



LIGNIFICAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA (*Glycine max* L.Merril) SUBMETIDAS AO ALELOQUÍMICO 2-BENZOXAZOLINONA

Angela Valderrama Parizotto¹, Gisele Adriana Bubna², Maria de Lourdes Lucio Ferrares³,
Oswaldo Ferrarese Filho⁴

Plantas superiores regularmente liberam compostos orgânicos no ambiente. Estes compostos acumulam-se no solo e influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas vizinhas, com efeitos positivos e/ou negativos, em um fenômeno chamado alelopatia. No solo, estes compostos aleloquímicos podem ser rapidamente absorvidos por outras plantas, e eventualmente, causarem danos ao crescimento das raízes, e inibição do crescimento da plântula. Benzoxazolinona é um aleloquímico presente em muitas monocotiledôneas e possui alta fitotoxicidade, interferindo na germinação, na divisão celular, no metabolismo e inibição do crescimento de plantas superiores. A fenilalanina amônia liase (PAL) é a primeira enzima na rota de formação dos polímeros de lignina, sendo um ponto importante de regulação dessa via. Neste contexto, os efeitos da 2-benzoxazolinona (BOA) no crescimento, atividade da PAL além dos teores de lignina foram analisados nas raízes de soja. As sementes foram germinadas por 3 dias e as plântulas obtidas cultivadas em câmara (por 24 h) em solução nutritiva (0,25 a 1mM de BOA), a 25 °C com aeração. Após a exposição das raízes em soluções, contendo ou não 2-benzoxazolinona (BOA), foi determinado o crescimento, atividade da PAL e a quantidade de lignina. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de 2-benzoxazolinone é proporcional a redução do crescimento em plantas de soja, redução do teor de lignina e da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL).

PALAVRAS-CHAVE: *alelopatia; benzoxazolinona; fitotoxicidade; lignina.*

INTRODUÇÃO

Plantas superiores liberam compostos orgânicos no ambiente. Estes compostos acumulam-se no solo e influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas vizinhas, com efeitos positivos e negativos, em um fenômeno chamado alelopatia.

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá-UEM-Maringá-Paraná. angelaparizotto@hotmail.com

² Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá-UEM-Maringá-Paraná. gibubna@hotmail.com

³Co-orientadora Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá-UEM-Maringá-Paraná. mlferrarese@uem.br

⁴ Orientador Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá-UEM-Maringá-Paraná. oferrarese@uem.br

Após absorção desses compostos pelas plantas, eles reduzem a absorção de água, inibem a expansão foliar, reduzem o alongamento das raízes e a razão raiz-caule. Em nível celular, eles reduzem a taxa fotossintética, induzem a peroxidação lipídica e alteram certas atividades enzimáticas causando generalizado aumento na permeabilidade da membrana e respectiva redução na absorção de água e de nutrientes.

Benzoxazolinonas (ácidos hidroxâmicos cíclicos) constituem um importante grupo de metabólicos secundários encontrados nas plantas superiores, particularmente cereais como o trigo, centeio e milho (Friebe 2001). Estes constituem um importante sistema de aleloquímicos que protegem as plantas contra bactérias, fungos, insetos e daninhas. Entre as benzoxazolinonas, 2-benzoxazolinona (BOA) é um dos mais potentes aleloquímicos do centeio e inibem o crescimento de numerosas plantas tais como: *Phaseolus aureus* e *Lactuca sativa* (kato-Noguchi e Macias 2005),.

A via dos fenilpropenóides está envolvida na síntese de uma ampla gama de compostos secundários em plantas tais como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas e lignina. O primeiro passo nesta via é a desaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia liase (PAL) produzindo cinamato. Após sucessivas reações, no último passo da via, peroxidase (POD) catalisa a polimerização oxidativa dos três alcoóis *p*-hidroxicinamil (*p*-cumaril álcool, coniferil álcool e sinapil álcool). Eles geram as unidades do polímero de lignina *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Estudos recentes indicaram que a redução do crescimento das raízes pelos aleloquímicos está associada às prematuras modificações na lignificação das paredes celulares, alteração nas atividades das enzimas da via dos fenilpropenóides, como PAL e POD, e no conteúdo de lignina. O papel de benzoxazolinonas no metabolismo de compostos fenólicos tem sido descrito por alguns autores. Todavia, há carência de informações relacionando os efeitos de benzoxazolinonas na via de fenilpropenóides, em especial no tocante às atividades de suas principais enzimas aliada ao fato de que a maioria dos trabalhos aborda tão somente o estresse oxidativo causado por BOA, dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos da 2-benzoxazolinona sobre a atividade da PAL, conteúdo de lignina e o comprimento das raízes de plântulas de soja.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.), variedade BRS-232, obtidas junto à Embrapa Soja. As sementes, previamente desinfetadas em solução de NaClO a 2%, foram germinadas em câmara escura, a 25°C, e as plântulas obtidas após três dias. Vinte e cinco plântulas foram transferidas para um sistema experimental com solução nutritiva pH 6,0 (Ferrarese et al, 2000) contendo, ou não, 2-Benzoxazolinona (BOA) (0,25 a 1 mM). Os recipientes foram acondicionados em câmara (durante 24 horas 280 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas, 25°C).

No início dos experimentos, e após 24 horas de cultivo, com auxílio de régua milimetrada foram medidos os comprimentos de todas as plântulas, de cada repetição e determinadas às diferenças entre os comprimentos iniciais e finais, e os resultados expressos em centímetros (Herrig et al., 2002).

A determinação da atividade da L-fenilalanina amônia liase (PAL) foi fundamentada na metodologia descrita por Havir (1987) com modificações para a análise da atividade enzimática (Ferrarese et al. 2000), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu®, Japão) para detecção do produto da reação, *trans*-cinamato, a atividade da fenilalanina amônia liase foi expressa em μmoles de *trans*-cinamato formado por hora por g de matéria fresca.

As raízes frescas foram levadas a estufa 80°C e após secagem esse material, foi utilizado para a extração da lignina. O material (0,3 g de tecido em 7 ml de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM, pH 7,0) foi macerado em gral de porcelana e transferido para um tubo de centrifuga, sendo submetido a sucessivas lavagens e centrifugações (Ferrarese et al., 2002). O precipitado final representa a parede celular, isenta de proteínas interferentes.

O método da lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) foi usado para a determinação dos teores de lignina das raízes em espectrofotômetro (Morrison, 1972). A concentração de lignina foi determinada por leitura da densidade óptica a 280nm sendo expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular.

A análise dos dados foi efetuada usando o programa Sisvar[®] (UFLA, Brasil), a ANOVA foi aplicada para as significâncias das variações observadas e as diferenças entre os parâmetros foram avaliadas por teste Scott-Knott. O critério de significância adotado foi P<0,05 e todos os valores expresso \pm erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas são altamente suscetíveis aos aleloquímicos, os quais afetam principalmente o seu crescimento. Os efeitos da BOA foram avaliados no crescimento das raízes de plântulas de soja crescidas durante exposição (24 h) em solução nutritiva (Figura 1). O comprimento das raízes foi reduzido em 18,49% a 59,68% com o aumento da concentração da BOA de 0,25 para 1 mM, em comparação com o controle. Um fato observado em nossos estudos é que a BOA não somente reduziu significativamente o crescimento das raízes das plântulas de soja (Figura 2), mas também os teores de lignina das mesmas em cerca de 24,37% em relação ao controle após o tratamentos com 1mM de 2-benzoxazolinona (BOA) (Figura 3). Além da redução da lignificação, as raízes de soja expostas a 1mM de BOA revelaram significativa redução 68,51% em relação ao controle (Figura 4) na atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) enzima da via dos fenilpropenóides.

A redução do crescimento das raízes tem sido considerada como um primeiro efeito dos aleloquímicos e, em alguns casos, está associada com precoce lignificação da parede celular. Podendo também estar relacionado com atividades mitóticas menores na ponta da raiz (Singh et al., 2005) e com numerosas modificações ultra-estruturais como aumento citoplasmático de vacúolos, redução da densidade dos ribossomos, dictiossomos e número de mitocôndrias, além de um decréscimo do catabolismo de lipídeos (Burgos et al., 2004).

Existem várias enzimas envolvidas na síntese de lignina, sendo a sequência metabólica que conduz a esse processo conhecida como via de fenilpropenóides. Enzimas envolvidas na síntese de fenilpropenóides, como PAL e CAD, foram localizadas no citosol e vesículas de Golgi, respectivamente, pressupondo-se co-regulação durante a síntese de lignina. Plantas transgênicas de tabaco, com redução nas atividades da PAL ou da C4H, apresentam reduzido conteúdo de lignina (Elkind et al., 1990; Bate et al., 1994; Sewalt et al., 1997).

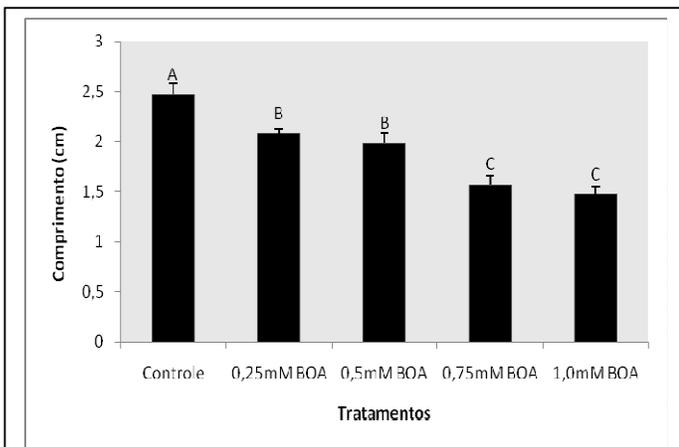


Figura 1. Comprimentos das raízes de soja, tratadas com BOA por 24 horas Médias \pm SE ($N = 4$) seguido por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

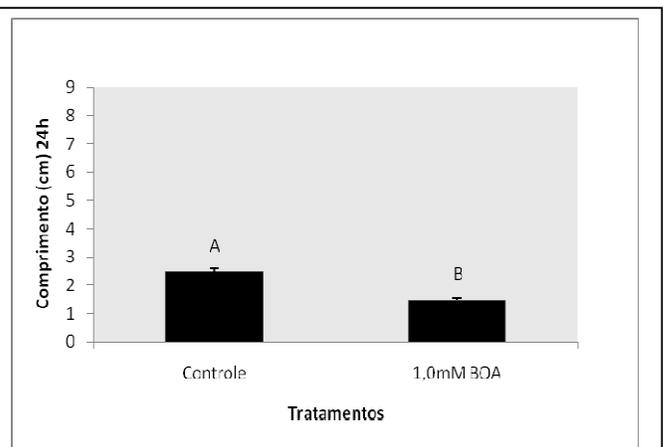


Figura 2. Comprimentos das raízes de soja, tratadas com BOA por 24 horas Médias \pm SE ($N = 4$) seguido por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

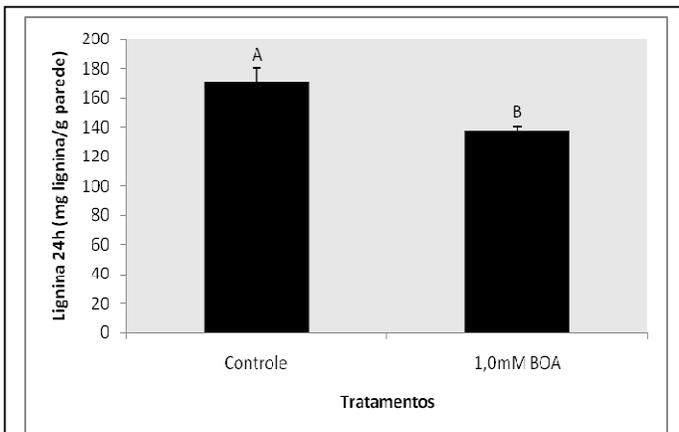


Figura 3. Efeitos da BOA no conteúdo de lignina. Médias \pm SE ($N = 4$) seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

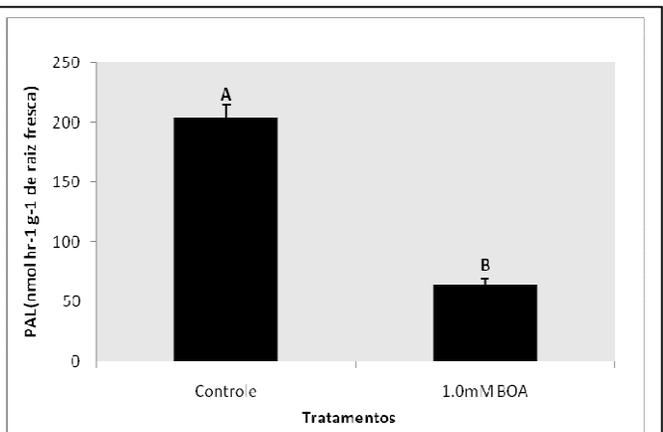


Figura 4. Efeitos da BOA na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL). Médias \pm SE ($N = 4$) seguido por letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com o Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a redução no crescimento das raízes de soja, induzida pela BOA, é devido à aplicação exógena deste aleloquímico, esta redução é relatada por outros trabalhos que indicam alterações no desenvolvimento mitótico, numerosas modificações ultra-estruturais, catabolismo de lipídio e o resultado concluído neste trabalho pela alteração na composição da lignina da raiz. Esta redução no teor de lignina pode ser explicada pela influência da BOA na via dos fenilpropenóides, em que além desta modificação proporcionou uma redução na atividade da primeira enzima da via a fenilalanina amônia-liase (PAL). Com isso, o aumento da concentração de 2-benzoxazolinone é proporcional a redução do crescimento em plantas de soja, redução do teor de lignina e da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL).

REFERÊNCIAS

BATE, N.J.; ORR, J.; NI, W.; MEROMI, A.; NADLER- HASSAR, T. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.91, p.7608–12, 1994.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S.A.; RIBAK, O. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.87, p.9057–61, 1990.

FERRARESE, M.L.L.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. **Plant Biology**, v.2, p.152-153, 2000.

FERRARESE, M.L.L.; ZOTTIS, A.; FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantitation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots. **Biologia, Section Botany**, v.57, p. 541-543, 2002.

FRIEBE, A. Role of benzoxazinones in cereals. **J. Crop Prod.** v.4 (2) p. 379–400, 2001.

HAVIR, E.A. L-Phenylalanine ammonia-lyase from soybean cell suspension cultures. **Methods in Enzymology**, v.142, p.248-253, 1987.

HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L.; SUZUKI, L.S.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v.35, p.51-58. 2002.

KATO-NOGUCHI, H.; MACIAS, F.A. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds, **J. Plant Physiol.** v.162, p. 1304–1307, 2005.

MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal Sci. Fd. Agric.**, v.23, p.455, 1972.

SEWALT, V.J.H.; NI, W.; BLOUNT, J.W.; JUNG, H.G.; MASOUD, S.A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology**. v.115, p.41–50, 1997.