean grains of the regular genotype.



**Figura 3.** Atividade específica de LOX (mM.s<sup>-1</sup>/mg) em grãos de soja do genótipo triplo nulo.

**Figure 3.** Specific activity of LOX (mM.s<sup>-1</sup>/mg) in soybean grains of the triple null genotype.

A quantidade de tripsina inibida após o período de 8 h apresentou um aumento significativo nas amostras controle e nas amostras injuriadas mecanicamente nos grãos e nas folhas. Não foi observado aumento significativo nas amostras injuriadas com *E. heros*.

Também foi observado que após 8 h a quantidade de tripsina inibida nas amostras com *E. heros* e nas amostras injuriadas mecanicamente nos grãos foi menor em relação às amostras controle (\*\*\*) e injuriadas mecanicamente nas folhas (\*\*;  $p < 0,01$ ). Contudo a quantidade de tripsina inibida nas amostras com *E. heros* foi significativamente menor que nas amostras injuriadas mecanicamente nos grãos, e não houve diferença nas amostras controle e nas amostras injuriadas mecanicamente nas folhas (Figura 4).

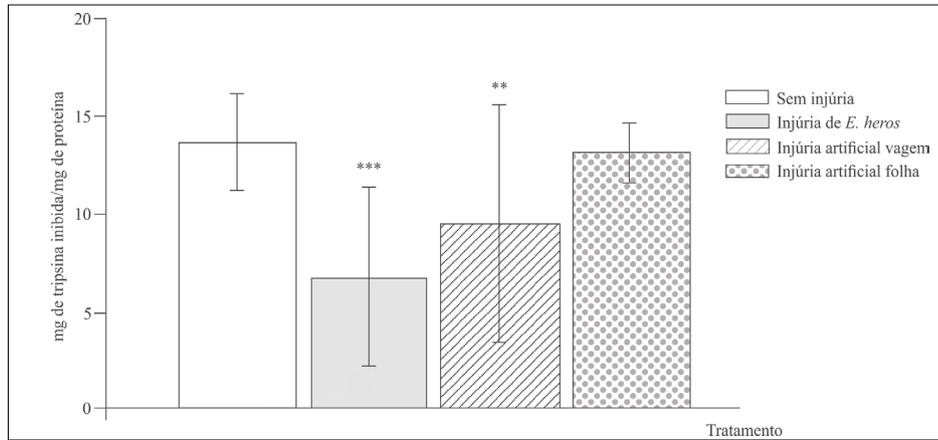
A análise de correlação entre a atividade específica de LOX e a quantidade de tripsina inibida no genótipo triplo nulo revelou que existe correlação positiva entre a atividade da enzima e a quantidade de inibidor (coeficiente de correlação = 0,824;  $p < 0,001$ ) (Figura 5).

Os resultados obtidos do extrato de vagem/genótipo regular, mostraram que a atividade específica de LOX em função do tempo

( $F_{2,35} = 11,567$ ;  $p < 0,001$ ) e da interação entre injúria e tempo ( $F_{6,35} = 3,111$ ;  $p = 0,021$ ) apresentou diferença significativa, bem como o observado para a quantidade de tripsina inibida, em função do tipo de injúria ( $F_{3,35} = 32,394$ ;  $p < 0,001$ ) e da interação entre o tipo de injúria e o tempo ( $F_{6,35} = 20,434$ ;  $p < 0,001$ ).

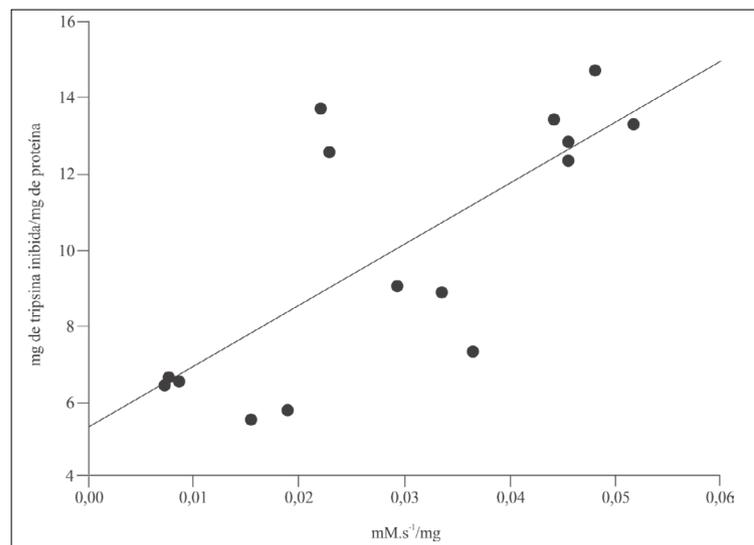
As plantas injuriadas com *E. heros* e injuriadas mecanicamente nos grãos e nas folhas apresentaram um aumento significativo na atividade de LOX no período de 8 h (\*\*\*) e da interação entre o tipo de injúria e o tempo ( $F_{6,35} = 20,434$ ;  $p < 0,001$ ) em comparação à planta controle. Para o período de 24 h foi observada uma diminuição na atividade de LOX para todos os tratamentos (Figura 6).

Ao avaliar a quantidade de tripsina inibida nas vagens, somente o tratamento com injúrias mecânicas nos grãos apresentou, no período de 8 h, um aumento significativo deste parâmetro. Entretanto, no período de 24 h foi verificada uma redução da quantidade de tripsina inibida. Ainda para o período de 24 h, a quantidade de tripsina inibida nas plantas com *E. heros*, injúrias mecânicas nos grãos e nas folhas foram maiores que em plantas sem injúrias (\*;  $p < 0,05$ ; \*\*;  $p < 0,001$  e \*\*\*;  $p < 0,001$ ) (Figura 7).



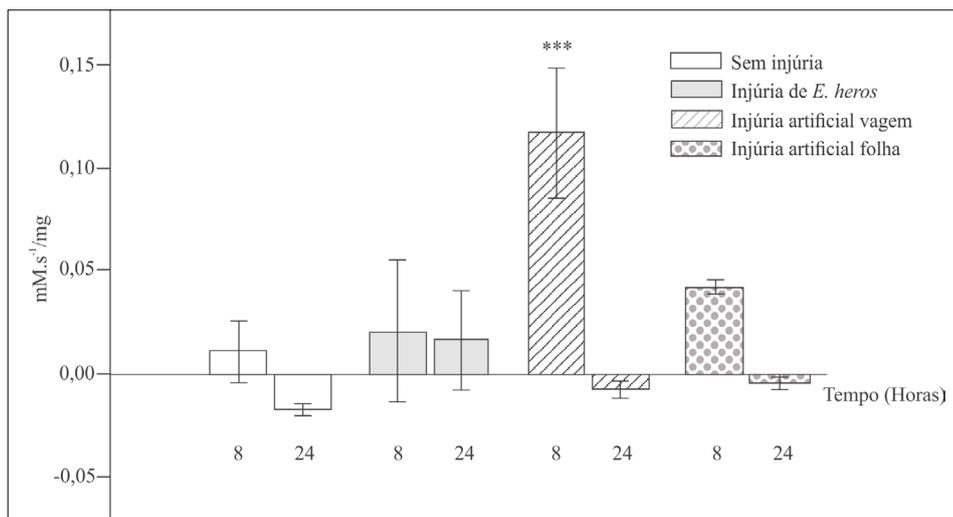
**Figura 4.** Quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina inibida/mg de proteína) em grãos de soja do genótipo triplo nulo.

**Figure 4.** Amount of inhibited trypsin (mg of inhibited trypsin/mg protein) in soybean grains of the triple null genotype.



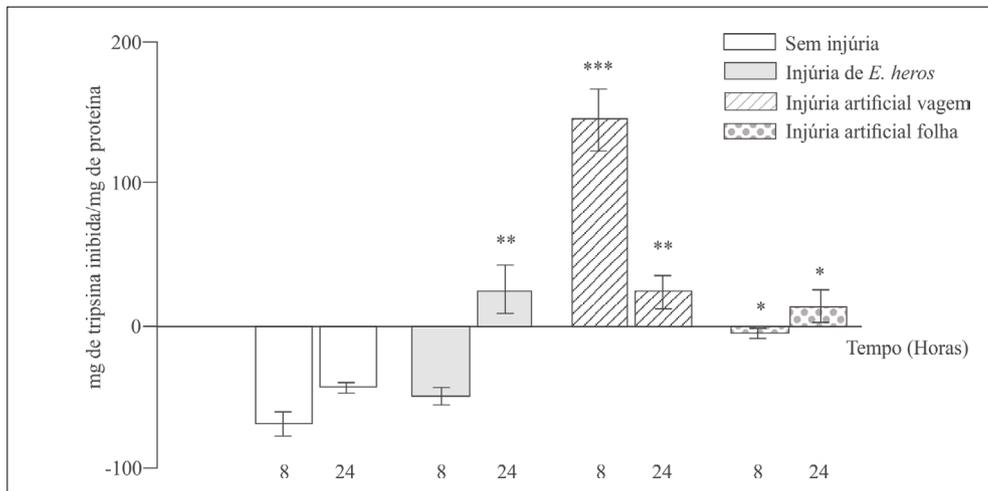
**Figura 5.** Correlação entre as variáveis da atividade específica de LOX ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ ) e da quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/mg de proteína) em grãos do genótipo triplo nulo.

**Figure 5.** Correlation between the variables of the LOX specific activity ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ ) and the amount of inhibited trypsin (mg trypsin/mg protein) in grains of the triple null genotype.



**Figura 6.** Atividade específica de LOX ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ ) em vagens de soja do genótipo regular.

**Figure 6.** Specific activity of LOX ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ ) in soybean pods of the regular genotype.



**Figura 7.** Quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina inibida/mg de proteína) em vagens de soja do genótipo regular.  
**Figure 7.** Amount of inhibited trypsin (mg of inhibited trypsin/mg protein) in soybean pods of the regular genotype.

A análise de correlação entre as duas variáveis, atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida, mostrou que existe correlação positiva elas (Coeficiente de Correlação = 0,689;  $p < 0,00$ ) (Figura 8).

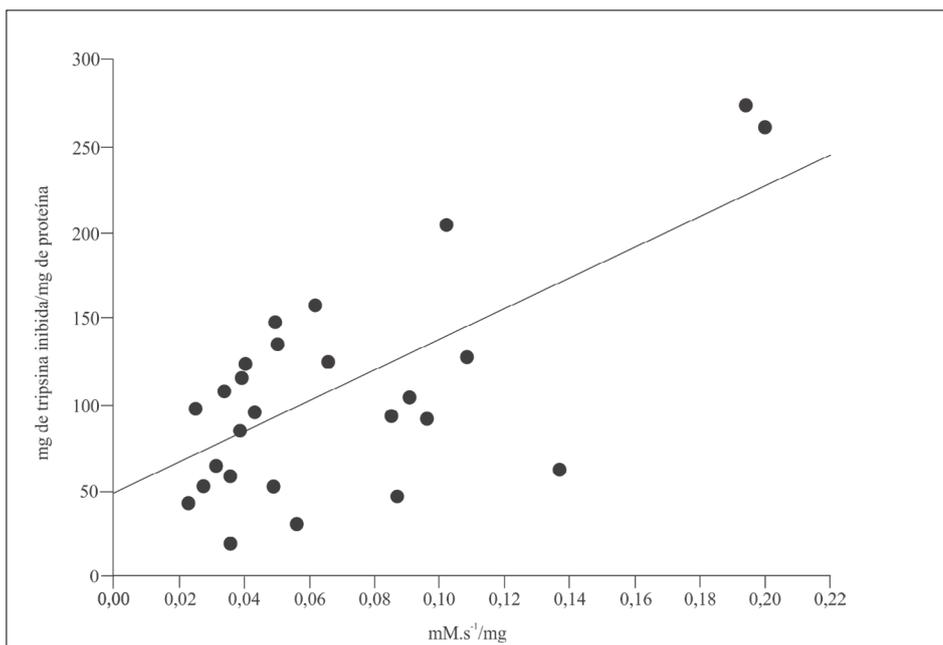
Os resultados obtidos do extrato de vagem/genótipo triplo nulo, mostraram que a atividade específica de LOX em função do tempo ( $F_{1,23} = 23,269$ ;  $p < 0,001$ ) apresentou diferença significativa, bem como o observado para a quantidade de tripsina inibida, em função da injúria ( $F_{3,23} = 10,890$ ;  $p < 0,001$ ), do tempo ( $F_{1,23} = 18,972$ ;  $p < 0,001$ ) e da interação entre os fatores ( $F_{3,23} = 10,890$ ;  $p < 0,001$ ).

A atividade de LOX nas plantas sem injúrias e com injúrias mecânicas nos grãos aumentou após 8 h (\*\*;  $p < 0,01$ ). Não

houve alteração na atividade de LOX nas plantas com *E. heros* e com injúrias mecânicas nas folhas (Figura 9).

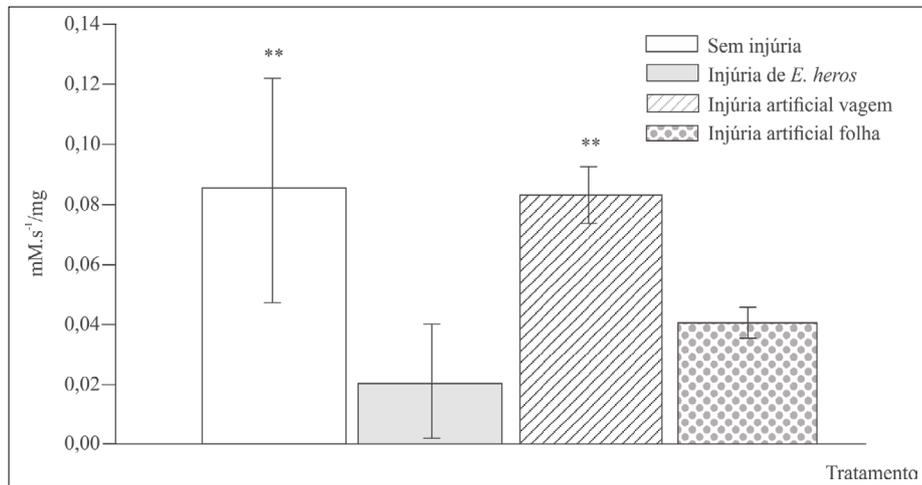
A quantidade de tripsina inibida aumentou, no período de 8 h, nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos. Não houve diferença na quantidade de tripsina inibida nas plantas com *E. heros* e com injúrias nas folhas. Por outro lado, as quantidades observadas nesses tratamentos são significativamente menores que em plantas sem injúrias e em plantas tratadas com injúrias nos grãos (\*\*;  $p < 0,01$  e \*\*\*;  $p < 0,001$ ) (Figura 10).

A análise de correlação entre a variável atividade específica de LOX e quantidade de tripsina inibida foi significativa, demonstrando que os valores estão positivamente relacionados (Coeficiente de Correlação = 0,813 e  $p < 0,001$ ) (Figura 11).



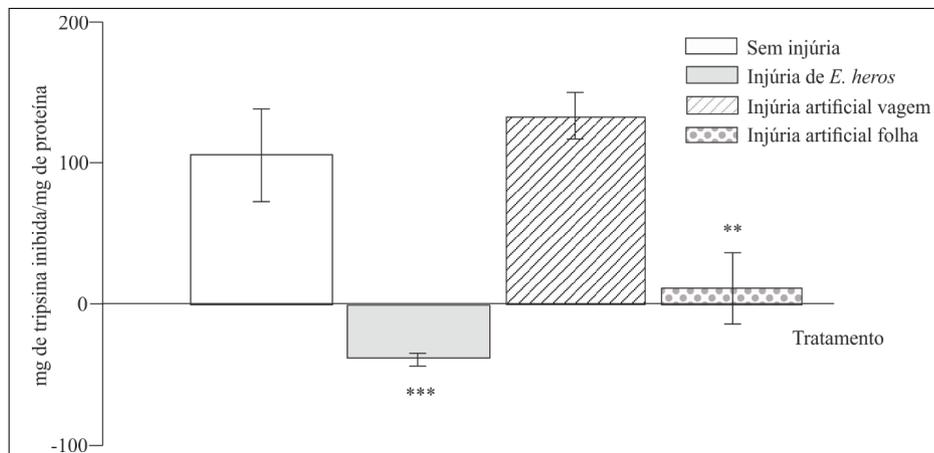
**Figura 8.** Correlação entre as variáveis da atividade específica de LOX ( $\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ ) e da quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/mg de proteína) em vagens do genótipo regular.

**Figure 8.** Correlation between the variables of the LOX specific activity ( $\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ ) and the amount of inhibited trypsin (mg trypsin/mg protein) in pods of the regular genotype.



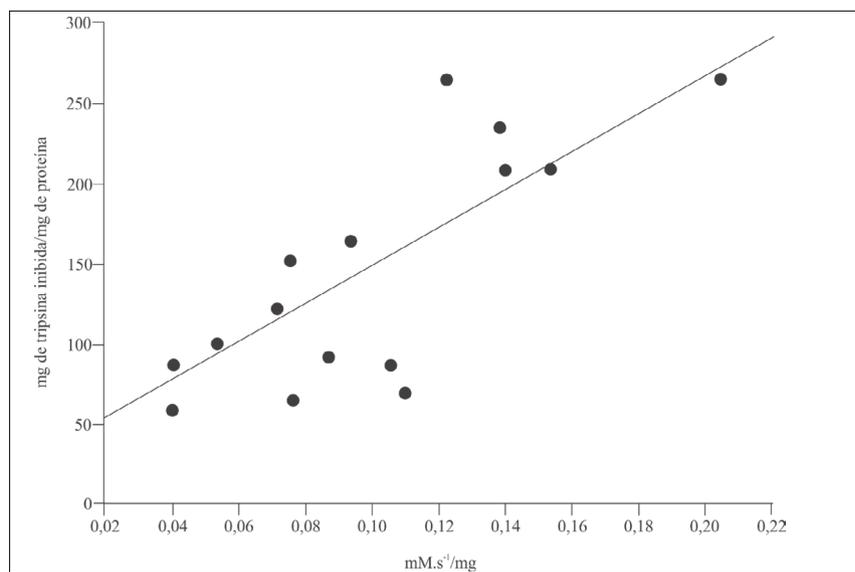
**Figura 9.** Atividade específica de LOX (mM.s<sup>-1</sup>/mg) em vagens de soja do genótipo triplo nulo.

**Figure 9.** Specific activity of LOX (mM.s<sup>-1</sup>/mg) in soybean pods of the triple null genotype.



**Figura 10.** Quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina inibida/mg de proteína) em vagens de soja do genótipo triplo nulo.

**Figure 10.** Amount of inhibited trypsin (mg of inhibited trypsin/mg protein) in soybean pods of the triple null genotype.



**Figura 11.** Correlação entre as variáveis da atividade específica de LOX (mM.s<sup>-1</sup>/mg) e da quantidade de tripsina inibida (mg de tripsina/mg de proteína) em vagens do genótipo triplo nulo.

**Figure 11.** Correlation between the variables of the LOX specific activity (mM.s<sup>-1</sup>/mg) and the amount of inhibited trypsin (mg trypsin/mg protein) in pods pods of the triple null genotype.

### 3.2 Discussão

O extrato de grãos/genótipo regular mostrou que o aumento da atividade de LOX, após 8 h de indução, em todos os tratamentos, incluindo o controle sem injúria, pode ser um indicativo da atividade das isoenzimas de LOX durante a maturação da semente. O fato da atividade de LOX ter sido maior nas plantas com injúrias nos grãos, sugere a participação dessa enzima em resposta da planta à injúria (Loiseau et al., 2001). Esse perfil de resposta foi encontrado em plantas de soja infestadas com *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Fortunato et al., 2007) e com *Bemisia argentifolii* (Silva et al., 2004), bem como em plantas injuriadas mecanicamente nas folhas (Vieira et al., 2001). A redução na atividade de LOX após 24 h em todos os tratamentos é mais uma evidência de que as respostas das plantas a distúrbios ocorrem nas primeiras horas que sucedem às injúrias.

A quantidade de tripsina inibida observada em plantas com injúrias nos grãos sugere que as LOX presentes nas sementes não induzem a síntese de inibidores de proteases, uma vez que o aumento na atividade de LOX não foi convertido no composto de defesa. Por outro lado, o aumento na quantidade de tripsina inibida nas plantas com injúrias nas folhas sustenta a hipótese de que LOX vegetativas participam do processo de indução de síntese de inibidores de proteases (Fortunato et al., 2007).

Já para o extrato de grãos/genótipo triplo nulo, o aumento da atividade de LOX após 8 h, em todos os tratamentos, incluindo o controle sem injúria, pode ser explicado pelos fatores descritos anteriormente. A menor atividade encontrada em plantas infestadas com *E. heros* pode levantar algumas questões sobre a importância das três LOX ausentes no genótipo triplo nulo na resposta da soja a injúrias. Esta suposição é reforçada pelo fato da quantidade de tripsina inibida em plantas com o herbívoro e com injúrias nas folhas serem menores que em plantas sem injúrias. Por outro lado, trabalhos recentes demonstraram que alguns herbívoros são adaptados para sobrepor defesas de plantas através da manipulação das respostas (Sarmiento et al., 2011). A correlação positiva entre a atividade de LOX e a quantidade de tripsina inibida confirmou que as duas variáveis estão relacionadas, ou seja, o aumento da atividade da enzima é refletido no aumento da quantidade de tripsina inibida.

As LOX presentes nas vagens já foram descritas desempenhando papel fisiológico nas plantas (Dubbs & Grimes, 2000a, 2000b). Os resultados dos extratos de vagens/genótipo regular sugerem que LOX de vagens podem atuar em resposta a injúrias, como observado após 8 h nas plantas com injúrias nos grãos. Os resultados também mostram que a reação ocorre momentos após o recebimento da injúria (Silva et al., 2001; Vieira et al., 2001; Batista et al., 2002; Silva et al., 2004; Fortunato et al., 2007).

O resultado do aumento da atividade de LOX nas plantas com injúrias nos grãos pode ser observado como o fator que provocou aumento da quantidade de tripsina inibida, indicado uma possível importância da enzima em resposta a injúrias locais. Também podem ser importantes na sinalização de injúrias sistêmicas, observado na maior quantidade de inibidores de proteases (IP) nas plantas com injúrias nas folhas do que plantas sem injúrias, mesmo após 24 h. O herbívoro provocou aumento na quantidade de tripsina

inibida após 24 h de infestação, mostrando que a quantidade de tripsina inibida está positivamente correlacionada com a atividade de LOX.

Para os extratos de vagens/genótipo triplo nulo, a atividade de LOX aumentou nas plantas sem injúrias e com injúrias nos grãos após 8 h. Plantas com o herbívoro e com injúrias nas folhas não apresentaram essa alteração, que pode ser verificada também na quantidade de tripsina inibida. O que indica que o herbívoro não provoca alteração na atividade de LOX e conseqüentemente não provoca aumento na quantidade de IP. Este resultado mostra a importância das LOX presentes nos grãos em resposta a infestação por herbívoros.

### 4 Conclusões

O mecanismo de indução e síntese de compostos de defesa ainda precisa ser completamente estabelecido.

A sinalização sistêmica de injúrias é reconhecida. Contudo a importância da presença dos componentes das rotas síntese de compostos de defesa em todos os órgãos ainda precisa de mais esclarecimento. Não podemos descartar a hipótese da influência do herbívoro nesse contexto, uma vez que a supressão de mecanismo de defesas das plantas por herbívoros já foi apresentada em outros sistemas.

Pode estar ocorrendo a ativação de outras rotas não avaliadas, bem como, por outro lado, as plantas TN podem ser mais vulneráveis a esses herbívoros, representando uma questão a ser observada quanto às estratégias de supressão de LOX, para melhorar a aceitação dos produtos de soja utilizados.

### Referências

- BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, M. G. de A.; PIRES, C. V.; PIOVESAN, N. D.; REZENDE, S. T. de; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n.11, p. 1517-1524, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002001100001>.
- BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; SILVA, C. C. A. da; MORAES, M. C. B.; SANTOS, H. M.; RIBEIRO, D. T. *Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química*. Brasília, DF: Embrapa Cernagem, 2006. 18 p.
- CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, v. 15, p. 101-114, 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x>.
- DUBBS, W. E.; GRIMES, H. D. The mid-pericarp cell layer in soybean pod walls is a multicellular compartment enriched in specific lipoxigenase isoforms. *Plant Physiology*, v. 123, p. 1281-1288, 2000a. <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1281>.
- DUBBS, W. E.; GRIMES, H. D. Specific lipoxigenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiology*, v. 123, p. 1269-1279, 2000b.
- FORTUNATO, F. da D.; OLIVEIRA, M. G. de A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxigenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hubner). *Journal*

- Pest Science*, v. 80, p. 241-247, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-007-0179-4>.
- HARADA, K.; XIA, Z. Soybean genomics: efforts to reveal the complex genome. *Breeding Science*, v. 54, p. 215-224, 2004.
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin-inhibitor activity of soy products: collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, v. 51, p. 376-382, 1974.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, v. 291, p. 2141-2144, 2001.
- LOISEAU, J.; VU, B. L.; MACHEREL, M. H.; LE DEUNFF, Y. Seed lipoxigenases: occurrence and functions. *Seed Science Research*, v. 11, p. 199-211, 2001.
- LOURENÇÃO, A. L.; RECO, P. C.; BRAGA, N. R.; VALLE, G. E. do; PINHEIRO, J. B. Yield of soybean genotypes under infestation of the velvetbean caterpillar and stink bugs. *Neotropical Entomology*, v. 39, p. 275-281, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000200020>.
- MAFFEI, M. E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science*, v. 12, p. 310-316, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.001>.
- MARTINS, C. A. O.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; ROCHA, V. S.; OLIVEIRA, M. G. D. Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre as características agronômicas da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, p. 1389-1398, 2002.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxigenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiology*, v. 27, p. 911-918, 1986.
- SARMENTO, R. A.; LEMOS, F.; BLEEKER, P. M.; SCHUURINK, R. C.; PALLINI, A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; LIMA, E. R.; KANT, M.; SABELIS, M. W.; JANSSEN, A. A herbivore that manipulates plant defense. *Ecology Letters*, v. 14, p. 229-236, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01575.x>.
- SILVA, M. D. da; OLIVEIRA, M. G. de A.; LANNA, A. C.; PIRES, C. V.; PIOVESAN, N. D.; JOSÉ, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e suscetíveis a *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionlis*, agente causal do cancro-da-haste. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, p. 316-328, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000300007>.
- SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. de A.; BRUMANO, M. H. N.; PIRES, C. V.; ALMEIDA, F. T.; OLIVEIRA, J. A.; PILON A. M.; SILVA, C. H. O.; MOREIRA, M. A. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolii*). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 2, p. 409-416, 2004.
- VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; JOSÉ, I. C.; PIOVESAN, N. D.; REZENDE, S. T. de; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. de. Biochemical evaluation of lipoxigenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, p. 5-12, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000100001>.

**Contribuição dos autores:** Eduardo Góes Cordeiro realizou os experimentos e a escrita científica. Carolina Rocha da Silva contribuiu com a revisão bibliográfica e a escrita científica. Gláucia Cordeiro contribuiu com a escrita científica e a revisão ortográfica e gramatical. Camila Rocha da Silva contribuiu com a avaliação do trabalho na área de bioquímica e escrita científica. Neilier Rodrigues da Silva Junior contribuiu com a revisão bibliográfica. Maria Goreti de Almeida Oliveira orientou o trabalho e supervisionou as etapas descritas acima.

**Agradecimentos:** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP) pelo suporte financeiro.

**Fontes de financiamento:** CNPq, Fapemig, Capes e INCTIPP.

**Conflito de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.