

## ENZIMAS INDICADORAS DO ESTADO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS À DEFICIÊNCIA DE POTÁSSIO

ENZYME ACTIVITY INDICATING THE STATE OF INDUCTION OF RESISTANCE IN SOYBEAN GENOTYPES SUBMITTED TO POTASSIUM DEFICIENCY

MARQUES, A.E.<sup>1</sup>; BARACAT-PEREIRA, M.C.<sup>2\*</sup>; GAMES, P.D.<sup>2</sup>; FONTES, P.P.<sup>2</sup>; MAGALHÃES JUNIOR, M.J.<sup>2</sup>; BARBOSA, M.O.<sup>3</sup>; CARRIJO, L.C.<sup>2</sup>; LIMA, P.H.F.<sup>2</sup>; PEREIRA, P.R.G.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>4</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>4</sup>; BARROS, E.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. E-mail: [anaerme@gmail.com](mailto:anaerme@gmail.com); [\\*baracat@ufv.br](mailto:*baracat@ufv.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.

### Resumo

Dentre os macronutrientes, o potássio é um cátion que exerce funções não estruturais, como a ativação de mais de 50 enzimas e a atuação na síntese de proteínas. O estudo da expressão proteica de plantas submetidas à deficiência de potássio pode auxiliar no entendimento das respostas de defesa das plantas sob estresse por esse importante nutriente. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade de enzimas indicadoras da indução de resistência, incluindo-se lipoxigenases (LOX), peroxidases (PO) e fenilalanina amônia-liase (PAL), em dois genótipos de soja, PI 561356 (PI) e Embrapa 48 (E48), em dois estádios de desenvolvimento (V5 e V7), quando submetidos a estresse pela deficiência de potássio. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa e as análises foram realizadas no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial, tendo sido avaliados: solução nutritiva com e sem potássio (a partir de V3), estádios V5 e V7, e genótipos PI e E48, que são resistente e susceptível à ferrugem asiática da soja, respectivamente. Após cultivo em hidroponia, as folhas foram coletadas e as atividades das enzimas foram determinadas nos extratos solúveis. A deficiência de potássio promoveu alterações nas atividades das enzimas nos dois genótipos analisados, quando comparados com plantas não deficientes em potássio. A atividade das LOX apresentou variação decrescente entre V5 e V7 para PI sob deficiência, e variação crescente para a PI controle e para os dois tratamentos de E48. Nas plantas sob deficiência, as taxas de atividade de PO (relativas ao tempo) foram menores entre V5 e V7, quando comparados com os controles. Atividades de PAL foram inferiores em plantas de PI e de E48 sob deficiência, quando comparadas com os controles. Esses resultados sugerem que as vias metabólicas que envolvem essas enzimas diferem entre os genótipos, e não correspondem ao principal mecanismo de defesa dessas plantas a esse estresse (abiótico), nesses estádios de desenvolvimento (entre V5 e V7), pois apenas LOX de E48 aumentou com o tempo. Esses resultados ao estresse abiótico por deficiência de potássio foram semelhantes aos observado por nosso grupo para plantas de soja desses genótipos sob estresse biótico, quando inoculadas pelo fungo da ferrugem asiática.

### Introdução

O potássio é um macronutriente envolvido em funções não estruturais das plantas, e sua deficiência pode causar a perda do turgor celular, alterar a abertura e fechamento dos estômatos, interferir na síntese de enzimas e proteínas, reduzindo a síntese de compostos de alta massa molecular, como proteínas e celulose, favorecendo os de baixa massa, como aminoácidos e açúcares solúveis. Embora a defesa das plantas seja dependente de uma nutrição mineral equilibrada, poucos estudos no assunto estão disponíveis em nível molecular. Enzimas de defesa como as lipoxigenases (LOX) são encontradas em partes distintas das plantas como cotilédones, frutos e folhas, sendo que a elas atribui-se a função de resposta

contra patógenos e ferimentos (FEUSSNER e WASTERACK, 2002). De igual forma, a peroxidase (PO) está associada a mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos (BAYSAL et al., 2003). A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a enzima reguladora da síntese de compostos fenólicos, sendo estes, precursores da lignina e do ácido salicílico, que atuam na defesa estrutural e no processo de sinalização da resposta sistêmica (BONAS e LAHAYE, 2002). Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a influência do estresse pela deficiência de potássio nas atividades das enzimas LOX, PO e PAL em dois genótipos de soja, um resistente e um susceptível à ferrugem da soja, visando obter informações que auxiliem no entendimento dos mecanismos de defesa dessas plantas sob esse estresse e, assim, permitam melhores programas de adubação.

## Material e Métodos

Sementes de soja dos genótipos PI 561356 (PI, resistente ao fungo da ferrugem asiática) e Embrapa 48 (E48, susceptível) foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Soja (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - CNPSoja). As sementes foram deixadas germinar em papel Germtest sob temperatura e umidade controladas. As plantas foram cultivadas em sistema hidropônico, em solução nutritiva de Clark, na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia/UFV. O delineamento foi em blocos casualizados em esquema fatorial, com 5 repetições: um genótipo resistente e um susceptível, solução nutritiva com potássio (K) (controle) e sem potássio (estresse), e nos estádios de desenvolvimento V5 e V7. Para análise enzimática, as folhas de cada genótipo foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As folhas foram maceradas em presença de inibidores de proteases e obteve-se o extrato foliar onde foram determinadas as atividades das enzimas LOX, PO e PAL. Para as LOX, a velocidade de formação do produto ( $\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) foi avaliada conforme AXELROD et al. (1981) e a atividade específica foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido do ácido linoleico. $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ . Na determinação da atividade da PO, adotou-se o método espectrofotométrico de HAMMERSCHMIDT et al. (1982), no qual mensurou-se a oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio e a atividade específica da peroxidase foi expressa em  $\Delta$  unidades de absorvância. $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ . A PAL foi determinada de acordo com PASCHOLATI et al. (1986) e avaliou-se a conversão da L-fenilalanina em ácido cinâmico. A leitura da variação da absorvância foi feita em espectrofotômetro, a 290 nm, e, os resultados foram expressos como atividade específica em  $\mu\text{mol}$  ácido cinâmico. $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ . As proteínas totais foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976) com modificações.

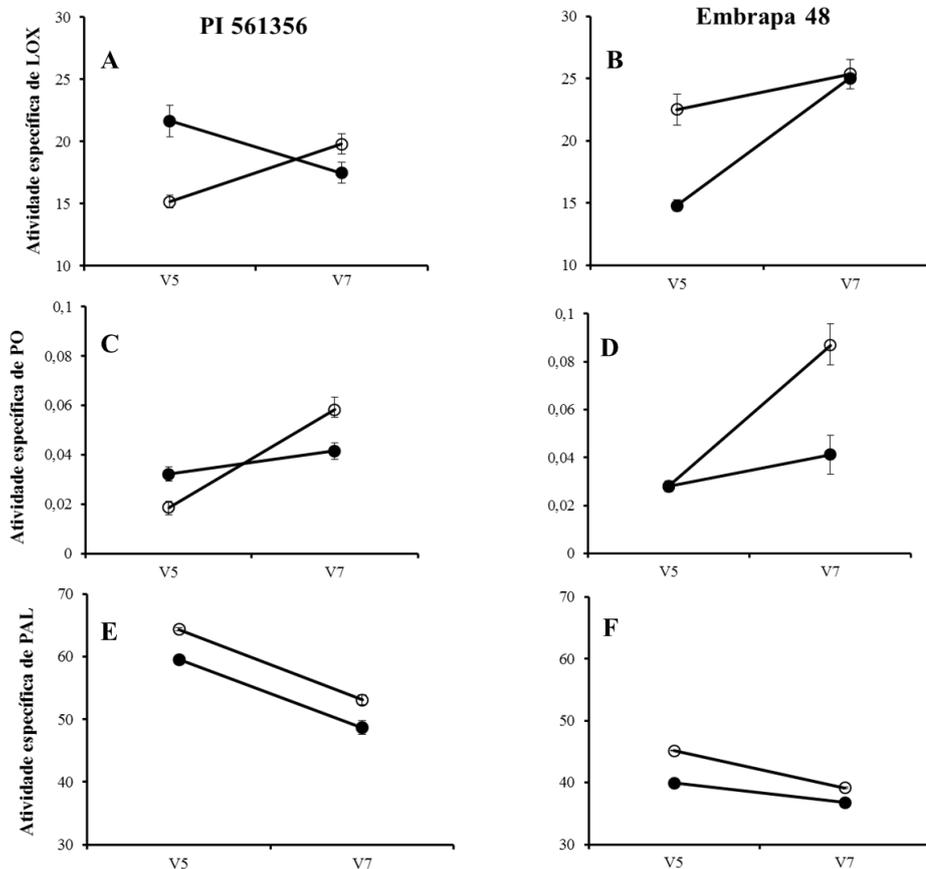
## Resultados e Discussão

Dados não apresentados indicaram que o período entre V5 e V7 caracterizou um início de estresse das plantas causado pela deficiência de potássio como nutriente. Entre V5 e V7, as atividades de LOX foram decrescentes para PI e crescentes para E48 (Figura 1 - A e B). As plantas afetadas por patógenos ou por estresse abiótico têm seus lipídeos degradados pela LOX que produzem os hidroperóxidos de ácidos graxos, e, estes seguirão para as vias de defesa. Assim, verificou-se que a deficiência de potássio parece reduzir a defesa que envolve as LOX em PI e incrementar positivamente em E48. Essa resposta que está de acordo com as respostas obtidas para plantas desses genótipos sob estresse biótico (por inoculação com o fungo da ferrugem asiática), anteriormente observadas por nosso grupo.

Para a PO, verificou-se que as plantas que estavam equilibradas nutricionalmente foram capazes de manter a atividade da PO crescente em taxas maiores com o tempo entre V5 e V7 do que as plantas sob estresse (Figura 1 - C e D). Sugere-se que a deficiência de potássio reduziu a ação de PO, e pode afetar o mecanismo de defesa em ambos os genótipos.

A PAL apresentou taxas de atividade decrescentes com o tempo (entre V5 e V7), que foram semelhantes para ambos os genótipos (Figura 1 - E e F). Observou-se, entretanto, valores menores de atividade desta enzima para as plantas sob estresse nos dois genótipos analisados. Como esta enzima catalisa a desaminação da fenilalanina formando o ácido transcinâmico, que é responsável pela síntese dos compostos fenólicos que são capazes de

agir diretamente contra alguns patógenos, essas atividades menores de PAL poderiam afetar negativamente a defesa das plantas por essa via.



**Figura 1:** Atividade específica de lipoxigenases (LOX) ( $\mu\text{mol}$  de produto formado. $\text{min}^{-1}.\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ ) (A e B), de peroxidases (PO) ( $\Delta A_{470}.\text{min}^{-1}.\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ ) (C e D) e de fenilalanina amônia-liase (PAL) ( $\mu\text{mol}$  ácido cinâmico. $\text{min}^{-1}.\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ ) (E e F) em extratos de folhas de soja dos genótipos PI 561356 (A, C e E) e Embrapa 48 (B, D e F) submetidos a estresse pela deficiência de potássio. As folhas dos dois genótipos foram coletadas nos estádios de desenvolvimento V5 e V7. Os símbolos vazios (○) representam o controle (com K) e os símbolos cheios (●), plantas sob estresse (sem K). Os símbolos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão

**Agradecimentos:** CNPq (GenoSoja, PIBIC e PQ); FAPEMIG (projetos); FINEP (CT-Infra); CAPES (Bolsa DS, PNPD), MEC/UFV (Bolsa Reuni) e NuBioMol/UFV (parceria em pesquisa).

## Conclusões

- Plantas de soja sob deficiência de potássio apresentam alterações nas atividades das enzimas marcadoras de defesa, podendo ter comprometimento de seus mecanismos de defesa ao longo do desenvolvimento;
- A desativação das vias de defesa que envolvem LOX em plantas de soja do genótipo PI e a ativação em E48 estão de acordo com as respostas obtidas em plantas dos mesmos genótipos quando submetidas ao estresse biótico pela inoculação com o fungo da ferrugem asiática, anteriormente observadas por nosso grupo de pesquisa (dados recentes, não publicados).

## Referências

- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S.; JOHN, M. L. Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13.11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. **Methods in Enzymology**, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, p. 747-753, 2003.
- BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n. 1, p. 44-50, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annual Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 275-297, 2002.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.
- PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v. 115, n. 2, p. 165-172, 1986.