

# EFEITO DE GLIFOSATO EM LIPOXIGENASE DE SEMENTE DE CAUPI<sup>1</sup>

ANTONIO LUIZ CERDEIRA<sup>2</sup>, A. WAYNE COLE<sup>3</sup>, DAWN S. LUTHE e ROBERT B. KOCH<sup>4</sup>

**RESUMO** - Foi obtida, com solução de CaCl<sub>2</sub> a 0,68 mM e pH 7,5, a atividade máxima de lipoxigenase em sementes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Foram analisadas sementes durante a germinação, e observou-se que a atividade específica de lipoxigenase diminuiu durante o processo. Sementes de plantas tratadas com o herbicida glifosato (N - (fosfonometil) glicina) como dessecante mostraram significativo aumento da atividade específica de lipoxigenase. Isto pode ser resultado do efeito do herbicida nas plantas. Tal conclusão é baseada no fato de que a, a lipoxigenase, que teve sua atividade específica aumentada pelo glifosato, pode promover a formação do ácido 12-oxo-fitodienoico; b. este, por sua vez, é um possível precursor do ácido jasmônico, um regulador de crescimento que promove senescência em plantas, explicando-se, desta maneira, a ação do herbicida nelas. Pelo método utilizado, não foi encontrada a enzima em folhas ou outras partes verdes das plantas.

Termos para indexação: *Vigna unguiculata*, cálcio, germinação, plantas.

## EFFECT OF GLYPHOSATE ON LIPOXYGENASE OF COWPEA SEED

**ABSTRACT** - The predominant cowpea seed lipoxigenase was optimally activated by calcium at 0.68 mM and at pH 7.5. Seeds were analyzed during germination and showed a decrease in lipoxigenase specific activity with time. Seeds from plants treated with the herbicide glyphosate (N - (phosphonomethyl) glycine) showed a significant increase in lipoxigenase content. This could have been a result of senescence, or the effects of the herbicide on those plants. Such a conclusion is based on findings that a. lipoxigenase, the activity of which was enhanced by glyphosate, has been reported to promote formation of 12-oxo-phytodienoic acid, and b. 12-oxo-phytodienoic acid has been proposed to be a precursor of jasmonic acid, a growth regulator which promotes senescence of plants. With the assay technique utilized, no lipoxigenase was found in mature leaves.

Index terms: *Vigna unguiculata*, calcium, germination, plants.

## INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma importante cultura em diversas regiões tropicais do mundo. A colheita mecânica desta cultura é dificultada pela presença de vagens de diferentes estádios de maturação e também pela presença de folhas e outras partes verdes da planta. O herbicida glifosato (N - (fosfonometil) glicina) poderia ser utilizado como dessecante e, portanto, facilitar a colheita mecânica (Cole & Cerdeira 1982). Contudo, quando o glifosato foi utilizado como dessecante, Cole & Cerdeira (1982) mostraram que sementes de caupi provenientes de plantas tratadas germinaram e cresceram mais vagarosamente que as de plantas não tratadas. Outros estudos (Cer-

deira et al. 1985) indicaram uma redução nas proteínas em sementes provenientes de plantas tratadas. Esta redução pode ser explicada pelo modo de ação do herbicida, que inibe a enzima ácido - 5 - enolpirúvico - shikímico - 3 - fosfo - sintetase (Amrhein et al. 1980). A inibição desta enzima pelo glifosato resulta na diminuição de aminoácidos aromáticos (Amrhein et al. 1980, Steinrucker & Amrhein 1980). Foi também proposto que a redução destes aminoácidos limita a quantidade de proteínas que se acumula nas sementes provenientes de plantas tratadas com glifosato (Cerdeira et al. 1985).

A lipoxigenase (LOX) cataliza a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados contendo formas cis, cis - 1,4 pentadieno, formando hidroperóxidos (Galliard & Chan 1980). Esta enzima é largamente distribuída no reino vegetal, especialmente nas leguminosas, das quais a soja é considerada como a mais rica fonte (Theorell et al. 1947, Scott 1975, Koch et al. 1958). A atividade desta enzima pode ser encontrada em sementes (Dathe et al. 1981, Holden 1970, Koch 1968) e também nas folhas

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 27 de março de 1987.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA), Caixa Postal 69, CEP 13820 Jaguariúna, SP.

<sup>3</sup> Agr., Ph.D., Mississippi State University, Drawer PG, MS, 39762, USA.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Mississippi State University, Drawer BB, MS, 39762, USA.

(Galliard & Chan 1980). Três diferentes tipos de lipoxigenase foram encontrados na soja (Christopher et al. 1970); uma delas não é estimulada pelo cálcio e possui ótima atividade no pH 9.0 com ácido linoléico como substrato. Segundo Koch (1968), existe também uma isoenzima estimulada pelo cálcio, possuindo ótima atividade no pH 7.5 com ácido linoléico como substrato. Koch (1968) também reportou uma terceira isoenzima, a qual mostrou ótima atividade com trilinoleína no pH 5.5.

Em sementes de caupi, Truong & Mendoza (1982) encontraram duas isoenzimas de lipoxigenase, sendo que uma forma era inibida pelo Ca, e outra, ativada por ele. Os mesmos autores determinaram que 94% da atividade total da enzima estava ligada aos cotilédones. A faixa de pH para a atividade de ambas as isoenzimas ficou entre 5 e 8.

Com base nestas informações, este estudo foi conduzido para determinar se o glifosato teve algum efeito no conteúdo de lipoxigenase, uma vez que estudos preliminares indicaram que a atividade da enzima pode aumentar após o tratamento com o herbicida. O presente trabalho teve também o objetivo de determinar mudanças na atividade da lipoxigenase durante os processos de desenvolvimento e germinação de sementes de caupi.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Caupi da cultivar Mississippi purple, foi cultivado no campo, durante o verão de 1982, e em estufa, durante o outono de 1983 e verão de 1984, na Universidade Estadual do Mississippi, USA. Na casa de vegetação, as plantas foram cultivadas em vasos de 15 cm x 20 cm, com a mistura 2:2:1 de solo ("Oktibbeha sandy loam"): areia: turfa. Após a emergência, as plantas foram desbastadas, deixando-se duas plantas por vaso, estaqueando-se cada uma. Não foi utilizada nenhuma forma de luz ou adubação artificial. Utilizou-se Aldicarb (2 - metil - 2 - metiltio) - propionaldeído - 0 - metil - carbamoil - oxima) para controle de insetos, com, aproximadamente, 50 mg por vaso, quando surgia a primeira folha verdadeira na planta. Os vasos foram irrigados diariamente, na medida do necessário, e a temperatura foi mantida em, aproximadamente, 25°C. A idade das vagens, tanto para plantas de estufa como de campo, foi determinada marcando-se as flores assim que elas abrissem. Quando a maioria das vagens alcançou a idade apropriada, as plantas foram aspergidas com glifosato a 1,12 kg/ha em 234 l/ha de água. Uma semana após a aspersão, vagens marcadas provenientes de

plantas tratadas e não tratadas foram colhidas, e as sementes, liofilizadas. Sementes de vários estádios de maturidade foram analisadas para lipoxigenase.

Para estudos da atividade da enzima durante a germinação, sementes de plantas não tratadas foram germinadas em areia esterilizada, utilizando-se incubador em condições de luz e escuro. A atividade de lipoxigenase foi medida em plântulas liofilizadas colhidas aos dois, quatro, seis e oito dias após a semeadura. Com o objetivo de determinar o efeito de glifosato na atividade da enzima em folhas, as plantas foram aspergidas com o herbicida aos cinco e dezessete dias após a semeadura, e as folhas foram colhidas durante oito dias, com intervalos de dois dias, liofilizadas e analisadas para lipoxigenase.

Análise enzimática foi realizada em material biológico homogeneizado com almofariz. As proteínas foram extraídas misturando-se com agitação 1 g do material em 10 ml de solução-tampão (10 mM Tris. HCl, pH 7,0) por 30 minutos. A mistura foi filtrada com papel de filtro (qualitativo, porosidade média), centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a análise de enzima.

A atividade de lipoxigenase no sobrenadante foi medida em 3 ml de solução contendo ácido linoléico (0,35 mM), trilinoleína (2,7 mM), utilizados separadamente, ou em alguns casos EGTA (etileno glicol bis (B - aminoetil eter) N', N', N', N', ácido tetracético) foi adicionado com a concentração final de 0,83 mM para inativar qualquer íon de cálcio que interferisse no processo. O pH da solução-tampão utilizado foi de 5,5, 7,5 ou 9,0, dependendo do caso. A atividade da enzima foi medida adicionando-se 20 µl do extrato e medindo-se polarograficamente o consumo de O<sub>2</sub> a 25°C utilizando-se monitor de O<sub>2</sub> tipo "Yellow Springs" com eletrodo tipo "Clark". A atividade específica foi calculada multiplicando-se a atividade total, expressa em moles de O<sub>2</sub>, por 0,78 para ajustar a quantidade de O<sub>2</sub> na água destilada. Então foi dividido pela quantidade de proteína na amostra e multiplicada por 100. A quantidade de proteína no extrato enzimático foi determinada pelo método de Lowry (1951).

O delineamento estatístico utilizado no experimento com substratos para medir a ação da enzima (Tabela 1) foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. A influência da luz e o tempo de germinação na atividade da enzima, foram estudados com delineamento em parcelas subdivididas, com blocos ao acaso, sendo a luminosidade a parcela, e o tempo, as subparcelas, com cinco repetições. O delineamento utilizado para o efeito de glifosato na atividade de lipoxigenase foi de blocos ao acaso com cinco repetições por tratamento.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade máxima de lipoxigenase em sementes de caupi foi encontrada com pH 7,5, na presença de cálcio e ácido linoléico. Esta atividade foi eli-

TABELA 1. Variações das atividades de lipoxigenase com pH e substrato ( $\mu\text{MO}_2/\text{mg}$  proteína/minuto).

Substrato (solução-tampão de imidazole)	pH		
	7,5	9,0	5,5
Ca <sup>a</sup> + A.L. <sup>b</sup>	3,1 a <sup>c</sup>	0,2 b	0,2 c
EGTA <sup>d</sup> + A.L.	0,0 c	0,1 b	0,6 ab
EGTA + Trilinoleína	0,5 b	0,8 a	0,8 a
A.L.	0,6 b	0,0 b	0,4 bc

<sup>a</sup> 5  $\mu\text{l}$  de Cálcio ( $\text{Ca Cl}_2$ ) a 0,45 M, concentração final de 0,75 mM.

<sup>b</sup> 5  $\mu\text{l}$  de ácido linoleico a 0,21 M, concentração final de 0,35 mM.

<sup>c</sup> Médias não indicadas com a mesma letra diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5%, dentro da coluna.

<sup>d</sup> 5  $\mu\text{l}$  de etileno - glicol - bis - ( $\beta$  - amino - etil - éter) N', N', N', N', ácido tetraacético a 0,3 M, adicionado para bloquear qualquer possível efeito do Ca; concentração final de 0,83 mM.

<sup>e</sup> 50  $\mu\text{l}$  de trilinoleína a 0,13 M, concentração final 2,7 mM.

minada quando EGTA foi adicionado para inativar o cálcio presente. Tal efeito na presença de cálcio (Ca) deveu-se, provavelmente, à Ca - lipoxigenase descrita por Koch et al. (1968). Outra forma de atividade da enzima foi encontrada quando analisada na presença de trilinoleína (Tabela 1). Esta atividade não foi tão alta quanto a Ca - lipoxigenase, e, aparentemente, foi menos afetada pelo pH da mistura. Duas isoenzimas podem, portanto, ser destacadas em sementes de caupi: uma, estimulada pelo cálcio em pH 7,5, e outra, que possui um espectro maior de pH para sua atividade. Estes resultados são similares aos obtidos por Koch (1968) e Dillard et al. (1961), os quais encontraram diferenças nas propriedades físicas de lipoxigenases de soja e amendoim. Não foi detectada atividade com pH 9,0.

A atividade da enzima foi analisada durante o início do desenvolvimento das plântulas. Sementes foram germinadas em condições de luz e escuro, e observou-se que a atividade da enzima diminuiu à medida que as plântulas tornaram-se mais velhas (Tabela 2).

TABELA 2. Atividade de Ca-lipoxigenase de sementes de caupi germinadas em condições de claro e escuro.

D.A.E. <sup>a</sup>	Atividade específica ( $\mu\text{MO}_2/\text{mg}$ proteína/minuto)	
	Claro	Escuro
0	3,1 a <sup>b</sup>	3,5 a
2	2,3 b	3,1 b
4	1,7 c	2,2 c
6	0,8 d	1,3 d
8	0,0 e	0,0 e

<sup>a</sup> Dias após a embebição.

<sup>b</sup> Médias não indicadas com a mesma letra diferem significativamente entre si, dentro da coluna, de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5%. Não houve efeito da luminosidade na atividade da enzima.

O desenvolvimento da enzima durante a formação das sementes foi determinado em condições de casa de vegetação. Nestas condições, a atividade específica da enzima aumentou de zero para 2,9  $\mu\text{MO}_2/\text{prot}/\text{min}$ , dos cinco até os dezenove dias após o florescimento (Fig. 1).

Estudos sobre a acumulação de proteína durante a formação da semente, e sobre a utilização de proteína durante a germinação (Cerdeira et al. 1985) mostraram um padrão similar ao da lipoxigenase nas sementes, indicando, assim, uma possível função da enzima no processo de germinação. Esta possível função foi também proposta por Gerritsem et al. (1983).

Plântulas e plantas de caupi tratadas com glifosato cinco e dezessete dias após o plantio e colhidas a intervalos de dois dias após o tratamento não mostraram nenhuma atividade de lipoxigenase nas folhas. Holden (1970) encontrou a enzima em folhas de outras espécies, como no feijão (*Phaseolus vulgaris*). Isto deve-se, provavelmente, ao fato de diferentes técnicas terem sido utilizadas para a detecção da enzima.

Uma vez que a maior atividade da enzima em caupi foi encontrada com Ca (Tabela 1), os estudos sobre os efeitos de glifosato foram realizados nestas condições.

Em experimentos de campo, mostrou-se que a atividade da enzima foi significativamente maior

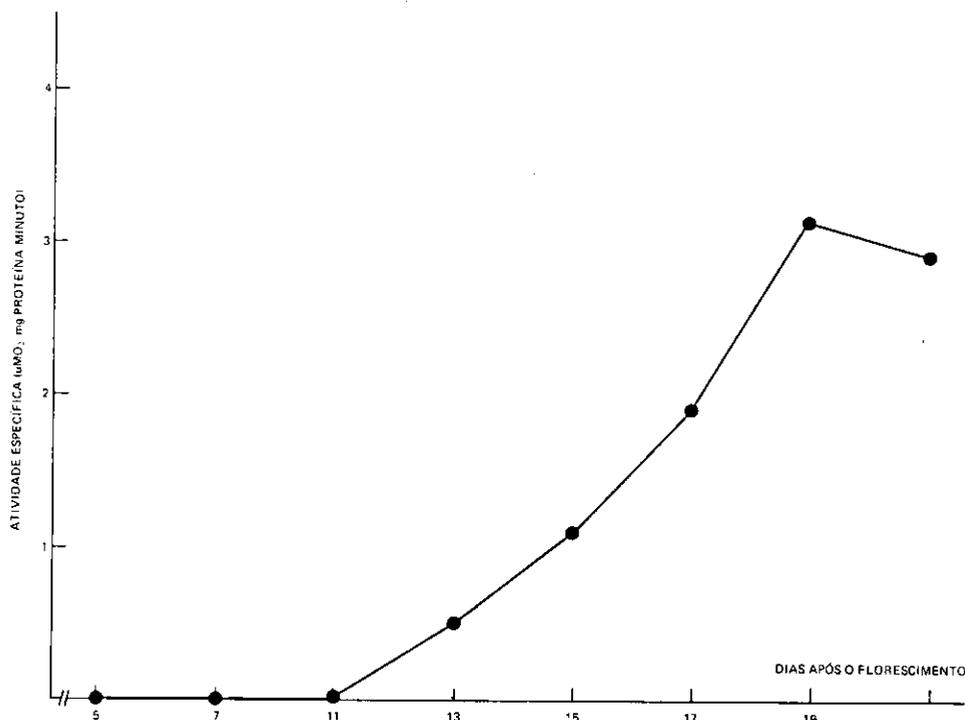


FIG. 1. Atividade específica de lipoxigenase em sementes em desenvolvimento provenientes de plantas de caupi não tratadas com glifosato.

em sementes provenientes de plantas tratadas aos dez, doze e quatorze dias após o florescimento e colhidas uma semana depois (Tabela 3). As sementes provenientes de plantas tratadas eram menores e menos desenvolvidas que as não tratadas.

Não se sabe exatamente por que o glifosato aumentou a atividade da enzima nas sementes (Tabela 3). Vick & Zimmerman (1983) propuseram que o ácido linoléico era convertido em ácido 12-oxo-fitodienóico através da ação da lipoxigenase e hidroperoxido-ciclase, enzimas presentes no pericarpo de *Vicia faba*. Os mesmos autores também identificaram o ácido 12-oxo-fitodienóico como precursor do ácido jasmônico. Este fato possibilita uma possível explicação para o modo de ação do glifosato em relação à lipoxigenase e ao ácido jasmônico.

O ácido jasmônico foi identificado como regu-

TABELA 3. Efeito de glifosato na atividade de lipoxigenase em sementes de caupi ( $\mu\text{MO}_2/\text{mg}$  proteína/minuto).

	Dias após o florescimento			
	10	12	14	16
Controle	1,1 b <sup>a</sup>	1,4 b	1,0 b	3,1 a
Tratadas	2,5 a	2,8 a	2,4 a	3,9 a

<sup>a</sup> Médias não indicadas com a mesma letra diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5%, dentro da coluna.

lador de crescimento responsável pela senescência em plantas (Ueda & Kato 1980, Yamane et al. 1981, Dathe et al. 1981). Como o glifosato aumentou a atividade da lipoxigenase, enzima indicada

como importante para a formação do ácido jasmonico, este composto poderia, portanto, ser formado como efeito final do tratamento com glifosato, o que, então, acarretaria o processo de senescência nas plantas.

### CONCLUSÕES

1. A atividade máxima de lipoxigenase em sementes de caupi foi encontrada com pH 7,5, na presença de cálcio e ácido linoléico.

2. A atividade de lipoxigenase diminuiu gradativamente no decorrer do processo de germinação das sementes de caupi.

3. Quando utilizado como dessecante, o herbicida glifosato promoveu um aumento da atividade de lipoxigenase em sementes provenientes de plantas tratadas com o herbicida, o que foi mais acentuado em sementes em formação.

4. Não foi detectada a enzima nas folhas de caupi.

### REFERÊNCIAS

- AMRHEIN, N.J.; SCHAB, J.; STEINRUCKEN, H.C. The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften*, 67:356-7, 1980.
- CERDEIRA, A.L.; COLE, A.W.; LUTHE, D.S. Cowpea seed protein response to glyphosate. *Weed Sci.*, 33: 1-6, 1985.
- CHRISTOPHER, J.P.; PISTORIUS, E.K.; AXELROD, B. Isolation of an isoenzyme of soybean lipoxigenase. *Biochem. Biophys. Act.*, 198:12-9, 1970.
- COLE, A.W. & CERDEIRA, A.L. Southernpea response to glyphosate desiccation. *Hort Science*, 17(2):244-6, 1982.
- DATHE, W.; RONSCIL, H.; PREISS, A.; SCHADE, W.; SEMBDNER, G.; SCHEIBER, K. Endogenous plant hormones of broad bean. *Planta*, 153:530-5, 1981.
- DILLARD, M.G.; HENICK, A.S.; KOCH, R.B. Differences in reactivity of legume lipoxidases. *J. Biol. Chem.*, 236:37-40, 1961.
- GALLIARD, T. & CHAN, H.W.S. *The biochemistry of plants*. New York. Academic Press, 1980.
- GERRITSEM, M.V.; BOS, A.L.M.; VELDINK, G.A.; Vliegenthart, J.F.G. Localization of lipoxigenase 1 and 2 in germinative soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol.*, 73:262-7, 1983.
- HOLDEN, M. Lipoxidase activity of leaves. *Phytochemistry*, 9:507-12, 1970.
- KOCH, R.B. Calcium ion activation of lipoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125:303-7, 1968.
- KOCH, R.B.; STERN, B.; FERRARI, C.G. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 78:165-79, 1958.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- SCOTT, D. *Enzymes in food processing*. New York. Academic Press, 1975.
- STEINRUCKEN, H.C. & AMHREIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5 - enolpyruvyl - shikimic - acid - 3 phosphate - synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94:1207-12, 1980.
- THEORELL, H.; HOLMAN, R.T.; AKESON, E.A. A note on preparation of crystalline soybean lipoxidase. *Arch. Biochem.*, 14, 250, 1947.
- TRUONG, V.D. & MENDOZA, E.M.T. Purification and characterization of two lipoxigenase isoenzymes from cowpea. *J. Agric. Food Chem.*, 30:54-60, 1982.
- UEDA, J. & KATO, J. Isolation and identification of a senescence promoting substance from wormwood. *Plant Physiol.*, 66:246-9, 1980.
- VICK, A.B. & ZIMMERMAN, D.C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxigenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111(2): 470-7, 1983.
- YAMANE, H.; TAKAGI, H. ABE, H.; YOKOTA, T.; TAKANASHI, N. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol.*, 22(4):689-97, 1981.